รายงานการวิจัย

โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

การวิจัยหอยครบวงจร: บทบาทสำคัญทางวิทยาศาสตร์ การแพทย์ เศรษฐกิจ และวัฒนธรรม: I. โมโนกราฟของหอยไทย

The Overall Research on Molluscs: Their Significant for Science, Medicine, Economic and Culture: I. Monographic Works of Thai Molluscs

คณะผู้วิจัย

ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา [1] (หัวหน้าโครงการ)
รองศาสตราจารย์ ดร. เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ [2,3]
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร [3]
อาจารย์ ดร. จิรศักดิ์ สุจริต [1]
อาจารย์ ดร. ปิโยรส ทองเกิด [1]
อาจารย์ ดร. อัมพร วิเวกแว่ว [1]
อาจารย์ ดร. ผ่องพรรณ ประสารกก [4]
อาจารย์ ดร. บังอร กองอิ้ม [5]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2]สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[3]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[4]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[5]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

รายงานการวิจัย

โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

การวิจัยหอยครบวงจร: บทบาทสำคัญทางวิทยาศาสตร์ การแพทย์ เศรษฐกิจ และวัฒนธรรม: I. โมโนกราฟของหอยไทย

The Overall Research on Molluscs: Their Significant for Science, Medicine, Economic and Culture: I. Monographic Works of Thai Molluscs

คณะผู้วิจัย

ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา [1] (หัวหน้าโครงการ)
รองศาสตราจารย์ ดร. เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ [2,3]
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร [3]
อาจารย์ ดร. จิรศักดิ์ สุจริต [1]
อาจารย์ ดร. ปิโยรส ทองเกิด [1]
อาจารย์ ดร. อัมพร วิเวกแว่ว [1]
อาจารย์ ดร. ผ่องพรรณ ประสารกก [4]
อาจารย์ ดร. บังอร กองอิ้ม [5]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2]สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[3]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[4]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[5]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนโดย โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช หรือ CU-CLUSTER-FUND ภายใต้โครงการนำร่องมหาวิทยาลัยวิจัย คลัสเตอร์อาหารและน้ำ (FW 646A)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ 1) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2) สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 3) ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 4) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และ 5) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่สนับสนุนพื้นที่และเครื่องมือวิจัยในชั้นต้น

ขอบคุณพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยา American Museum of Natural History, New York; The Natural History Museum, London; Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris; National Museum of Natural History, Smithsonian Institute, Washington D.C; National Museum of Well, Cardiff; National Science Museum and Technology, Tokyo; Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Brussels; Forschungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Frankfurt, a.m.; University Museum of Zoology Cambridge, Cambridge; Museum of Zoology, University of Copenhagen, Denmark; Raffles Museum of Biodiversity Research, Singapore; Zoological Museum of Berlin, Berlin; Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis, Leiden ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการศึกษาเปรียบเทียบ และขอยืมตัวอย่างมาประกอบในการศึกษา

ท้ายที่สุดขอขอบคุณนิสิตในห้องปฏิบัติการณ์ หน่วยวิจัย และสถาบันฯ ที่เป็นกำลังให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

บทคัดย่อภาษาไทย

เป็นที่ชัดเจนว่าสัตว์จำพวกหอยมีความสำคัญต่อมนุษย์ในด้านต่างๆ มากมาย ทั้งในฐานะที่เป็นผู้บริโภค สัตว์จำพวกหอยยังช่วยทำให้เกิดความสมดุลของ พืช เห็ดรา และไลเคนในระบบนิเวศธรรมชาติ และในบทบาทของนักล่าก็สัตว์จำพวกหอยยังช่วยควบคุมไม่ให้มีประชาการของสัตว์บางกลุ่มมีมากจนเกินไปทั้งในระบบนิเวศบก น้ำจืด และทะเล จะเห็นว่าสัตว์จำพวกหอยมีความสัมพันธุ์ที่ใกล้ชิดกับมนุษย์อย่างมากทั้งในทางวัฒนธรรม ศาสนา และเศรษฐกิจ และยังจัดเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญอีกด้วย

หน่วยงานย่อย IUCN ด้านความหลากหลายของสัตว์จำพวดหอย และคณะผู้เชี่ยวชาญด้านความหลากหลายของหอย (SSC) ได้การประเมินสถานภาพด้านความหลากสปีชีส์ของหอยในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา ซึ่งที่ผ่านมาผลการประเมินสถานภาพของหอยน้ำจืดและพืชน้ำบางกลุ่มได้สำเร็จลุล่วง งานนี้จัดว่าเป็นการประเมินสถานภาพของสัตว์จำนวกหอยอย่างจริงจังเป็นครั้งแรก โดยได้รับความร่วมมือจากผู้เชี่ยวชาญของหน่วยงานต่างๆ แต่อย่างไรก็ตามการประเมินสถานภาพครั้งนี้ไม่มีหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการจัดการทรัพยากรธรรมชาติจากประเทศไทยร่วมในครั้งนี้ด้วย

มีการประมาณความหลากสปีชีส์ของสัตว์จำพวกหอยจากประเทศไทยอยุ่ก 250,000 สปีชีส์ แต่ผู้เชี่ยวชาญเชื่อว่าประเทศไทยอาจจะมีจำนวนสปีชีส์ของสัตว์จำพวกหอยได้มากกว่าถึง 2 เท่า แต่ความเป็นจริงสิ่งที่รับทราบเกี่ยวนั้นมีน้อยกว่าร้อยละ 20 ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่ามีความจำเป็นและสำคัญที่เกี่ยวกับงานความรู้พื้นฐานด่าวๆ ก่อนที่สัตว์หล่านี้จะสูญพันธุ์ หรือองค์ความรู้ที่เกิดจากการศึกษาโดยชาวต่างชาติอย่างเพียงฝ่ายเดียว ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะสร้างงานวิจัยพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับสัตว์จำพวกหอย พร้อมทั้งการจัดการฐานข้อมูลสำหรับสร้างโมโนกราฟของสัตว์จำพวกหอยของประเทศไทยและการจัดตั้งศูนย์ความเป็นเลิศการวิจัยทางด้านหอยของภูมิภาค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

It is clear that mollusks are benefit to humans. As eaters of plants and detritus, they keep algae, fungi, lichens and seedlings in ecological balance. As predators they also prevent overpopulation of the soil by worms, insects and larvae, and overpopulation of the sea and rivers by other molluscs. Molluscs have been closely linked with humankind; in cultural, religious and economic terms, and have always been a valuable source of food.

The IUCN Mollusc Biodiversity Program and the SSC Mollusc Specialist Group have been assessing the conservation status of various regional molluscan faunas over the last 5 years. In 2010 two major regions were completed enabling a review of the freshwater molluscs, and selected plant groups. These form the first comprehensive overviews of the status of these faunas. Various tools have also been developed to assist local communities assess and manage their habitat resources. However there's still almost no any initiative actions on Thai mollusk fauna.

There are approximately 250,000 mollusc species reported in Thailand but specialist estimate that number should exceed to double or more than that. Beside the known species, less than 20 species, which indicated that we need to work intensively before some go extinction or be assessed by people from outside our country. This research was emphasized on reforming the fundamental knowledge creation on Thai mollusk, and produced the monograph on Thai molluscs for basic knowledge on landsnails of Thai people. And we also expected to initiate National Mollusc Research Center.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูปภาพ	viii
บทที่ 1 บทนำ	
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
บทที่ 2 สอบสวนเอกสาร	
2.1. ด้านอนุกรมวิธานและความหลากสปีชีส์ของหอย	3
2.2. ด้านความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พันธุศาสตร์ประชากร และเซลล์พันธุศาสตร์	
2.2.1. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ	5
2.2.2. พันธุศาสตร์ประชากร	6
2.2.3. เซลล์พันธุศาสตร์	7
2.3. ด้านพิษวิทยาและการสาธารณสุข	9
2.4. ด้านนิเวศวิทยา การอนุรักษ์ และผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม	10
บทที่ 3 วิธีการศึกษา	
3.1. แนวทางในการดำเนินโครงการ	12
3.2. พื้นที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่าง	12
3.3. การจำแนกสปีชีส์	13
3.4. การศึกษากายวิภาคศาสตร์	13
3.5. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พันธุศาสตร์ประชากรและเซลล์พันธุศาสตร์	15

บทที่ 4 ผลการศึกษา

4.1. กลุ่มหอยมีฝาปิดเปลือก ได้แก่ Cyclophoridae และ Pupinidae **17**

4.2. กลุ่มหอยนักล่า วงศ์ Streptaxidae และ Diapheridae **22**

4.3. กลุ่มหอยขัดเปลือก Ariphantidae และ Dyakiidae **24**

4.4. กลุ่มหอยต้นไม้วงศ์ Camaenidae **30**

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา **36**

เอกสารอ้างอิง **38**

ภาคผนวก 1 สรุปผลงานตีพิมพ์ภายใต้ทุนวิจัยโครงการนำร่อง **43**

ภาคผนวก 2 รายการตัวอย่างหอยเดื่อใหญ่ที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย **44**

ภาคผนวก 3 รายการตัวอย่างหอยต้นไม้ปากม่วงที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย **48**

ภาคผนวก 4 ประวัติผู้วิจัย **51**

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่างและชนิดของหอยงวงท่อที่พบ 18

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 หอยงวงท่อสกุล *Rhiostoma* รูป **A-E** *Rhiostoma housei* รูป **F, G** *Rhiostoma haughtoni* รูป **H-M** *Rhiostoma haniesi* และ รูป **N, O** *Rhiostoma simplicilarbe* **21**

รูปที่ 2 หอยนักล่าสกุล *Discartemon* รูป **A** *Discartemon stangulatus* รูป **B** *Discartemon* sp.1 รูป **C** *Discartemon* sp.2 รูป **D** *Discartemon subglobosus* รูป **E** *Discartemon* sp.3 รูป **F** *Discartemon siamensis* รูป **G** *Discartemon* sp. 4 รูป **H** *Discartemon globosus* รูป **I** *Discartemon depressa* รูป **J** *Discartemon* sp. 5 รูป **K** *Discartemon petti* และ รูป **L** *Discartemon* sp.6 **23**

รูปที่ 2 หอยเดื่อใหญ่สกุล *Hemiplecta* ที่พบในประเทศไทย รูป **A-D** *Hemiplecta distincta* และ รูป **E, F** *Hemiplecta pluto* **29**

รูปที่ 4 รูป **A-L** ความผันแปรของเปลือหอยนกขนิ้นน้อยปากสีม่วง *Amphidromus glaucolarynx* จากพื้นที่ต่างของประเทศไทย **34**

รูปที่ 5 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของหอยนกขมิ้นน้อยปากสีม่วง *Amphidromus glaucolarynx* จำนวน 11 ประชากร ด้วยวิธี maximum parsimony ตัวเลขแสดง bootstrap probability 100 replicated. Outgroup 1=*Amphidromus perversus*; Outgroup 2=*Amphidromus contrarius*; Outgroup 3=*Camaena illustris* **35**

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

"หอย" เป็นสิ่งมีชีวิตที่อุบัติขึ้นมาบนโลกตั้งแต่มหายุคแคมเบรียน มีบทบาทจำเพาะหลังจากผ่านกระบวนการคัดเลือกทางธรรมชาติ หอยมีวิวัฒนาการที่ทำให้มีความหลากหลายของสปีชีส์มากเป็นที่สองรองจากสัตว์ขาข้อ (arthropods) และมีหน้าที่เชิงนิเวศอย่างหลากหลาย ซึ่งในที่สุดมีปฏิสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อย่างผสมกลมกลืนตามยุคสมัยของโลกที่ผ่านมาแล้วหลายร้อยล้านปี นับจากสิ่งมีชีวิตที่เรียกว่า "สัตว์" มีกำเนิดขึ้นมา มนุษย์ที่เข้าสัมผัสกับธรรมชาติได้จำแนกหอยตามการใช้ประโยชน์ ได้แก่ หอยที่มีประโยชน์และหอยที่มีโทษ การประมาณจำนวนสปีชีส์ของหอยทั้งโลกน่าจะมีถึง 150,000 ถึง 200,000 สปีชีส์ อย่างไรก็ตามมีเงื่อนไขหลายอย่างที่ทำให้การประมาณจำนวนสปีชีส์ยังไปไม่ถึงความเป็นจริงด้วยสาเหตุต่างๆ ได้แก่การมีสปีชีส์ซ่อนเร้น (cryptic species) ที่ยังไม่มีการวิเคราะห์ได้อย่างทั่วถึง แม้จะมีเทคนิคการวิเคราะห์โดยใช้สารชีวโมเลกุล การศึกษายังคงมุ่งเน้นในสปีชีส์ที่มีบทบาททางเศรษฐกิจซึ่งมีเพียงไม่กี่สปีชีส์ นอกจากนั้นความจำกัดในการเก็บตัวอย่าง เช่นในเวลากลางคืนก็ทำให้จำนวนสปีชีส์ยังคงขาดอีกจำนวนมาก และการที่ยังไม่สามารถเข้าถึงพื้นที่จำเพาะหลายแห่งได้ อาทิ บริเวณน้ำลึก ก็เป็นสาเหตุที่ทำให้ไม่สามารถทราบจำนวนสปีชีส์ที่แท้จริง

การประมาณจำนวนสปีชีส์ของหอยในประเทศไทย ข้อมูลล่าสุดโดยสำนักนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ (สผ.) กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติ ได้ระบุในปี 2551 ว่าประเทศไทยมีชนิดพันธุ์หอยทะเลทั้งหอยฝาเดียว สองฝา และหมึกรวมทั้งสิ้นเกือบ 3,000 กว่าสปีชีส์ มีหอยน้ำจืดฝาเดียวเกือบ 300 สปีชีส์ สองฝาเกือบถึง 100 สปีชีส์ และมีหอยทากบกอีกเกือบ 300 สปีชีส์ รวมกันแล้วเกือบถึง 1,000 สปีชีส์ คิดเป็นไม่ถึงหนึ่งเปอร์เซ็นต์ของที่มีการสำรวจพบแล้วทั้งโลก ซึ่งไม่น่าจะเป็นไปได้ อย่างไรก็ตามประเทศไทยแม้ว่า สผ. จะเป็น focal point ของอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ (CBD) แต่ก็ไม่มีข้อมูลของทรัพยากรใดที่มีความสมบูรณ์ในเรื่องของข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ในการบริหารจัดการทรัพยากรชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิผล เกิดประโยชน์สูงสุดแก่ประชาชนชาวไทย

หอยมีความสัมพันธ์กับมนุษย์มาเนิ่นนานทั้งในทางวัฒนธรรม ศาสนา และเศรษฐกิจ ด้วยลักษณะของรูปทรง สีสัน ลวดลาย ที่มีความจำเพาะ ได้กลายเป็นที่ดึงดูดมนุษย์ให้เข้ามาหาตั้งแต่ยุคก่อนประวัติศาสตร์ หอยถูกใช้เป็นเครื่องประดับ ได้แก่เครื่องประดับมุก ใช้เป็นเครื่องมือต่างๆ ใช้แทนเงินตรา และยังนำมาเป็นอาหาร นอกจากนั้นยังนำโครงสร้างของเปลือกหอยมาออกแบบโครงสร้างต่างๆ ในทางตรงกันข้ามหอยหลายสปีชีส์นำปัญหามาสู่มนุษย์ทั้งโดยตรงและโดยอ้อม ได้แก่การเป็นโฮสท์กึ่งกลางให้กับพยาธิหลายสปีชีส์ "พยาธิใบไม้ตับที่มีรายงานว่าประเทศไทยขณะนี้มีผู้ติดเชื้อมากที่สุดในโลก มีหอยขมขนาดเล็กสกุล *Bythinia* เป็นโฮสท์กึ่งกลางก่อนจะเข้าปลาแล้วมาสู่คน" หอยทากหลายสปีชีส์ทำลายพืชผลทางการเกษตรเช่น หอยเล็บ *Succinea tenella* ทำลายกล้วยไม้ หอยทากอาฟริกัน *Achatina fulica* ทำลายพืชผลการเกษตรหลายชนิด หอยมะระ *Thais* spp. ทำลายหอยนางรมในฟาร์มเลี้ยง รวมถึงหอยเจาะอีกหลายสปีชีส์ที่ทำลายหอยในฟาร์ม หอยเชอรี่ *Pomacea canaliculata* ทำลาย

ต้นกล้าของข้าว หอยเพรียง *Limnoperna, Dressiana polymorpha* เข้าไปอุดตันในท่อระบายน้ำต่างๆ เกาะสะสมในเครื่องปั่นกระแสไฟฟ้าในเขื่อนไฟฟ้าพลังน้ำทำให้ไม่สามารถทำงานได้ เหล่านี้ล้วนมีผลกระทบทั้งเชิงบวกและลบต่อประชาชนโดยตรง

การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะสร้างงานวิจัยพื้นฐานของหอย พร้อมการจัดการฐานข้อมูลสำหรับสร้างโมโนกราฟหอยของประเทศไทยในระยะแรก ก่อนที่จะเข้าสู่การใช้ประโยชน์จากหอยอย่างมีประสิทธิภาพ เป้าหมายที่สำคัญอีกประการหนึ่งของการวิจัยหอยครบวงจรในครั้งนี้คือ การจัดตั้งศูนย์ความเป็นเลิศการวิจัยทางด้าน “หอย” ของภูมิภาค ทั้งนี้ขอบเขตของการวิจัยจะมุ่งเน้นการวิจัยพื้นฐานตั้งแต่อนุกรมวิธาน ซิสเทมาติคส์ พันธุศาสตร์ประชากร นิเวศวิทยา โดยมุ่งวิจัยในหอยทะเล หอยน้ำจืดและหอยทากบก ในระบบนิเวศที่หลากหลายของประเทศไทย เน้นกลุ่มที่นักวิจัยมีความชำนาญก่อนในระยะแรกแล้วจึงค่อยๆ สร้างผู้เชี่ยวชาญที่เป็นคนไทยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อทำการศึกษาวิจัยพื้นฐานและต่อยอด ในสัตว์จำพวกหอยของประเทศไทย
2. เพื่อจัดทำโมโนกราฟของหอยกลุ่มต่างๆ ของไทย สำหรับใช้ในการบริหารจัดการทรัพยากรชีวภาพของหอยไทย
3. เพื่อเป็นแนวทางในการจัดตั้งศูนย์การวิจัยหอยแห่งชาติ

บทที่ 2
สอบสวนเอกสาร

เนื่องจากหอยเป็นสัตว์ที่มีความลากหลายมาก มีบทบาทต่อทั้งในเชิงวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เศรษฐกิจ การสาธารณสุข นิเวศวิทยาและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการประมวลผลงานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับสัตว์จำพวกหอย โดยเฉพาะงานวิจัยพื้นฐานที่ใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการบริหารจัดการทรัพยากรหอยซึ่งแบ่งออกได้เป็น 4 ด้านหลักๆ ดังนี้

2.1 ด้านอนุกรมวิธานและความหลากสปีชีส์ของหอย

สัตว์จำพวกหอยและหมึก (Phylum Mollusca) เป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายสปีชีส์มาก ปัจจุบันการจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานแบ่งสัตว์จำพวกหอยออกเป็น 7 กลุ่มด้วยกัน โดยหอยกลุ่มหลักได้แก่ หอยฝาเดียว (Gastropoda) หอยสองฝา (Bivalvia) และหมึก (Cephalopoda) ที่เหลือเป็นหอยพวกที่มีจำนวนสปีชีส์ไม่มากนัก ทั้งนี้หอยฝาเดียวมีจำนวนสปีชีส์มากที่สุดประมาณ 70% หอยสองฝาประมาณ 10% และพวกหมึกประมาณ 5% ของความหลากหลายของสัตว์จำพวกหอยที่เป็นที่รู้จักแล้วในปัจจุบัน มีการประมาณว่าทั่วโลกมีสัตว์จำพวกหอยซึ่งเป็นที่รู้จักแล้วประมาณ 80,000-100,000 สปีชีส์ โดยความเป็นจริงสัตว์จำพวกหอยอาจมีความหลากสปีชีส์สูงถึงประมาณ 150,000-200,000 สปีชีส์ หากได้รับการสนใจและศึกษาอย่างจริงจัง (Bogan, 2008; Strong et al., 2008; Pearson and Boyero, 2009)

หากกล่าวถึงในโลกของความหลากหลายทางชีวภาพแล้ว หอยเป็นสัตว์ที่มีความหลากหลายมาก ประกอบกับตำแหน่งที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของประเทศไทย อยู่ในตำแหน่งที่เรียกว่าเป็น 'Hotspot of Molluscs Diversity' (Bogan, 2008; Strong et al., 2008) และมีชัยภูมิที่เหมาะสมในเรื่องของความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์จำพวกหอย อย่างไรก็ตามองค์ความรู้ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับทรัพยากรความหลากหลายของหอยในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณทรัพยากรที่มีอยู่จริงในปัจจุบัน โดยจากการรวบรวมรายชื่อของสัตว์จำพวกหอยและหมึกที่พบในประเทศไทยของ สผ. และ Panha and Burch (2005) ได้รวบรวมรายชื่อไว้ทั้งสิ้นประมาณ 3,000 สปีชีส์ เท่านั้น แต่จากรายงานการคาดการณ์สถานภาพของสัตว์จำพวกหอยในปัจจุบันพบว่าประมาณ 70% พบการแพร่กระจายอยู่ในเขตอบอุ่นและแนวเส้นศูนย์สูตร (Bogan, 2008; Strong et al., 2008; Pearson and Boyero, 2009) ดังนั้นความหลากสปีชีส์ของสัตว์จำพวกหอยในประเทศไทยทั้งหอยทากบก หอยทะเล หอยน้ำจืด และหมึกต่างๆ น่าจะอยู่ที่ประมาณ 8,000-10,000 สปีชีส์ เป็นที่สังเกตว่าในช่วงระยะเวลาประมาณ 20 ปีที่ผ่านมา หลังจากที่เทคนิคทางชีวโมเลกุลพัฒนาไปมาก จะมีอัตราการค้นพบสัตว์จำพวกหอยเพิ่มขึ้นทุกปี แต่ประเทศไทยเองจะเห็นว่ามีอัตราการค้นพบหอยในอัตราค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับประเทศฟิลิปปินส์ นิวกินี และ มาดากัสกา (Graf and Cummings, 2009) ซึ่งมีอัตราการค้นพบหอยสูงอยู่ในระดับต้นของโลก แสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีทรัพยากรของหอยที่มีศักยภาพในเรื่องความหลากหลาย

ของสัตว์จำพวกหอยแต่ยังขาดการศึกษาอย่างจริงจัง ซึ่งทรัพยากรอันสำคัญเหล่านี้ควรได้รับการจดบันทึกและศึกษาก่อนที่หอยเหล่านี้จะสูญพันธุ์ไป

ความรู้ทางด้านชีววิทยาเกี่ยวกับสัตว์จำพวกหอยในประเทศไทยมีอยู่อย่างจำกัดทั้งที่ประเทศไทยมีความหลากสปีชีส์ของหอยมากมาย เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศอังกฤษและประเทศในแถบยุโรปเหนือซึ่งเป็นประเทศที่วิทยาการทางด้านต่างๆ มีความเจริญอย่างที่สุด พบว่ามีสัตว์จำพวกหอยและหมึกเพียง 2,500-4,000 สปีชีส์เท่านั้น (Kerney and Cameron, 1979) ซึ่งสปีชีส์ส่วนใหญ่ได้รับความสนใจในการสำรวจและศึกษาในแง่มุมต่างๆ อย่างละเอียดครบถ้วนและสมบูรณ์ หรือในกรณีของหอยสองฝาน้ำจืด ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีความหลากสกุลของหอยกาบน้ำจืด (47 สกุล 150 สปีชีส์) (Brandt, 1974) ใกล้เคียงกับประเทศ สหรัฐอเมริกา และแคนาดา ที่มี (51 สกุล 351 สปีชีส์) (Bogan, 2008; Bogan and Roe, 2008) แม้ว่าการศึกษาเกี่ยวกับหอยน้ำจืดของประเทศไทยและภูมิภาคจะหยุดนิ่งมาเป็นระยะเวลายาวนาน ซึ่งแม้ว่าองค์ความรู้ทางด้านความหลากหลายของหอยในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จะมีอยู่อย่างจำกัด ก็ยังมีจำนวนชนิดพันธุ์ของหอยมากกว่าประเทศในแถบยุโรปเหนือถึง 2 เท่า และมีปริมาณหอยกาบน้ำจืดในระดับสกุลใกล้เคียงกับประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนนาดา หากมีการศึกษาอย่างจริงจังก็น่าจะมีความหลากสปีชีส์ของหอยกาบน้ำจืดในระดับสปีชีส์ใกล้เคียงกัน (Pearson and Boyero, 2009)

การศึกษาเกี่ยวกับความหลากสปีชีส์ของหอยในประเทศไทยโดยคนไทยนั้น มีประวัติค่อนข้างสั้นเพียง 50-60 ปี โดยได้รวบรวมรายชื่อของสัตว์จำพวกหอยไว้ในปี ค.ศ. 1938 หรือ พ.ศ. 2481 (Suvathi, 1938) แต่เนื่องจากเป็นงานในระยะแรกๆ ไม่ได้มีการเก็บตัวอย่างไว้เป็นหลักฐาน จึงยังให้การศึกษาในระยะแรกมีข้อสงสัยอยู่มาก ต่อมากลุ่มของหอยน้ำจืดในประเทศไทยได้รับการศึกษาโดยชาวเยอรมัน (Brandt, 1974) โดยได้รวบรวมตัวอย่างหอยน้ำจืดทั้งหอยฝาเดียวและหอยสองฝาไว้มากกว่า 500 สปีชีส์ หลังจากนั้นการศึกษาเกี่ยวกับความหลากสปีชีส์ของสัตว์จำพวกหอยทากบกจึงได้เริ่มต้นขึ้น (Panha, 1996; Panha and Burch, 2005) ซึ่งได้รวบรวมตัวอย่างหอยทากบกและรวบรวมรายชื่อไว้มากกว่า 200 สปีชีส์ สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับหอยทะเลกระจัดกระจายอยู่พอสมควรเช่น Habe (1964) และ Abbott (1998) เป็นต้น หากเป็นการศึกษาโดยชาวต่างชาติแล้ว ส่วนมากจะเป็นผลงานของนักสัตววิทยาชาวตะวันตกเช่น อังกฤษ เนเธอร์แลนด์ เบลเยี่ยม ฝรั่งเศส เยอรมัน และสหรัฐอเมริกา โดยเฉพาะประเทศเพื่อนบ้านที่มีพื้นที่ต่อกับประเทศไทย และตกเป็นอาณานิคมของชาติตะวันตกต่างๆ ได้ศึกษาตัวอย่างจากพวกมิชชันนารีและพ่อค้าเดินเรือรวมทั้งทหาร ที่เดินทางเข้ามาในประเทศไทย จึงทำให้หอยจากดินแดนสยาม เริ่มเป็นที่รู้จักและเกิดเป็นองค์ความรู้เรื่องของสปีชีส์

สัตว์จำพวกหอยมีความสามารถในการที่จะอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลายเช่น ตั้งแต่ก้นทะเลลึกจนถึงยอดเขาสูง พื้นที่ชุ่มชื้นจนถึงพื้นที่แห้งแล้งแถบทะเลทราย คนส่วนใหญ่รู้จักหอยเป็นอย่างดี เช่น พวกหอยฝาเดียว หอยสองฝา และหมึก ซึ่งความเป็นจริงแล้วสัตว์จำพวกหอยอยู่คู่กับสังคมไทยมาเป็นเวลายาวนาน และมีความเกี่ยวโยงกับชีวิตประจำวันของคนไทยทั้งทางตรงและทางอ้อม ไม่มากก็น้อย เป็นการยากที่จะปฏิเสธความสัมพันธ์ดังกล่าว ไม่ว่าจะใช้เป็นอาหาร หรือผลผลิตจากหอยในรูปแบบต่างๆ เช่น เครื่องสำอาง เครื่องประดับ หรือเรื่องของการสาธารณสุข แม้กระทั่งหอยก็เข้ามามี

บทบาทในทางวัฒนธรรม จริยธรรม เช่น การใช้ประโยชน์จากเปลือกหอยมาสร้างสรรค์งานอันมีคุณค่าที่เกี่ยวเนื่องกับพระพุทธศาสนา ใช้ในการแลกเปลี่ยนสินค้า การสั่งสอนจริยธรรมของคนไทยผ่านนิทานพื้นบ้าน เป็นต้น

ด้วยสภาพเศรษฐกิจที่ถดถอยอย่างในปัจจุบัน ทำให้คนไทยพยายามลดการพึ่งพาทรัพยากรจากแหล่งภายนอกประเทศ เข้าหาแหล่งทรัพยากรภายในประเทศกันมากขึ้น จึงทำให้หลายฝ่ายเริ่มให้การเอาใจใส่กับฐานทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศ ซึ่งสัตว์จำพวกหอยหลายกลุ่มสามารถเข้ามามีบทบาทได้ เช่น กลุ่มหอยเป๋าฮื้อ หอยนางรม หอยแครง หมึกต่างๆ และหอยทากบกบางสปีชีส์ ที่มีศักยภาพในการนำมาเพาะเลี้ยงและพัฒนาไปในทิศทางของผลิตภัณฑ์อาหารที่จะสอดคล้องกับแนวคิดของไทยในเรื่องครัวไทยสู่ครัวโลก อีกทั้งมีหอยหลายกลุ่มที่สามารถนำมาสร้างมูลค่าเพิ่มได้ เช่น กลุ่มหอยมุกต่างๆ สามารถส่งเสริมการพัฒนาและทำผลิตภัณฑ์จากหอยมุก เป็นต้น

2.2. ด้านความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พันธุศาสตร์ประชากร และเซลล์พันธุศาสตร์

2.2.1 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

จากการศึกษาครั้งแรกในเรื่องของความหลากหลายของเปลือกหอยภายในสปีชีส์เดียวกันในยุคที่การศึกษาวิวัฒนาการและการคัดเลือกทางธรรมชาติเป็นที่รู้จักเมื่อประมาณ 100 ปีก่อน สัตว์กลุ่มหอยได้มีการศึกษาเรื่อยมาจนกระทั่งเป็นตัวอย่างต้นแบบที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ในเรื่องของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในระหว่างประชากร (Davison, 2002) โดยเฉพาะงานตีพิมพ์ของ Cain and Sheppard ในปี 1950 ได้พบการคัดเลือกทางธรรมชาติจากผู้ล่าทำให้หอยแต่ละประชากรมีลักษณะที่แตกต่างกัน หอยจัดเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความเหมาะสมในการศึกษาทางด้านความแตกต่างระหว่างประชากรและการเกิดสปีชีส์ใหม่ ทั้งนี้เนื่องจากหอยเป็นสัตว์ที่มีความจำกัดในการอพยพเคลื่อนย้าย มีการออกลูกหลานได้มากและหลายครั้งต่อปี มีขนาดประชากรธรรมชาติค่อนข้างใหญ่ จึงทำให้พบหลักฐานการเกิดวิวัฒนาการได้ในช่วงเวลาที่ไม่นานนักเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความเหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาและทางพันธุกรรมเพื่อนำไปสู่ความเข้าใจและเป็นพื้นฐานในการเกิดวิวัฒนาการ ที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น (Cain and Sheppard, 1950, 1952, 1954)

ประชากรสิ่งมีชีวิตที่อยู่อาศัยในแหล่งที่อยู่อาศัยที่ถูกแบ่งแยกหรือถูกตัดขาดจากถิ่นที่อยู่อาศัยใกล้เคียง (Isolated habitat) เป็นเวลานาน มักจะมีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างไปจากประชากรอื่นๆ ไม่มีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมระหว่างประชากร และมีกลไกทางธรรมชาติผลักดันให้เกิดสปีชีส์ใหม่ในที่สุด การที่ประชากรของสิ่งมีชีวิตถูกแบ่งแยกจากประชากรอื่นๆ อาจทำให้มีความหลากหลายสูงขึ้นเนื่องจากสามารถใช้ถิ่นอาศัยได้หลายรูปแบบมากขึ้น และมีปริมาณแหล่งที่อยู่อาศัยเพิ่มขึ้น (Woodruff and Solem, 1990) หรือประชากรดังกล่าวอาจประสบกับสภาวะเสื่อมโทรมของความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากประชากรมีขนาดเล็ก มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำและการผสมพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต ความเป็นอยู่ ความสามารถในการอพยพเคลื่อนย้าย รูปแบบการผสมพันธุ์ พฤติกรรม ช่วงชีวิต ความถี่ในการออกลูกหลาน จำนวน

ลูกหลาน และรูปแบบการแบ่งแยกของแหล่งที่อยู่อาศัย จากการศึกษาในหอยทากบกหลายสปีชีส์พบหลักฐานการเกิดความหลากหลายของลักษณะต่างๆ เช่น รูปร่างของเปลือก รูปแบบของแถบสีบนเปลือก หรือลักษณะทางโมเลกุลอื่น ๆ ในหอยทากที่มีถิ่นอาศัยที่แตกต่างกัน (Chiba, 1999) อย่างไรก็ดีผลกระทบของการสูญเสียถิ่นที่อยู่อาศัยไปอย่างรวดเร็ว อาจส่งผลกระทบให้ประชากรหอยทากบกเหล่านี้สูญพันธุ์ไปได้

ปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่เรียกว่า phylogenetic relationship ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายกับนักอนุกรมวิธานและซิสเทมาติกส์ มักจะนำมาใช้ในแง่ของการช่วยในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของลักษณะในระดับโมเลกุลและสัณฐานวิทยาของเปลือก และเน้นการเชื่อมโยงทางวิวัฒนาการของหอยกลุ่มอื่นๆ (Liu and Hershler, 2005; Wade et al., 2006; Bunje and Lindberg, 2007) เพื่อนำไปสู่การจัดจำแนกที่ใกล้เคียงกับการเกิดทางธรรมชาติมากที่สุด สำหรับในประเทศไทยมีการศึกษาทางด้านนี้อยู่บ้าง แต่เน้นกลุ่มหอยต้นไม้ และหอยทากจิ๋ว (Sutcharit et al., 2007; Tongkerd et al., 2004) ส่วนในหอยกลุ่มอื่นๆ นั้นยังมีการศึกษาน้อย นอกจากการศึกษาทางด้านความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจะเป็นประโยชน์สำหรับงานทางด้านอนุกรมวิธานและซิสเทมาติกส์แล้ว ยังสามารถนำไปใช้ในเรื่องการสืบประวัติการกระจายตัวของสิ่งมีชีวิตที่เชื่อมโยงกับข้อมูลทางภูมิศาสตร์ ทำให้สามารถทำนายเหตุการณ์ทางภูมิศาสตร์ในอดีตและสามารถบอกลักษณะของการกระจายตัว โดยใช้หอยเป็นโมเดลในการศึกษาได้อีกด้วย เนื่องจากหอยมีคุณสมบัติในเรื่องของความจำกัดในการอพยพเคลื่อนย้าย วงชีวิตสั้น การออกลูกหลานมาก และขนาดของประชากรที่มีขนาดใหญ่ดังที่กล่าวข้างต้น (Hausdorf and Hennig, 2006; Parmakelis and Mylonas, 2004) นอกจากนี้ในด้านของการอนุรักษ์ทรัพยากรและการวางแผนการจัดการทรัพยากรสามารถนำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของหอยไปเป็นข้อพิจารณาในการอนุรักษ์พื้นที่ โดยเฉพาะแนวเขาหินปูนที่มีความหลากหลายของสปีชีส์หอยสูง อีกทั้งยังเป็นบริเวณสำคัญในการที่มนุษย์จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ที่เป็นประโยชน์มากมาย ทำให้สามารถเลือกพื้นที่ที่จะอนุรักษ์หรือใช้ประโยชน์ได้อย่างมีหลักการและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น (Clement et al., 2008) ดังประโยชน์ที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนี้ ทำให้เห็นถึงความสำคัญของการศึกษาวิวัฒนาการของกลุ่มหอยที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อมนุษย์ และเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ๆ และสามารถปะติดปะต่อเรื่องราวจากอดีตถึงปัจจุบัน และเห็นภาพรวมเพื่อนำไปเป็นพื้นฐานของการศึกษาในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ต่อไปได้

2.2.2 พันธุศาสตร์ประชากร

หอยทากบก (land snail) และทาก (slug) เป็นสัตว์ที่อยู่ในอันดับเดียวกัน ส่วนหอยทากน้ำจืดนั้นอยู่คนละอันดับ แต่ทั้งหมดนี้อยู่ในพวกหอย สัตว์จำพวกนี้มีบทบาทในการช่วยทำให้ธรรมชาติมีความสมดุลย์ ทั้งในด้านการผลิตฮิวมัส การย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ การควบคุมปริมาณสาหร่าย เชื้อราและตะไคร่ เป็นทั้งผู้ล่า และพยาธิ และในขณะเดียวกันก็เป็นอาหารของผู้ล่าอื่นๆ ด้วยสัตว์พวกหอยมีความสำคัญในด้านการศึกษาทางการแพทย์ และสัตวแพทย์ เพราะเป็นโฮสต์กึ่งกลางของปรสิตหลายชนิด ที่ทำให้เกิดโรคในคน หรือในสัตว์ อีกทั้งยังมีความสำคัญในด้านการเกษตรและการเพาะเลี้ยงเพื่อ

การส่งออกสร้างความเข้มแข็งให้กับเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย นอกจากนี้หอยยังได้รับการพิจารณาให้เป็นตัวอย่างที่ดีและเหมาะสมในหลายๆ ด้านเพื่อนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์บริสุทธิ์และประยุกต์ เช่น การมีความหลากหลายของเปลือก ไม่ว่าจะเป็นขนาด รูปร่าง สีหรือจำนวนของแถบสีบนเปลือก ทำให้หอยทากบกถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ประชากร และกลไกการเกิดวิวัฒนาการ อย่างแพร่หลาย (Komai and Emura, 1955) ซึ่งตัวอย่างที่รู้จักกันดีในตำราเรียนก็คือหอยทากบนในยุโรป *Cepaea nemoralis* (Cain and Sheppard, 1950, 1954) นอกจากนี้ยังมีหอยทากบกอีกหลายชนิดที่ถูกนำมาศึกษาในเรื่องดังกล่าว เช่น หอยทากในสกุล *Partula* และสกุล *Bradybaena* (Komai and Emura, 1955; Asami, and Ohba, 1982) นอกจากนี้การที่ หอย มีช่วงชีวิตที่สั้น มีขนาดเล็ก หาได้ง่าย จึงเหมาะและสะดวกต่อการนำมาเพาะเลี้ยงและผสมพันธุ์ในห้องทดลองเพื่อใช้ในการทดสอบสมมติฐานทางด้านวิวัฒนาการเป็นอย่างดี โดยเฉพาะการศึกษาการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ การผสมข้ามพันธุ์ และกระบวนการเกิดสปีชีส์ใหม่ (Dillon et al., 2004; Giokas et al., 2006; Weerd de et al., 2006; Wiwegweaw et al., 2009; ถึงแม้หอยจะถูกนำมาใช้เป็นตัวอย่างเพื่อศึกษาในเรื่องต่างๆ มากมาย แต่ทว่าการศึกษา หอย ประเทศไทยนั้นยังมีน้อยมากหรือแทบไม่มีเลยเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศที่พัฒนาแล้ว ซึ่งปัญหาหลักประการหนึ่งก็คือการขาดองค์ความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์และเทคนิคใหม่ ๆ ในการวิเคราะห์ผลให้มีความถูกต้องและมีความแม่นยำ

การที่หอยเป็นสัตว์ที่มีการเคลื่อนที่ช้า มีข้อจำกัดในการกระจายตัว และการดำรงชีวิตโดยรวมขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมเป็นหลัก ทำให้หอยโดยเฉพาะในกลุ่มของหอยทากบก แสดงความหลากหลายทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและพันธุกรรมค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ชนิดอื่นที่มีความสามารถในการกระจายตัวที่ดีกว่า ซึ่งผลดังกล่าวทำให้เกิดความสับสนและความไม่ชัดเจนในการจัดจำแนกและระบุชนิดของหอยโดยวิธีการดั้งเดิมซึ่งอาศัยลักษณะภายนอกเป็นหลักในการจำแนกและระบุสปีชีส์ ซึ่งสาเหตุหลักก็คือการที่ไม่สามารถแยกแยะได้ว่าความแตกต่างที่เกิดขึ้นนั้นเป็นการแสดงถึงความแตกต่างของหอยภายในสปีชีส์เดียวกันหรือต่างสปีชีส์กัน จึงทำให้หอยหลายชนิดมักถูกนำมาศึกษาโดยละเอียดใหม่อีกครั้งเพื่อทบทวนความถูกต้องและแม่นยำในการจัดจำแนกหรือระบุชื่อ ปัจจุบันการมีเทคโนโลยีที่ทันสมัยและก้าวล้ำทางด้านชีววิทยาโมเลกุล ทำให้การศึกษาทางชีววิทยาไม่ใช่เรื่องยากและลำบากอีกต่อไป ดังจะเห็นได้ว่าประเทศที่พัฒนาแล้วหลายประเทศได้ทำการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลทั้งในระดับโปรตีนและดีเอ็นเอของหอยหลายชนิดเพื่อกำหนดขอบเขตสปีชีส์ และใช้ประโยชน์จากข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้ออกแบบเครื่องหมายสำหรับระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต (DNA barcoding) ดังนั้นเพื่อเพิ่มความแม่นยำและถูกต้องในการกำหนดขอบเขตสปีชีส์ จึงจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและชีววิทยาโมเลกุลประกอบควบคู่กันไป

2.2.3 เซลล์พันธุศาสตร์

เซลล์พันธุศาสตร์เป็นการศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมอันเป็นโครงสร้างทางพันธุกรรม และเป็นที่อยู่ของสารพันธุกรรม โดยโครโมโซมทำหน้าที่เก็บรักษา ถ่ายทอด และแสดงออก ของข้อมูลพันธุกรรม (Clark and Wall, 1996) ในเซลล์ปกติจำนวนและรูปร่างของโครโมโซมในสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ จะคงที่เสมอ

และแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ดังนั้นหากโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไป ย่อมส่งผลต่อสารพันธุกรรมหรือยีนและทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนไปในที่สุด โดยการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมสามารถเกิดได้สองรูปแบบที่สำคัญคือ จำนวนโครโมโซมหรือโครงสร้างของโครโมโซมซึ่งสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม และความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต และมีความหลากหลายทางชีวภาพในที่สุด

การศึกษาโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตนอกจากเป็นความรู้ทางวิชาการแล้วยังมีการนำความรู้เกี่ยวกับโครโมโซมไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น การเกษตรเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ การแพทย์เพื่อตรวจหาโรคทางพันธุกรรมอันเกิดจากความผิดปกติบนโครโมโซม นอกจากนี้ยังใช้ในการติดตามผลกระทบของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนและโครงสร้างของโครโมโซม รวมถึงการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ

จากบรรพบุรุษเริ่มแรกโครโมโซมอาจมีเพียงรูปแบบเดียวหรือแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย เมื่อวิวัฒนาการมาจนปัจจุบันพบว่า สัตว์กลุ่มหอยมีรูปแบบแตกต่างกันเพิ่มมากขึ้นอันเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมหรือมิวเตชัน รวมกับขบวนการคัดเลือกโดยธรรมชาติ โดยมิวเตชันเกิดได้สองรูปแบบ คือเกิดการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอในนิวคลีโอไทด์อันส่งผลให้การทำงานของยีนเปลี่ยนไป และเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม หรือเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของยีนบนโครโมโซม

การสำรวจและศึกษาสัตว์กลุ่มหอยในประเทศไทยมีรายงานน้อยมากและมีรายงานการค้นพบเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ นอกจากนี้ยังพบว่าอนุกรมวิธานของหอยมีความซับซ้อนและข้อมูลยังสับสน เนื่องจากลักษณะภายนอกของเปลือกมีความผันแปรทั้งขนาด สีและลวดลาย อีกทั้งลักษณะภายใน แผงฟัน (radula) และระบบสืบพันธุ์ไม่สามารถใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ได้ชัดเจน ดังนั้นเพื่อให้งานอนุกรมวิธานถูกต้องสมบูรณ์จึงควรมีการศึกษาโครงสร้างอื่นเพิ่มเติมเช่น การศึกษาโครงสร้างโครโมโซม โปรตีน หรือลำดับเบส เพื่อให้งานทางอนุกรมวิธานมีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

การศึกษาโครโมโซมในหอยที่ผ่านมามีรายงานน้อยมาก โดยเฉพาะในประเทศไทย การเตรียมโครโมโซมในสัตว์แต่ละสปีชีส์ใช้หลักการเดียวกัน แต่อาจมีการปรับสภาวะให้เหมาะกับสัตว์แต่ละสปีชีส์เพื่อให้ได้โครโมโซมที่กระจายตัว และทำให้การวิเคราะห์โครงสร้างโครโมโซมมีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น การศึกษาโครโมโซมในหอยฝาเดียวมีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากการรวบรวมข้อมูล ในปี ค.ศ. 1985 มีรายงานการศึกษาคาริโอไทป์ในหอยสองฝา และลิ่นทะเล และ มีรายงานการศึกษาจำนวนโครโมโซมในหอยฝาเดียวจำนวนทั้งสิ้น 291 สปีชีส์ โดยจำนวน 243 เป็นรายงานใหม่ มีการวิเคราะห์คาริไทป์จำนวน 207 สปีชีส์ และมีรายงานการศึกษาการย้อมแถบสีโครโมโซมจำนวน 27 สปีชีส์

การศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการโดยอาศัยข้อมูลและหลักฐานจากจำนวนโครโมโซมในหอยกลุ่มที่หายใจด้วยปอด มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง n = 17 ถึง n = 33 ส่วนหอยพวกที่มีปอดโบราณพวก Basommatophoran มีจำนวนโครโมโซมน้อย (n = 17-18) และมีค่าน้อยกว่าหอยทากบกที่มีวิวัฒนาการสูงกว่าพวก Stylommatophoran ที่มีความผันแปรและจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง (n = 21-33) ส่วนหอยจำนวนสองวงศ์ ได้แก่ Bradybaenidae (n = 28-33) และ Helicidae (n = 21-30)

Stylommatophora มีสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาเป็นแบบเชิงเดี่ยว โดยสนับสนุนด้วยข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์ (Wade et al., 2001) และข้อมูลจำนวนโครโมโซมของหอยแต่ละวงศ์มีหลากหลายมาก

การรวมรวมข้อมูลเพื่อใช้ประโยชน์ในการอธิบายความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการต้องพิจารณาอย่างรอบคอบ เนื่องจากองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษามีความหลากหลายน่าค้นหาและแตกต่างกันในหอยแลกลุ่ม นักวิทาศาสตร์บางคน เช่น Patterson และ Burch (1978) ระบุว่าจำนวนโครโมโซมของมอลลัสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่นักวิทยาศาสตร์หลายคน กลับมีความเห็นว่าวิวัฒนาการโครโมโซมมีแนวโน้มลดลง จากการรวบรวมข้อมูลจำนวนโครโมโซมในครั้งนี้ จากหอยพวก Archaeogastropoda ถึง Neogastropoda มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น ขณะที่จำนวนโครโมโซมของพวก Opisthobranchia มีแนวโน้มลดลง ขณะที่ในหอยบางกลุ่มไม่มีวิวัฒนาการของจำนวนโครโมโซม โดยหอยที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน มักแสดงค่าคงที่ของจำนวนโครโมโซม เช่น Dipplommatinidae (2n = 26)

จากรายงานการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ในหอยฝาเดียวอย่างน้อย 291 สปีชีส์ และ 207 สปีชีส์รายงานคาริโอไทป์ 27 สปีชีส์ศึกษาการย้อมแถบสีโครโมโซม ทำให้ความรู้ทางโครงสร้างโครโมโซมมีเพิ่มมากขึ้นในระยะสามสิบปีที่ผ่านมา โดยพบว่าหอยฝาเดียวที่อยู่วงศ์เดียวกันอาจมีจำนวนโครโมโซมและสูตรคาริโอไทป์เหมือนกัน เช่น Diplommatinidae หรือมีสูตรคาริโอไทป์แตกต่างกันมากใน Pleuroceridae หรือมีสูตรคาริโอไทป์แตกต่างภายในหอยสปีชีส์เดียวกัน เช่น *Haliotis varia* มีคาริโอไทป์แดกต่างกันภายในสปีชีส์ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของความแตกต่างทางภูมิศาสตร์ ซึ่งอธิบายวิวัฒนาการและใช้ประกอบการทำนายการเปลี่ยนแปลงของเปลือกโลกได้ โดยคาริโอไทป์ของหอยฝาเดียวส่วนใหญ่ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด เมตาเซนทริค และซับเมตาเซนทริค มีหอยฝาเดียวเพียง 12 สปีชีส์ที่คาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด ซับทีโลเซนทริค ทีโลเซนทริค ส่วนคาริโอไทป์ของหอยในวงศ์ Cypraeidae มีโครโมโซมเป็นชนิดทีโลเซนทริค และมีหอย 1 สปีชีส์ มีคาริโอไทป์ ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด ซับทีโลเซนทริค และทีโลเซนทริค เท่านั้น

ทฤษฎีการแยกตัวของคาริโอไทป์ของ Kolnicki (2000) สามารถอธิบายอัตราการเกิดความผันแปรของสปีชีส์ของหอยได้โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ และสามารถอธิบายได้จากจำนวนโครโมโซมชนิดทีโลเซนทริค ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดขึ้นในประชากรของสัตว์ได้โดยกระบวนการแยกตัวของโครโมโซม โดยโครโมโซมส่วนหนึ่งเป็นโครโมโซมดั้งเดิม หรือโครโมโซมที่ผ่านการแยกตัวแล้วก็ตามย่อมส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเป็นเท่าตัว หรือแม้ว่าจำนวนโครโมโซมจะเท่าเดิม แต่ทั้งการแยกตัวและการรวมตัวของโครโมโซม จะสามารถก่อ ให้เกิดความหลากหลายของคาริโอไทป์ได้ และมีโอกาสเกิดขึ้นได้โดยอาจเกิดจากการแดกตัวจากโครโมโซมหนึ่งแท่งหรือเกิดจากการรวมกันของโครโมโซมสองแท่ง ซึ่งล้วนส่งผล ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมได้ นอกจากนี้การจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมโดยเฉพาะ pericentric inversion จะเพิ่มโอกาสในการแยกตัวของสารพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ซับซ้อนได้ เนื่องจากการเกิดการแตกหักของโครโมโซมและมีโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริคเกิดขึ้น

2.3 ด้านพิษวิทยาและการสาธารณสุข

หอยทากบกมีความสำคัญในระบบการหมุนเวียนสารอาหาร ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่โดยเฉพาะในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำ เช่น แคลเซียม ซึ่งเป็นสารที่ถูกใช้ในการสร้างเปลือก ในบริเวณมีการหมุนเวียนสารอาหารค่อนข้างต่ำ เช่น ในระบบนิเวศทะเลทราย หอยทากบกกลุ่มที่กินซากและกลุ่มที่กินพืช มักเป็นกลุ่มเด่นก่อนสิ่งมีชีวิตอื่น โดยหอยทากบกที่กินไลเคนเป็นอาหารจะถ่ายมูลที่มีไนโตรเจนปริมาณมากออกสู่ดินซึ่งจะเป็นการช่วยเพิ่มปริมาณของพืชชั้นสูงต่อไป นอกจากนี้หอยทากบกกลุ่มที่บริโภคพืชยังเป็นตัวกำหนดสังคมพืชได้ เช่น หอยทากบกสามารถลดแอมโมเนียมไนโตรเจนและขณะเดียวกันยังเพิ่มปริมาณฟอสเฟตในดินซึ่งจะส่งผลต่อสังคมพืชที่สามารถอยู่ในบริเวณนั้นได้ (Jones and Shachak, 1994)

นอกจากนี้หอยทากบกยังสามารถหมุนเวียนธาตุอื่นๆ ได้แก่ โลหะหนัก เช่น สังกะสี แคดเมียม ทองแดง และ ตะกั่ว เป็นต้น โดยการสะสมในเนื้อเยื่อและเปลือก ดังนั้นหอยทากบกจึงใช้เป็นอีกหลักฐานหนึ่งของการปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม และเป็นตัวการส่งผ่านสารปนเปื้อนจากพืชไปสู่บริโภคพืช (Carter, 1983) และผู้ล่า (Reichardt et al., 1985) เป็นทอดๆไป การศึกษาการสะสมของโลหะหนักในหอยทากบกได้มีการศึกษามากว่า 20 ปีและพบว่าหอยฝาเดียวมีการสะสมของโลหะหนักสูงที่สุดในบรรดา Kingdom สัตว์ การที่หอยทากบกมีการสะสมโลหะมากอาจเนื่องมาจากลำไส้ไม่มีกลไกเพียงพอในการคัดแยกการดูดซึมโลหะหนัก อวัยวะที่มีการสะสมโลหะหนักได้แก่ ต่อมต่างๆ ในระบบย่อยอาหาร (Dallinger, 1993) ซึ่งมีปริมาณมากที่สุด ส่วนอวัยวะอื่นๆ พบปริมาณรองลงมา เช่น เท้า แมนเทิลและลำไส้ เป็นต้น นอกจากโลหะหนักข้างต้นที่กล่าวมา ยังพบรายงานหอยทากบกมีการสะสม DDT ในร่างกาย (Dindal and Wurzinger, 1971) พบสะสมที่ต่อมในระบบย่อยอาหารและระบบสืบพันธุ์ โดยในหอยทากบกพบการสะสมน้อยกว่าในหอยทากลดเปลือก ดังนั้นหอยทากบกจึงเป็นแหล่งส่งผ่านยาฆ่าแมลงไปสู่สัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นได้มีการศึกษาหอยทากบกเพื่อใช้เป็น biological indicator ของสิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษโดยเฉพาะการปนเปื้อนของโลหะหนัก หอยทากบกที่ถูกใช้เป็นตัวชี้วัดสิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ ได้แก่ *Helix pomatia* และ *Cepaea nemoralis* สำหรับตรวจสอบ แคดเมี่ยม ทองแดง สังกะสี และ ตะกั่ว (Dallinger, 1993; Laskowski and Hopkin, 1996)

นอกจากนี้หอยทากบกบางสปีชีส์ถูกใช้เป็น Biomarker ต่อปรอทในสิ่งแวดล้อมโดยการตรวจสอบลักษณะของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายโดยสารพิษด้วยกล้องจุลทรรศน์ อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยด้วยวิธีนี้อาจมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อเนื่อเยื่อของสัตว์ เช่น สารอาหาร อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมและความชื้นเป็นต้น (Marigomez et al., 1996) ดังนั้นในการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ต้องมีการเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายด้วยสารเคมี นอกจากการตรวจลักษณะเนื้อเยื่อที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังสามารถตรวจสอบจากการพบโปรตีนบางตัวที่มีการสร้างขึ้นหลังจากที่เนื้อเยื่อถูกทำลายโดยสารเคมี เช่น stress protein (hsp70 และ hsp60) ซึ่งได้มีการศึกษาใน *Arion ater* (Kohler et al., 1992, 1996)

2.4. ด้านนิเวศวิทยา การอนุรักษ์ และผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม

เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นที่มีป่าอุดมสมบูรณ์และมีถิ่นอาศัยที่หลากหลาย ทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยเฉพาะสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มหอย ด้วยความที่มีความ

หลากหลายสูงและมีความจำเพาะถิ่นนี้เอง จึงมีส่วนสำคัญในการปกป้องชนิดพันธุ์ต่างถิ่นได้เป็นอย่างดี (Kolar and Lodge, 2001) จากรายงานชนิดพันธุ์ต่างถิ่นในประเทศไทยใน Global Invasive Species Database พบว่ามีชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่เป็นกลุ่มหอยอยู่ 2 สปีชีส์ คือหอยทากยักษ์แอฟริกัน *Achatina fulica* และหอยเชอรี่ *Pomacea canaliculata* และได้มีรายงานเพิ่มเติมในสวนกล้วยไม้ว่ามีหอยข้าวสาร *Lamellaxis gracilis* เข้าไปรบกวน และล่าสุดได้มีรายงานพบว่าหอยกลุ่มเดียวกับหอยม้าลาย *Mytilopsis adamsi* ที่เป็นปัญหาทั่วโลก ได้พบระบาดบริเวณอ่าวไทยแล้ว (Wangkulangkul and Lheknim, 2008) ถึงแม้ว่าประเทศไทยจะมีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตสูงและสามารถป้องกันการอยู่รอดของชนิดพันธุ์ต่างถิ่นได้ระดับหนึ่ง แต่หากมีการนำเข้ามาแบบซ้ำๆ หลายครั้ง นอกจากจะทำให้จำนวนประชากรของชนิดพันธุ์ต่างถิ่นมากขึ้นแล้ว ยังเป็นการเปิดโอกาสให้ชนิดพันธุ์เหล่านั้น เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมและสามารถครอบคลุมถิ่นอาศัยของชนิดพันธุ์ท้องถิ่นได้ดีขึ้นจนนำไปสู่การสูญพันธุ์ได้อีกด้วย (Facon et al., 2008) นอกจากนี้การศึกษาชนิดพันธุ์ต่างถิ่นพวกหอยในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก ชนิดพันธุ์ที่เป็นปัญหาใหญ่อยู่ในปัจจุบันมักถูกนำเข้ามาโดยหวังผลทางเศรษฐกิจ นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อบริโภค เช่นหอยทากยักษ์แอฟริกัน (Upatham et al., 1988) และหอยเชอรี่ (Keawjam and Upatham, 1990) ซึ่งนำความเสียหายให้กับเกษตรกรในประเทศไทยเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะนาข้าวอันเป็นเส้นเลือดหลักของสินค้าส่งออกของประเทศไทย เกษตรกรต้องใช้สารเคมีที่มีราคาแพงเพื่อทำลายหอย ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น การศึกษาเกี่ยวกับชนิดพันธุ์ต่างถิ่นในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นในการทำลายโดยชีววิธี เช่น การใช้หนอนตัวกลม (Tesana et al., 2008) เพื่อลดการใช้สารเคมี แต่ชีววีธีที่มีอยู่มักได้ผลในระยะสั้นจึงต้องมีการศึกษาในแง่อื่นๆ ประกอบ เช่น การศึกษาถึงโครงสร้างทางพันธุกรรม นิเวศวิทยา พฤติกรรมและชีววิทยาของหอยต่างถิ่นเหล่านี้ อีกทั้งในแง่ของการเฝ้าระวังการระบาดของชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่ยังไม่มีการศึกษาในประเทศไทยเมื่อเทียบกับประเทศที่พัฒนาแล้ว (Temple et al., 2004) ทำให้สามารถจัดการและอนุรักษ์ทรัพยากรท้องถิ่นได้อย่างยั่งยืนต่อไป

บทที่ 3
วิธีการศึกษา

3.1. แนวทางในการดำเนินโครงการ

ศึกษาหอยทากบก หอยฝาเดียวน้ำจืด และหอยสองฝา จากตัวอย่างอ้างอิงและตัวอย่างต้นแบบที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยาต่างๆ ทั่วประเทศไทย และเก็บรวบรวมตัวอย่างหอยทากบกและหอยน้ำจืดใหม่ทั่วประเทศไทยทั้งพื้นที่ที่เคยมีการศึกษามาแล้ว และพื้นที่ที่ยังไม่เคยมีการเก็บตัวอย่างมาก่อน

การเก็บตัวอย่างหอยทากบก: เลือกพื้นที่สุ่มตัวอย่างตามแนวเขาหินปูนเนื่องจากเป็นถิ่นที่อยู่อาศัยหลักของหอยทากบกจากทั่วทุกภาคของประเทศไทย และพื้นที่ที่เป็นป่าดิบแล้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และพื้นที่ที่มีระดับความสูงของพื้นที่ตั้งแต่ในระดับน้ำทะเล จนถึง 2,500 เมตรจากระดับน้ำทะเล และลักษณะของป่าไม้ที่เป็นป่าดิบชื้น ป่าดิบเขา ซึ่งลักษณะของพรรณไม้ ป่าไม้ประเภทต่างๆ และระดับความสูงของพื้นที่ มีผลต่อชนิดพันธุ์ของหอยทากบกทั้งสิ้น

การเก็บตัวอย่างหอยน้ำจืด: เก็บตัวอย่างในทุกถิ่นที่อยู่อาศัยตั้งแต่น้ำตื้นจนถึงน้ำลึกก้นแม่น้ำตลอดความยาวของลำน้ำ รวมถึงลำน้ำสาขาและแหล่งต้นน้ำของแม่น้ำสายหลักของประเทศไทยทุกสาย เลือกถิ่นที่อยู่อาศัยทั้งที่เป็นโคลน ทราย หิน ทั้งแหล่งน้ำนิ่ง น้ำไหลของทุกภาคของประเทศ แหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้นด้วย รวมทั้งประเทศข้างเคียง เพื่อให้ได้ตัวแทนความหลากสปีชีส์ของหอยน้ำจืดในแต่ละลุ่มน้ำ และครอบคลุมทุกถิ่นที่อยู่อาศัยของหอยน้ำจืดในประเทศไทย

การจัดจำแนกสปีชีส์ใช้การเปรียบเทียบกับตัวอย่างต้นแบบเป็นหลัก แบ่งตัวอย่างที่เก็บได้ใหม่เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยา การเจริญของตัวอ่อน และเก็บตัวอย่างส่วนหนึ่งแบบแช่แข็งที่ -80 องศา เพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลทางพันธุกรรมของหอยทากบกและหอยน้ำจืดของประเทศและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เนื่องจากมีแนวโน้มการลดประชากรของหอยน้ำจืดหลายสปีชีส์ทั่วโลก จัดทำฐานข้อมูลความหลากหลายของหอยทากบกและหอยน้ำจืดของประเทศไทย โดยจัดเก็บตัวอย่างอ้างอิงและตัวอย่างต้นแบบไว้ในพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อให้นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกสามารถเข้าถึงและมาศึกษาได้

นำข้อมูลจากการวิเคราะห์ทั้งหมดมาสร้างมูลค่าเพิ่มด้วยการจัดทำโมโนกราฟของหอยไทย โดยยึดแนวมาตราฐาน IUCN เพื่อใช้ในการบริหารจัดการทรัพยากรหอยให้เกิดประโยชน์สูงสุดอย่างยั่งยืน

3.2. พื้นที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

1. ศึกษาตัวอย่างที่มีอยู่แล้ว ทั้งเปลือกและตัวอย่างดอง เพื่อให้เห็นความหลากหลายของหอยทากบกและหอยน้ำจืดในประเทศไทยในภาพรวม จากตัวอย่างที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล องค์การพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ และสถานีประมงน้ำจืด 33 แห่งทั่วประเทศไทย

2. เก็บตัวอย่างใหม่ ทั้งเปลือกและตัวอย่างเป็น ตามพื้นที่ของตัวอย่างต้นแบบ (type locality) ทั่วประเทศไทย และพื้นที่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาทั้งหอยทากบกและหอยน้ำจืด
3. บันทึกสถานที่เก็บตัวอย่างด้วยพิกัด GPS ลักษณะทางนิเวศวิทยาอื่นๆ เช่น ถิ่นที่อยู่อาศัยย่อย คุณภาพของน้ำ ลักษณะของพื้นที่ท้องน้ำ และสภาพภูมิประเทศ เพื่อเข้าใจถึงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ อันจะมีผลต่อปริมาณและความหลากสปีชีส์ของหอยในแต่ละพื้นที่
4. ถ่ายภาพหอยทั้งเปลือกและตัวเป็นเพื่อใช้ประกอบในการจำแนกสปีชีส์ และฐานข้อมูลของหอยทากบกและหอยน้ำจืดของประเทศไทย

3.3. การจำแนกสปีชีส์

1. นำตัวอย่างหอยที่ได้มาจำแนกสปีชีส์ในขั้นต้นกับเอกสารอ้างอิงหลัก (Brandt, 1968, 1970, 1974) ซึ่งเป็นการศึกษาจากตัวอย่างในประเทศไทยเป็นส่วนใหญ่ และจากการศึกษาในพื้นที่ข้างเคียงเช่น ประเทศพม่า ลาว กัมพูชา และมาเลเซีย ตามรายงานของ Morelet (1875), Morlet (1891), Bavay and Dautzenberg (1905), Gude (1921) และ Benthem Jutting (1959) เป็นต้น
2. ยืนยันการจำแนกสปีชีส์กับตัวอย่างต้นแบบ ที่อยู่ในพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยาที่เป็นสถานที่หลักในการเก็บรักษาตัวอย่างต้นแบบของหอยทากบกและหอยน้ำจืดของภูมิภาคเอเซียตะวันออกเฉียงใต้เช่น SMF: Forschungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Frankfurt; ZMB: Zoological Museum of Berlin, Berlin; NHM: The Natural History Museum, London; UMZC: University Museum of Zoology Cambridge, Cambridge); MNHN: Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris; ZMA: Zoological Museum of Amsterdam, Netherland; ZMUC: Zoological Museum of University of Copenhagen, Denmark; RBINS: The Royal Belgium Institute of Natural Science, Brussels
3. สร้าง Dichotomous key จำแนกสกุล และสปีชีส์ของหอยทากบกและหอยน้ำจืดที่พบในประเทศไทย ด้วยข้อมูลทั้งทางสัณฐานวิทยาของเปลือก ข้อมูลกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ ระบบทางเดินอาหาร สีสันและลวดลายบนลำตัว และลักษณะการเจริญของตัวอ่อน
4. ลงทะเบียนตัวอย่างอ้างอิง และตัวอย่างต้นแบบไว้ในพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4. การศึกษากายวิภาคศาสตร์

3.4.1 กลุ่มของหอยฝาเดียว

1. ถ่ายภาพหอยขณะมีชีวิตและบันทึกข้อมูลภายนอกเช่น ลวดลาย สีสันบนตัวหอย แผ่นเท้า และลักษณะของปากด้านหน้า (snout) เพื่อใช้ในการบรรยายลักษณะและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสปีชีส์

2. นำตัวอย่างที่ได้มาเก็บรักษาด้วย 70% แอลกอฮอล์เพื่อใช้ศึกษากายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ และตัวอย่างอีกส่วนจะเก็บรักษาไว้ที่ -80 องศา เพื่อใช้ในการศึกษา DNA และ allozyme ต่อไป
3. ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ สัณฐานวิทยาของถุงเก็บสเปิร์ม อวัยวะเลี้ยงตัวอ่อน (brood pouch, พบในเพศเมีย) และส่วนของเนื้อเยื่อสร้างเปลือก ของหอยแต่ละสปีชีส์
4. นำตัวอ่อนของหอยที่ยังไม่ได้ฟักมาศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือก ฝาปิดเปลือก และลวดลายบนผิวเปลือก ด้วยกล้อง SEM (Scanning Electron Microscope) ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะสึกกร่อนไประหว่างการเจริญเติบโตของหอย
5. สกัดแผ่นฟันด้วย NaOH เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยา สูตรฟัน และความผันแปรของซี่ฟันในหอยแต่ละสปีชีส์ที่พบในแต่ละพื้นที่ ด้วยกล้อง SEM และนำมาหาความสัมพันธ์กับลักษณะของถิ่นที่อยู่อาศัยย่อยของหอยแต่ละสปีชีส์
6. วาดภาพอวัยวะสืบพันธุ์ ถุงเก็บสเปิร์ม อวัยวะเลี้ยงตัวอ่อน และอวัยวะสำคัญต่างๆ เช่น ส่วนลำตัว ส่วนหัว เหงือก เท้า ฝาปิดเปลือก และเนื้อเยื่อปกคลุมลำตัว เพื่อประกอบคำบรรยายลักษณะและเปรียบความแตกต่างระหว่างหอยแต่ละสปีชีส์

3.4.2. กลุ่มหอยสองฝา

1. ถ่ายภาพหอยขณะมีชีวิตและบันทึกข้อมูลภายนอกเช่น ลักษณะของท่อน้ำ (siphon) ลวดลาย สีสันของเปลือก โครงสร้างของเหงือก กล้ามเนื้อยึดเปลือกต่างๆ และเนื้อเยื่อปกคลุมลำตัว เพื่อใช้ในการบรรยายลักษณะและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสปีชีส์
2. นำตัวอย่างที่ได้มาเก็บรักษาด้วย 70% แอลกอฮอล์เพื่อใช้ศึกษากายวิภาคศาสตร์ระบบทางเดินอาหาร และอวัยวะภายในต่างๆ และตัวอย่างอีกส่วนจะเก็บรักษาไว้ที่ -80 องศา เพื่อใช้ในการศึกษา DNA และ allozyme ต่อไป
3. เปรียบเทียบความแตกต่างของโครงสร้างของเหงือก สีของเปลือกด้านนอก ชั้นมุกและสีของเปลือกด้านใน เส้นขอบของเนื้อเยื่อสร้างเปลือกด้านใน ร่องรอยของตำแหน่งการเกาะยึดของกล้ามเนื้อที่ผิวเปลือกด้านใน (muscle scars) ลักษณะและตำแหน่งของฟันยึดเปลือก (hinge teeth) และส่วนของเหงือกที่ใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อน (marsupial gill) ของหอยแต่ละสปีชีส์
4. นำตัวอ่อนของหอย (glochidium) ที่ติดอยู่บนเหงือกมาศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือกและลวดลายบนผิวเปลือกทั้งด้านนอกและด้านในเปลือก ด้วยกล้อง SEM
5. วาดภาพระบบทางเดินอาหาร ลักษณะการจัดเรียงตัวของท่อน้ำ (siphon) และลักษณะของลวดลายบนผิวเปลือกด้านในต่างๆ (pallial line และ muscle scars) ฟันยึดเปลือกและขอบของเนื้อเยื่อปกคลุมลำตัว เพื่อประกอบคำบรรยายลักษณะและเปรียบเทียบกันระหว่างสปีชีส์

3.5. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พันธุศาสตร์ประชากรและเซลล์พันธุศาสตร์

3.5.1. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

1. สกัดสารพันธุกรรมดีเอ็น จากเนื้อเยื่อส่วนเท้า (foot tissue) ของตัวอย่างโดยใช้ DNA extraction kit หรือ phenol-chloroform extraction Doyle and Doyle (1987) และตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี Gel electrophoresis
2. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทไมโตคอนเดรีย เพื่อเพิ่มจำนวนปริมาณของสายดีเอ็นเอเป้าหมาย
3 ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ทีได้จากปฏิกิริยาโดย Gel electrophoresis และนำ PCR product ที่มีศักยภาพของแต่ละตัวอย่างไปทำให้บริสุทธิ์สูงขึ้นโดยใช้ PCR Purification kit และทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ โดยวิธี Automated DNA sequencing
4. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Clustal W (Thomson et al., 1994) และแปรผลหาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum parsimony (MP), Neighbor-joining (NJ) และ Maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม MEGA (Kumar et al., 2008) และ PAUP version 4.10 (Swofford, 2002) นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ของหอยภายในสปีชีส์เดียวกันด้วย โดยจะทำการวิเคราะห์ทั้งภายในประชากรเดียวกันและระหว่างประชากร โดยจะคำนวณหา mtDNA haplotypes (h), haplotype diversity (hd) (Nei, 1987), nucleotide diversity (π) (Tajima, 1983), total number of mutations (m) and mean number of pairwise nucleotide differences (k) โดยใช้โปรแกรม DnaSp version 4.50.3 (Rozas et al., 2003).

3.5.2. การวิเคราะห์พันธุศาสตร์ประชากร

1. เก็บรักษาตัวอย่างหอยน้ำจืดสำหรับการศึกษาในเชิงพันธุศาสตร์โมเลกุลใน Freezer -80 องศา และ -20 องศา แล้วนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Allozyme Electrophoresis
2. ตรวจสอบสปีชีส์ของตัวอย่างหอยที่เก็บมา โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างต้นแบบที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและจากงานวิจัยของ Brandt (1974)
3. วิเคราะห์โปรตีน ด้วยวิธี allozyme electrophoresis โดยใช้วิธีการของ Clayton and Tretiak (1972), Boyer et al. (1963), Ridgway et al. (1970) และ Murphy et al. (1996)
4. วิเคราะห์โครงสร้างของประชากรโดยคำนวนค่าต่างๆ ดังนี้ Allele frequency, Genetic variability, Hardy-Weinberg equilibrium, Genetic differentiation, Genetic distance, Isolation by distance (Mantel, 1967) และแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง

ประชากรด้วยวิธี neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) ด้วย โปรแกรม BIOSIS-1 (Swofford and Selander, 1989), GENEPOP version 2.0. (Raymond and Rousset, 1995) และ ARLEQUIN 3.1 (Excoffier et al., 2005).

3.5.3. การศึกษาเซลล์และโครโมโซมโดยเทคนิค Hypotonic air-drying method

1. คัดเลือกหอยตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียมาใช้ในการศึกษา โครโมโซม
2. โดยฉีดสารละลายโคชิซีนความเข้มข้น 0.05% เพื่อยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิลทำให้โครโมโซมหยุดอยู่ในระยะเมตาเฟสตามที่ต้องการ
3. ตัดเนื้อเยื่อที่ต้องการ (ovary หรือ testis) ให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในสารละลายเกลือเจือจาง เช่น สารละลายโซเดียมซิเตรท (0.9%) โซเดียมคลอไรด์ 0.75% หรือ โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.75%
4. กรองเนื้อเยื่อผ่านผ้าเนื้อบางๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย fixative (methanol: acetic acid อัตราส่วน 3:1) ทำซ้ำอย่างน้อยสองครั้ง
5. นำสารละลายที่มีเซลส์ปนอยู่ไปหยดบนสไลด์สะอาดที่วางบน warm plate อุณหภูมิประมาณ 60 องศา เพื่อให้โครโมโซมกระจายดีขึ้น แล้วผึ่งสไลด์ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง หรืออบที่อุณหภูมิ 37 องศา
6. นำแผ่นสไลด์ที่แห้งแล้วและมีเซลล์ติดอยู่ ไปย้อมสีโครโมโซมด้วยสี Geimsa ที่ความเข้มข้น 4% นาน 15 นาที หลังจากนั้นล้างผ่านด้วยน้ำกลั่นและผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
7. นำแผ่นสไลด์ที่ผ่านการย้อมและแห้งแล้วไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกภาพเซลล์และ metaphase chromosome และนำไปวิเคราะห์คาริโอไทป์ตามหลักเกณฑ์ของ Levan et al. (1964)

บทที่ 4
ผลการศึกษา

ความหลากหลายทางชีวภาพนับเป็นเรื่องที่ทุกคนให้ความสนใจมากในปัจจุบัน โดยเฉพาะภาวะคุกคามอันเป็นผลสืบเนื่องมากจากเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบนโลก ซึ่งการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพนั้นมีหลายส่วน ส่วนที่ความสำคัญมากอันหนึ่งคือความหลากสปีซีส์ ในประเทศที่พัฒนาแล้วองค์ความรู้ด้านความหลากสปีชีส์มีก้าวหน้ามาก ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยในการวางนโยบายการจัดการทรัพยากรความหลากหลายที่มีอยู่ในพื้นที่ให้ได้เต็มประสิทธิภาพและยั่งยืน สำหรับประเทศไทยความรู้พื้นฐานของสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่างๆ มีอยู่น้อยอย่างจำกัด ซึ่งไม่สอดคล้องกับทรัพยากรความหลากหลายของชนิดพันธุ์และพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่มีอยู่อย่างมากมายในประเทศไทย

สำหรับประเทศไทยซึ่งตั้งอยู่ในบริเวณเชื่อมต่อระหว่าง Indochina และ Sunda Land จึงมีจำนวนชนิดพันธุ์ของหอยทากบกที่หลากหลาย อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ผ่านมาพบหอยทากบกไม่มากนัก แต่ในช่วงทศวรรษหลัง ที่ได้มีการสนับสนุนการศึกษาองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพอนุกรมวิธานและวิวัฒนาการของหอยทากบกของไทยมีมากขึ้น ซึ่งกำลังพัฒนาไปในทิศทางที่ดี มีการค้นพบหอยทากบกจากประเทศไทย และเป็นที่รู้จักกันทั่วโลกเพิ่มมากขึ้นอีกนับร้อยสปีชีส์ และจัดทำโมโนกราฟของหอยกลุ่มต่างๆ ของไทย สำหรับใช้ในการบริหารจัดการทรัพยากรชีวภาพของหอยไทย โดยเลือกหอยกลุ่มที่มีความสำคัญและแนวโน้มในด้านการพัฒนาต่อยอดในด้านต่างๆ 4 กลุ่มดังนี้

4.1 กลุ่มหอยมีฝาปิดเปลือกวงศ์ Cyclophoridae สกุล *Rhiostoma*

บทนำ

หอยทากมีฝาปิดเปลือก (land operculate snails) เป็นหอยที่เป็นรอยต่อระหว่างหอยฝาเดียวน้ำจืดและหอยทากบก ถือว่าเป็นหอยเด่นในบริเวณซากทับถมในเขตเขาหินปูน หรือบริเวณพื้นที่ที่มีคาร์บอเนต เช่นพื้นที่ป่าละเมาะที่มีสารปูน ชาวบ้านในท้องถิ่นต่าง ๆ นิยมนำไปบริโภค พบอยู่ในถิ่นอาศัยที่กว้างขวางจำเพาะของเอเชีย ตั้งแต่เขตร้อนแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ไปจนถึงเขตกึ่งร้อนในแถบญี่ปุ่น จีน ไปจนถึงเขตมรสุมเช่นฟิลิปปินส์ หลายท้องที่ถือว่าเป็นดัชนีของภูเขา บางครั้งเรียกหอยภูเขา กลุ่มที่ถือว่าเป็นหลักคือหอยวงศ์หอยหอมวงศ์ Cyclophoridae จัดว่าเป็นวงศ์หอยที่ใหญ่ที่สุดในบรรดาหอยมีฝาปิดเปลือกทั้งหมด พบทั้งในทวีปเอเชีย อาฟริกา ออสเตรเลีย ตลอดจนอเมริกาเหนือ ปัจจุบันมีรายงานการพบหอยวงศ์นี้มากกว่า 600 สปีชีส์ มีสกุลใหญ่ ๆ อยู่หลายสกุล เช่น หอยหอมสกุล *Cyclophorus* หอยงวงท่อสกุล *Rhiostoma* ฯลฯ หอยงวงท่อสกุล *Rhiostoma* ก็ถือได้ว่าเป็นหอยบกที่แสดงลักษณะมหัศจรรย์ทางวิวัฒนาการ ด้วยโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาที่มีความจำเพาะตัว และมีพื้นที่การแพร่กระจายค่อนข้างจำกัด ในภาวะที่ป่าไม้ถูกทำลาย มีผลโดยตรงต่อการทำลายถิ่นที่อยู่อาศัย หอยงวงท่อจะอาศัยใต้ซากทับถมคล้ายกับหอยหอม แต่ทั้งหอยหอมและหอยงวงท่อ ต่างก็เป็นรอยต่อระหว่างหอยฝาเดียวน้ำจืดและหอยทากบก ถือว่าเป็นหอยเด่นในบริเวณซากทับถมในเขตเขาหินปูน หรือบริเวณพื้นที่ที่มีคาร์บอเนต เช่นพื้นที่ป่าละเมาะที่มีสารปูน ในประเทศไทยมีรายงานการพบหอยใน

พื้นที่ต่าง ๆ มามากกว่า 100 ปี การจำแนกหอยนั้นใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือก เช่นรูปทรง และลวดลาย ทำให้จำแนกหอยงวงท่อได้ 6 สปีชีส์ การอาศัยอยู่ในซากทับถมทำให้มองเห็นการตัดขาดของประชากรในแต่ละพื้นที่อย่างเด่นชัด แต่เนื่องจากหอยกลุ่มนี้เป็นที่นิยมบริโภคของสัตว์ผู้ล่าหลากหลายชนิด เช่นสัตว์เลื้อยคลาน นก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม โดยเฉพาะสัตว์ฟันแทะ และมนุษย์ ผู้ล่าดังกล่าวอาจเป็นตัวการพาสัตว์ในแต่ละพื้นที่ไปพบกันแล้วทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนของยีนมาตั้งแต่อดีต การใช้สัณฐานวิทยาของเปลือกและอวัยวะภายใน จะไม่สามารถตอบคำถามในเรื่องขอบเขตที่ชัดเจนของสปีชีส์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้อย่างชัดเจน การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการวิเคราะห์ในเชิงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้อัลโลไซม์และดีเอ็นเอ ของหอยงวงท่อสกุล *Rhiostoma* แล้ววิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ ผลการวิเคราะห์จะมีประโยชน์เป็นอย่างมากต่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ และองค์ความรู้ทางวิวัฒนาการ เนื่องจากหอยในวงศ์ Cyclophoridae สกุล *Rhiostoma* แทบไม่มีการศึกษาในแง่มุมอื่น ๆ มาก่อนเลย หลังจากมีรายงานในเชิงอนุกรมวิธานพื้นฐานของเปลือกมาแล้ว

ผลการศึกษา

เก็บตัวอย่างหอยงวงท่อบริเวณภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้ ของประเทศไทย รวมถึงประเทศมาเลเซียรัฐ Perlis, Perak, Selangor และเกาะ Langkawi รวม 45 พื้นที่ และเทียบตัวอย่างกับตัวอย่างต้นแบบในพิพิธภัณฑ์ Natural History Museum (London), Natural History Museum of Wales, National Museum of Natural History (Paris) และ Senckenberg Museum of Natural History, Frakfurt โดยยืมตัวอย่างจากพิพิธภัณฑ์ดังกล่าว พบว่ามีหอยงวงท่อจำนวน 15 ชนิด **ตารางที่ 1**

ตารางที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่างและชนิดของหอยงวงท่อพบ

Locality	Species
ถ้ำปลา, เชียงราย	*Rhiostoma* sp.1
ถ้ำผาจม, เชียงราย	*Rhiostoma* sp.1
อุทยานแห่งชาติดอยภูนาง, พะเยา	*Rhiostoma housei* (Haines, 1858)
เขาปฐวี, อุทัยธานี	*Rhiostoma pulchellus* (Morlet, 1889)
เขาน้อย, นครสวรรค์	*Rhiostoma* sp.2
ถ้ำเพชร ถ้ำทอง, ดาคลี, นครสวรรค์	*Rhiostoma housei* (Haines, 1858)
ถ้ำดาว เขาแก้ว, มวกเหล็ก, สระบุรี	*Rhiostoma housei* (Haines, 1858)
มวกเหล็ก, สระบุรี	*Rhiostoma housei* (Haines, 1858)
วัดเทพพิทักษ์, นครราชสีมา	*Rhiostoma housei* (Haines, 1858)
เขาลูกช้าง, นครราชสีมา	*Rhiostoma housei* (Haines, 1858)
สะแกย์ราช, นครราชสีมา	*Rhiostoma housei* (Haines, 1858)

ศูนย์เพาะพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว, ชัยภูมิ	*Rhiostoma* sp.3
น้ำตกตรอกนอง, จันทบุรี	*Rhiostoma hainesi* Pfeiffer, 1862
ศูนย์เพาะพันธ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว, จันทบุรี	*Rhiostoma hainesi* Pfeiffer, 1862
เขาสุกิม, ท่าใหม่, จันทบุรี	*Rhiostoma hainesi* Pfeiffer, 1862
น้ำตกมะกอก, จันทบุรี	*Rhiostoma hainesi* Pfeiffer, 1862
อุทยานแห่งชาติน้ำตกพลิ้ว, จันทบุรี	*Rhiostoma hainesi* Pfeiffer, 1862
เขาชะอางค์, บ่อทอง, ชลบุรี	*Rhiostoma pulchellus* (Morlet, 1889)
วัดพลวงทอง, ชลบุรี	*Rhiostoma pulchellus* (Morlet, 1889)
สำนักสงฆ์ เขาหินไผ่,แกลง, ระยอง	*Rhiostoma* sp.4
ถ้ำสีทอง, คลองหาด, สระแก้ว	*Rhiostoma* sp.4
วัดถ้ำเขาฉกรรจ์, สระแก้ว	*Rhiostoma* sp.4
วัดถ้ำเขาฉกรรจ์, สระแก้ว	*Rhiostoma cambojense* (Morelet, 1875)
วัดถ้ำเขาม้าร้อง, บางสะพาน, ประจวบคีรีขันธ์	*Rhiostoma housei* (Haines, 1858)
เขาล้อมหมวก, อ่าวมะนาว, ประจวบคีรีขันธ์	*Rhiostoma housei* (Haines, 1858)
ถ้ำพิสดาร, ประทิว, ชุมพร	*Rhiostoma housei* (Haines, 1858)
เขาพนมวัง, กาญจนดิษฐ์, สุราษฎร์ธานี	*Rhiostoma* sp.5
เขาช้าง, ดอนสัก, สุราษฎร์ธานี	*Rhiostoma chupingense* Tomlin, 1939
ถ้ำวังทอง, ขนอม, สุราษฎร์ธานี	*Rhiostoma chupingense* Tomlin, 1939
ถ้ำคีรีวงค์, ปากแพรก, ดอนสัก, สุราษฎร์ธานี	*Rhiostoma chupingense* Tomlin, 1939
น้ำตกหินลาด, เกาะสมุย, สุราษฎร์ธานี	*Rhiostoma samuiense* Tomlin, 1932
น้ำตกหน้าเมือง, เกาะสมุย, สุราษฎร์ธานี	Rhiostoma samuiense Tomlin, 1932
เกาะแตน, สุราษฎร์ธานี	Rhiostoma samuiense Tomlin, 1932
เกาะสามเส้า, หมู่เกาะอ่างทอง, สุราษฎร์ธานี	*Rhiostoma asiphon* MÖellendorff, 1932
เกาะวัวตาหลับ, หมู่เกาะอ่างทอง, สุราษฎร์ธานี	*Rhiostoma asiphon* MÖellendorff, 1932
เขาห้วยแห้ง, ห้วยยอด, ตรัง	*Rhiostoma chupingense* Tomlin, 1939
เขาปู่ เขาย่า, พัทลุง	*Rhiostoma chupingense* Tomlin, 1939
น้ำตกเต่าทอง, พังงา	*Rhiostoma jalorensis* Sykes, 1903
วัดถ้ำสุวรรณคูหา, พังงา	*Rhiostoma jalorensis* Sykes, 1903
ถ้ำโกบ, ทับผุด, พังงา	*Rhiostoma jalorensis* Sykes, 1903
ถ้ำน้ำผุด, พังงา	*Rhiostoma jalorensis* Sykes, 1903
เขารูปช้าง, สะเดา, สงขลา	*Rhiostoma chupingense* Tomlin, 1939
Sungai Jenis, Perlis, มาเลเซีย	*Rhiostoma chupingense* Tomlin, 1939
Bhukit Chuping, Perlis, มาเลเซีย	*Rhiostoma chupingense* Tomlin, 1939

สรุปผลการศึกษา

ในการศึกษาเชิงซิสเทมาติกส์ด้วยอัลโลไซม์ และดีเอ็นเอ ในหอยงวงท่อของไทย และ วิเคราะห์การแพร่กระจายและสายวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ของหอยงวงท่อของไทย โดยได้ทำการเก็บตัวอย่างหอยงวงท่อบริเวณ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้ ของประเทศไทย รวมถึงประเทศมาเลเซียรัฐ Perlis Perak Selangor และ เกาะ Langkawi รวมไปถึงการเก็บตัวอย่างในประเทศลาว จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของสปีชีส์ โดยการเทียบตัวอย่างต้นแบบที่พิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยา ณ กรุงลอนดอน ปารีส และ แฟรงเฟริต พบว่ามีหอยงวงท่อที่พบในประเทศไทยจำนวน 12 ชนิด ในจำนวนนี้มี 7 ชนิดที่คาดว่าจะเป็นชนิดใหม่ของโลก ขณะนี้ได้ทำการตั้งชื่อ บรรยายลักษณะ เปรียบเทียบกับตัวอย่างต้นแบบ **รูปที่ 1**

ผลการศึกษาในเรื่องของอณูชีววิทยาเพื่อให้รายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอของหอยงวงท่อจำนวน 72 ตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ และคัดเลือกตำแหน่งของยีนที่เหมาะสมในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยใช้ตำแหน่งของยีนบนไมโตครอนเดรียลดีเอ็นเอ cytochrome c oxidase subunit I (COI) ในการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสประมาณ 700 เบส ในแต่ละตัวอย่าง ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR และ Sequencing จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PAUP 4.10b การศึกษาขั้นต้นในระดับประชากรของหอยงวงท่อชนิดที่มีการกระจายตัวกว้าง *Rhiostoma housei* ด้วย allozyme electrophoresis เพื่อตรวจสอบความใกล้ชิดทางพันธุกรรมรวมถึงการเป็นประชากรเดียวกันตาม Biological Species Concept คาดว่าจะทำการตรวจสอบใน 11 loci เนื่องจากการทดสอบในเบื้องต้น มีแนวโน้มที่จะให้ผลการวิเคราะห์ที่ดี ขณะนี้ได้ทำการศึกษาเพิ่มในตัวอย่างที่เก็บมาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของสปีชีส์ดังกล่าว ผลที่ได้มีแนวโน้มว่าจะพบสปีชีส์ที่เป็น Cryptic species เกิดขึ้นในประชากรที่มีถิ่นอาศัยที่แตกต่างกันไป

รูปที่ 1 หอยงวงท่อสกุล *Rhiostoma* รูป **A-E** *Rhiostoma housei* รูป **F, G** *Rhiostoma haughtoni* รูป **H-M** *Rhiostoma haniesi* และ รูป **N, O** *Rhiostoma simplicilarbe*

4.2 กลุ่มหอยนักล่า วงศ์ Streptaxidae และ Diapheridae

บทนำ

หอยทากเป็นสิ่งมีชีวิตอีกกลุ่มหนึ่ง ที่ได้ผ่านขั้นตอนทางวิวัฒนาการมาให้มีการปรับ ตัวที่เหมาะสมกับการใช้ชีวิตบนบกในเรื่องของรูปทรงของเปลือก ถิ่นอยู่อาศัย รวมถึงอาหารการกิน โดยหอยทากบกนั้นมีทั้งพวกกินพืช เศษซากใบ หรือแม้แต่หอยที่เป็นผู้ล่าซึ่งก็มีอยู่จำนวนหนึ่ง โดยหอยผู้ล่านั้นมักจะกินหอยด้วยกันเองหรือไส้เดือนฝอยเป็นอาหาร ประเทศไทยซึ่งตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นแบบศูนย์สูตร ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของสภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ และป่าไม้ ที่ช่วยส่งผลให้ประเทศไทยมีความหลากหลายของหอยทากบกกลุ่มต่าง ๆ รวมถึงหอยผู้ล่าสูงเช่นกัน

จากการเก็บตัวอย่างหอยนักล่าทุกภาคของประเทศไทย จำนวนประมาณ 250 ตัวอย่าง และจากการจำแนกสกุลและชนิดในขั้นต้นในห้องปฏิบัติการพบว่ามีหอยนักล่าทั้งสิ้น 8 สกุล ดังนี้ *Discartemont*, *Diaphera*, *Sinoennea*, *Stremmatopsis*, *Oophana*, *Haploptychius*, *Odontartemon* และ *Perrottetia* เนื่องจากแต่เดิมการจัดจำแนกสกุลของหอยนักล่ากลุ่มนี้สามาถใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของภายนอกของเปลือกได้ จึงทำให้ทราบจำนวนสกุลที่พบในขั้นต้นได้ ที่ผ่านมาพบหอยนักล่าขนาดเล็กในสกุล *Diaphera* ซึ่งเป็นหอยที่พบการแพร่กระจายส่นใหญ่อยู่ในประเทศฟิลิปปินส์ เนื่องจากหอยชนิดนี้ไม่เคยมีรายงานการพบในประเทศไทยและยังมีความแตกต่างจากหอยในสกุลเดียวกันที่พบในประเทศกัมพูชาและพม่า และเป็นชนิดที่ยังไม่เคยถูกค้นพบมาก่อน

ย่างไรก็ตามสำหรับหอยนักล่าในสกุลอื่นที่เก็บตัวอย่างได้นั้น เนื่องจากการจัดจำแนกชนิดของหอยในสกุลต่างมักจะใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกเพียงอย่างเดียว ซึ่งบางครั้งยังคงมีความสับสนอยู่มาก ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างหอยที่ยังมีชีวิตและเป็นตัวเต็มวัยมาใช้ในการศึกษาระบบสืบพันธุ์ด้วย ได้เลือกหอยในสกุล *Discartemon* **รูปที่ 2** มาศึกษาระดับชนิดอย่างละเอียด เนื่องจากหอยในสกุลนี้มีลักษณะของเปลือกที่เป็นเอกลักษณะและมีความแตกต่างจากหอยในสกุลอื่นคือ เปลือกเป็นทรงค่อนข้างแบน ในปากเปลือกมีฟันหลายอัน และจากการศึกษาที่ผ่านมาในอดีตพบว่าหอยในสกุลนี้มีการแพร่กระจายทางแถบแหลมมาลายูซึ่งรวมถึงภาคใต้ของประเทศไทย ที่ผ่านมาหอยในสกุลนี้มีรายงานการพบทั้งหมดประมาณ 15 ชนิดด้วยกัน จากการศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างต้นแบบของหอยในสกุลนี้ที่เก็บรักษาอยู่ที่ ประเทศเนเธอแลนด์ และ เยอรมนี และจากการเก็บตัวอย่างทั้งหมดทั่วภาคใต้ของประเทศไทยพบหอยในสกุลนี้ทั้งสิ้นประมาณ 8 ชนิดด้วยกัน นอกจากนี้ยังพบหอยอีก 2 morpho type ที่ยังไม่สามารถตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ได้ และคาดว่าอาจจะเป็นชนิดที่ยังไม่เคยถูกค้นพบมาก่อน

จะเห็นได้ว่า หอยนักล่าในสกุลนี้ยังไม่เคยมีการศึกษาอย่างละเอียด และการจัดจำแนกที่ใช้ในปัจจุบันไม่สามารถนำมาใช้กับตัวอย่างที่มีอยู่ เนื่องจากหอยกลุ่มนี้เปลือกมักจะมีความผันแปรค่อนข้างมาก แต่อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของระบบสืบพันธุ์เป็นลักษณะที่ความผันแปรค่อนข้างน้อย จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการัดจำแนกได้เป็นอย่างดี และอีกทั้งหอยในสกุลนี้ยังไม่เคยมีการศึกษาเปรียบเทียบดังกล่าวมาก่อน ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้จะใช้เป็นมาตรฐาน ในการศึกษาและจัดจำแนกหอยในสกุล *Discartemon* และยังใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาทบทวนในกลุ่มของหอยนักล่าสกุลอื่น ๆ ได้เนื่องจากยังมีการศึกษาน้อยเช่นกัน

รูปที่ 2 หอยนักล่าสกุล *Discartemon* รูป **A** *Discartemon stangulatus* รูป **B** *Discartemon* sp.1 รูป **C** *Discartemon* sp.2 รูป **D** *Discartemon subglobosus* รูป **E** *Discartemon* sp.3 รูป **F** *Discartemon siamensis* รูป **G** *Discartemon* sp. 4 รูป **H** *Discartemon globosus* รูป **I** *Discartemon depressa* รูป **J** *Discartemon* sp. 5 รูป **K** *Discartemon petti* และ รูป **L** *Discartemon* sp.6

4.3 กลุ่มหอยขัดเปลือก Ariphantidae และ Dyakiidae

บทนำ

ระบบนิเวศเขาหินปูนเป็นอีกระบบนิเวศหนึ่งที่มีความสำคัญ เป็นที่รวมของสัตว์กลุ่มต่างๆ เป็นจำนวนมาก ในจำนวนนี้มีหอยทากบกหลายกลุ่มอาศัยและใช้ประโยชน์จากเขาหินปูน ที่นอกจากหอยทากจิ๋วแล้วเช่นหอยขัดเปลือกวงศ์ Ariophantidae ซึ่งเป็นกลุ่มหอยที่มีการแพร่กระจายทั่วประเทศไทย ทั้งในป่ธรรมชาติและในพื้นที่ที่เปลี่ยนแปลงไปแล้ว หอยขัดเปลือกเหล่านี้มีหน้าที่สำคัญเป็นทั้งผู้สลายแคลเซียมและส่งผ่านธาตุอาหารที่สำคัญนี้ต่อไปยังสัตว์กลุ่มอื่นๆ ที่มาบริโภคหอย ในบางครั้งหอยขัดเปลือกยังกัดกินยอดอ่อนของต้นไม้ และพาหะของหนอนพยาธิบางสปีชีส์ อย่างไรก็ดีมีหอยในวงศ์นี้จำนวนสปีชีส์มากที่จัดเป็นหอยเฉพาะถิ่นของไทย แม้ว่าพวกหอยขัดเปลือกจะพบได้ทั่วไปและเป็นที่รู้จักของคนส่วนใหญ่เมื่อเอ่ยถึงหอยทากบก แต่องค์ความรู้ในด้านต่างๆ เกี่ยวกับหอยในวงศ์นี้กลับมีอยู่น้อยและมีข้อจำกัดหลายประการต่อการศึกษาในด้านต่างๆ ที่สำคัญประการหนึ่งคือ การจำแนกชนิดพันธุ์ด้วยหอยในวงศ์นี้มีเปลือกที่มีความคล้ายคลึงกันมากแม้ว่าจะเป็นคนละสปีชีส์คนละสกุลกันก็ตาม ดังนั้นหากขาดการศึกษาที่เป็นระบบ การเก็บตัวอย่างที่คลุมการแพร่กระจาย และสภาพตัวอย่างที่ดีที่สามารถนำมาศึกษากายวิภาคศาสตร์ได้แล้วนั้น การจัดจำแนกหอยในวงศ์นี้คงเป็นไปได้ยาก อีกทั้งเป็นกลุ่มหอยที่แสดงลักษณะของสปีชีส์ที่ซ่อนเร้น จึงทำให้ความรู้ด้านความหลากสปีชีส์ของหอยขัดเปลือกต้องได้รับการปรับปรุงแก้ไข แม้ในปัจจุบันเองทั้งในภูมิภาคเอเซียตะวันออกเฉียงใต้ยังไม่เป็นที่ทราบความหลากสปีชีส์ที่แน่ชัด ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเน้นในเรื่องของการจำแนกสกุลและสปีชีส์ โดยใช้วิธีการศึกษากายวิภาคศาสตร์ของอวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาในประเทศไทยและภูมิภาคอินโดจีนอย่างจริงจัง ผลที่ได้จะเป็นแนวทางที่สำคัญในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร และวิวัฒนาการของหอยในวงศ์นี้ด้วยวิธีการวิเคราะห์ขั้นสูงต่อไป และยังใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาความหลากสปีชีส์ของหอยทากบกวงศ์อื่นๆ ในระบบนิเวศเขาหินปูนของภูมิภาคเอซียตะวันออกเฉียงใต้

หอยทากบกวงศ์ Ariophantidae หรือวงศ์หอยขัดเปลือก มีลักษณะสำคัญคือส่วนของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการสร้างเปลือก (mantle edge) มีรูปร่างเฉพาะตัว เปลือกเป็นทรงแบน มีขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ พบแพร่กระจายตั้งแต่ทวีป อาฟริกา เกาะมาดากัสกา ประเทศสีลังกา อินเดีย ภูมิภาคเอเซียตะวันออกเฉียงใต้ และ เกาะนิวกินี วงศ์หอยขัดเปลือกนี้จัดเป็นหอยกลุ่มเด่น มีความหลากสปีชีส์มาก การจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 7 วงศ์ย่อย (Bouchet & Rocroi, 2005; Vaught, 1989; Schileyko, 2002) และ 2 วงศ์ย่อยหลักที่พบมากในประเทศไทยคือ Ariophantinae และ Macrochlamydinae ถึงกระนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าประเทศไทยมีความหลากสปีชีส์ของหอยในทั้ง 2 วงศ์ย่อยนี้จำนวนเท่าใด (Panha, 1996) แต่จากการศึกษาในพื้นที่ข้างเคียงเช่น พม่าและปากีสถาน พบหอยวงศ์ Ariophantidae ประมาณ 40 สกุล 450 สปีชีส์ และจากรายงานที่เกาะสุมาตรา เกาะชวา และคาบสมุทรมาลายู พบมากกว่า 100 สปีชีส์ จากการศึกษาที่มีในประเทศไทยพบหอยในวงศหอยขัดเปลือกประมาณ 10 สกุล 30-40 สปีชีส์เท่านั้น ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับความหลากสปีชีส์ของหอยวงศ์เดียวกันในประเทศข้างเคียงจะเห็นว่ามีความแตกต่างกันอย่างมาก ซึ่งด้วยตำแหน่งที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของประเทศไทย ที่อยู่ตรงกลางและเป็นเส้นทางเชื่อมต่อของเขตภูมิศาสตร์ของสัตว์ในทั้งสองพื้นที่ แล้ว

ควรจะมีความหลากสปีชีส์ของหอยในวงศ์ Ariophantidae ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับทั้งสองพื้นที่ แต่อาจเนื่องจากหอยในวงศ์นี้มักนี้มีสัณฐานวิทยาของเปลือกที่คล้ายคลึงกันมาก ทั้งรูปทรงและขนาด ยากที่จะใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์หรือแม้แต่สกุล จากการศึกษาที่ผ่านมาชี้ชัดว่าอวัยวะสืบพันธุ์มีความสำคัญและใช้ในการจำแนกสปีชีส์และ/หรือสกุลในหอยวงศ์ Ariophantidae ได้ดี (Godwin-Austen, 1910; Solem, 1966; Sutcharit & Panha, 2008) เนื่องจากอวัยวะสืบพันธุ์เป็นลักษณะทางพันธุกรรม การที่มีอวัยวะสืบพันธุ์ที่แตกต่างกันจะทำให้ยากในการผสมข้ามสายพันธุ์ทำให้เกิดการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์และแยกเป็นคนละสปีชีส์ แม้ว่าหอยดังกล่าวจะมีรูปร่าง รูปทรงเปลือก ลวดลายและสีสันของเปลือกที่เหมือนกันมากก็ดาม

นอกจากหอยในวงศ Ariophantidae นี้จะมีความโดดเด่นในด้านการศึกษาแล้ว ยังมีผลกระทบกับประชาชนหลายด้านเช่น 1) ด้านเศรษฐกิจ โดยมีรายงานว่าหอยทากบกบางกลุ่มสร้างความสูญเสียทั้งทางตรงและทางอ้อมกับผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งก็มีหอยขัดเปลือกวงศ์นี้รวมอยู่ด้วย เพื่อให้การวางแผนการควบคุมโดยชีววธีหรือการจัดการในรูปแบบต่างๆ เป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงที่สุด จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทราบสปีชีส์ หมวดหมู่การจัดจำแนก และชีววิทยาเบื้องต้น หรือ 2) ด้านการสาธารณสุข หอยขัดเปลือกสกุล *Hemiplecta* **รูปที่ 3** มักที่มีขนาดใหญ่ สามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนของประชาชนเช่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และประเทศลาว แต่เนื่องจากเป็นหอยพวกที่อาศัยอยู่ตามพื้นดิน กินเศษซากพืชเน่าเปื่อย จึงทำให้เป็นแหล่งพาหะของโรคพยาธิในปอดในสัตว์เลี้ยงและในคน (Berry, 1974, Panha, 1988) และ 3) ด้านสิ่งแวดล้อม ด้วยหอยในวงศ์นี้มักพบชุกชุมดามพื้นที่ป่าบนแนวเขาหินปูนและมีหอยหลายสปีชีส์ที่มีความจำเพาะถิ่น พบอาศัยอยู่บนเขาหินปูนที่จำกัดเท่านั้น ซึ่งผลกระทบจากการทำเหมืองหิน จะส่งผลกระทบโดยตรงต่อการสูญพันธุ์ของหอยเหล่านี้อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

ดังที่กล่าวมาข้างต้นแม้ว่าหอยในวงศ์ Ariophantidae นี้จะมีความสำคัญหลายด้าน แต่ความรู้พื้นฐานในหลายๆ ด้านมีอยู่อย่างจำกัด การจัดจำแนกในปัจจุบันยังเป็นไปได้ยากด้วยการเป็นสปีชีส์ซ่อนเร้น เนื่องจากเปลือกมีความคล้ายคลึงกัน มีความสับสนและไม่ชัดเจนในการจัดหมวดหมู่ และความลำบากที่ต้องอวัยวะสืบพันธุ์ในการจัดจำแนก จึงมักถูกหลีกเลี่ยงและไม่ได้รับความสนใจในการศึกษามาโดยตลอด อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Godwin-Austen (1888-1914) จัดว่าเป็นต้นแบบในการศึกษาเรื่องของสปีชีส์ซ่อนเร้น เช่น หอยขัดเปลือกพวกที่มีเปลือกแบน บางใส และมีวงเปลือกจำนวนมากมักจะถูกจัดไว้ในสกุล *Macrochlamys* แต่หากมีเปลือกขนาดใหญ่ หนาและแข็ง จะถูกจัดไว้ในสกุล *Hemiplecta* หรือ *Cryptozona* ส่วนพวกที่เปลือกมีขนาดเล็กและลดรูปลงไปมากมักจัดไว้ในสกุล *Megasutenia* แต่จากการศึกษากายวิภาคระบบสืบพันธุ์ พบความแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิงในระดับสปีชีส์ที่อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ทำให้แยกหอยในสามกลุ่มดังกล่าวออกเป็นอีกหลายสกุล ซึ่งส่วนก็ได้รับการศึกษาเพิ่มเติมและยืนยันในภายหลัง และด้วยข้อจำกัดของการเก็บรักษาตัวอย่างทำให้ในอดีตมักไม่มีการศึกษากายวิภาคศาสตร์ มีการประมาณกันว่ากว่า 60 % ของหอยในวงศ์ Ariophantidae ยังไม่ได้รับการศึกษาทางกายวิภาคศาสตร์และการจัดหมวดหมู่อย่างถูกต้อง และอาจมีหอยขัดเปลือกในวงศ์นี้ที่ซ่อนเร้นยังไม่ได้ค้นพบอีกมาก (Schileyko, 2002) และหลักฐานทางวิวัฒนาการหลายประการยังไม่ถูกเปิดเผย (Panha, 1997; Maneewong, 2000)

ผลการศึกษา

ในการศึกษาเชิงซิสเทมาติกส์ของหอยขัดเปลือก และวิเคราะห์การแพร่กระจายและสายวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ของหอยขัดเปลือกของไทย โดยได้ทำการเก็บตัวอย่างหอยขัดเปลือกบริเวณภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้ ของประเทศไทย รวมถึงประเทศมาเลเซีย สิงค์โปร ศลาว และกัพูชา

ซึ่งที่ผ่านมาการศึกษากลุ่มของหอยขัดเปลือกในประเทศไทยมีอย่างจำกัด ที่มีการศึกษาจากชาวยุโรปอยู่มากกว่าของประเทศไทย ซึ่งการศึกษาในกลุ่มหอยที่พบในประเทศไทยจากตัวอย่างที่เก็บจากประเทศไทยนั้นยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจัง ประกอบกับที่ผ่านมาในอดีตจนถึงปัจจุบันการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของกลุ่มหอยขัดเปลือกทั้งในระดับสกุลและสปีชีส์ นั้นก็เป็นเช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่มีแต่การศึกษาจากเปลือกเพียงอย่างเดียวเท่านั้น จึงส่งผลทำให้การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของหอยในกลุ่มหอยขัดเปลือกนี้มีความสับสนอยู่มาก และที่สำคัญลักษณะของเปลือกของหอยในกลุ่มนี้มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมากทั้งขนาดรูปร่างและสีสัน ยากในการที่จะทำการจัดจำแนกโดยลักษณะใดลักษณะหนึ่งเพียงอย่างเดียว จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้หอยตัวเป็นในการศึษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของระบบสืบพันธุ์ ซึ่งในการเก็บตัวอย่างที่ผ่านมาและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของระบบสืบพันธุ์ในขั้นต้นพบหอยทากบกในกลุ่มวงศ์ Ariophantidae-Helicarionidae-Dyakiidae นี้ในประเทศไทยจำนวน 20 สกุล และ 64 สปีชีส์ ดังนี้

Ariophanta laevipes (Muller, 1774)
Austenia dawnaensis Godwin-Austen, 1978
Austenia doisutepensis Solem, 1966
Cryptaustenia gardinodromica Solem, 1966
Cryptaustenia tavoyensis (Godwin-Austen, 1910)
Cryptogirasia rubra (Godwin-Austen, 1875)
Cryptozona dicromatica (Morlet, 1889)
Cryptozona granulosa (Mollendorff, 1902)
Cryptozona siamensis (Pfeiffer, 1856)
Durgella levicula (Blanford, 1859)
Durgella libas Solem, 1966
Durgella siamensis Mollendorff, 1901
Dyakia hugonis (Pfeiffer, 1863)
Dyakia retrosa (Gould, 1844)
Dyakia salangana martensi (Collinge, 1903)
Dyakia salangana salangana (Martens, 1867)
***Hemiplecta distincta* (Pfeiffer, 1850)**
***Hemiplecta esculenta* Maassen, 2006**
***Hemiplecta funurea* (Smith, 1899)**
***Hemiplecta humphreysiana* (Lea, 1840)**
***Hemiplecta pluto* (Pfeiffer, 1862)**
Ibycus perakensis (Godwin-Austen, 1909)
Macrochlamys molecular (Benson, 1859)
Macrochlamys pataniensis (Morgan, 1885)
Macrochlamys pedina (Benson, 1865)
Macrochlamys pumicata (Morelet, 1875)
Megaustenia heliciformis (Pfeiffer, 1855)
Megaustenia inusitatum (Godwin-Austen, 1898)
Megaustenia praestans (Gould, 1842)
Megaustenia siamensis (Haines, 1855)
Muangnua limax Solem, 1966
Myotesta fruhstorferi Collinge, 1901
Naninia mouhoti (Pfeiffer, 1860)
Naninia subcornea (Pfeiffer, 1861)

Parmarion martensi Simroth, 1893
Parmarion siamensis (Cockerell, 1891)
Sarika anceps (Gould, 1843)
Sarika asamurai (Panha, 1996)
Sarika brunnea (Mollendorff, 1902)
Sarika diadema (Dall, 1897)
Sarika dugasti (Morlet, 1891)
Sarika hainesii (Pfeiffer, 1856)
Sarika kawtaoensis Tomlin, 1929
Sarika limbata (Mollendorff, 1894)
Sarika obesior (Martens, 1867)
Sarika ochtogyra (Mollendorff, 1902)
Sarika resplendens (Philippi, 1846)
Sesara diplodon (Benson, 1856)
Sesara megalodon Blanford, 1902
Sesara parva Solem, 1966
Sesara penoti Ancey, 1898
Sitala insularis Mollendorff, 1894
Sitala trochulus (Mollendorff, 1883)
Sivella castra (Benson, 1852)
Teraia creulata (Yen, 1939)
Teraia thailandica Solem, 1966

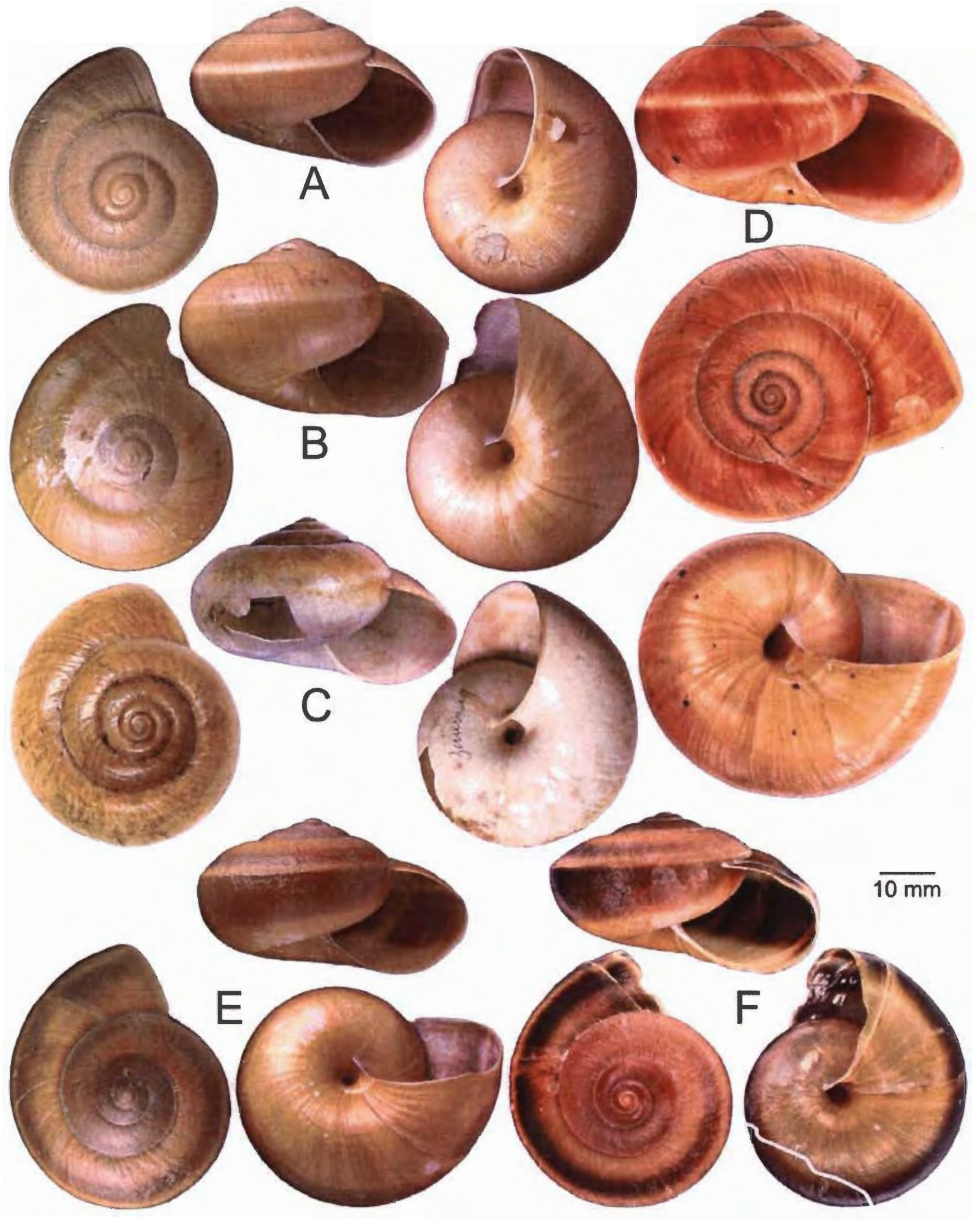
ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกหอยขัดเปลือกในสกุลหอยเดื่อใหญ่ *Hemiplecta* ขึ้นมาศึกษาอย่างละเอียดทั้งลักษณะสัณฐานวิทยาระบบสืบพันธุ์ แผ่นฟัน และความผันแปรทางพันธุกรรม เนื่องจากหอยในสกุลนี้เป็นหอยที่มีเปลือกขนาดใหญ่มีจำนวนสปีชีส์ไม่มากนัก บางสปีชีส์มีการแพร่กระจายกว้าง เช่น *Hemiplecta distincta* บางสปีชีส์มีการแพร่กระจายที่จำกัดเช่น *Hemiplecta funerea* และสกุลหอยเดื่อใหญ่ยังเป็นหอยที่คนไทยนำมาบริโภคเป็นอาหาร เช่นประชาชนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย รวมถึงประเทศลาว อีกทั้งยังมีการรายงานการพบพยาธิหนอนหัวหนามซึ่งก่อให้เกิดโรคพยาธิใสนคน ในหอยเดื่อเหลืองด้วย

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาเกี่ยวกับความหลากสปีชีส์ของหอยขัดเปลือกวงศ์ Ariophantidae ในประเทศไทยนั้นมีไม่มากนัก ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาได้รวบรวมรายชื่อของหอยในวงศ์นี้ไว้เพียง 20 สปีชีส์ ซึ่งจากการศึกษาและรวบรวมตัวอย่างของหอยทากบกที่พบในประเทศไทย ซึ่งจากการศึกษาความหลากสปีชีส์ของหอยทากบกในประเทศไทยที่ผ่านมา สามารถประมาณความหลากสปีชีส์ของวงศ์หอยขัดเปลือกในประเทศไทยน่าจะมีมากกว่า 500 สปีชีส์ ซึ่งอาจจะมีหอยในกลุ่มของหอยขัดเปลือกและหอยห่อเปลือก (Helicoidea) และหอยเวียนซ้าย (Dyakiidae) ประมาณ 100 สปีชีส์ เนื่องด้วยหอยทั้งสองกลุ่มนี้เป็นหอยที่สามารถพบอาศัยอยู่ในถิ่นที่อยู่อาศัยที่หลากหลาย ทั้งพื้นที่ธรรมชาติไม่เคยถูกรบกวน หรือแม้แต่พื้นที่เกษตรกรรมที่มีการรบกวนอยู่ตลอดเวลา พื้นที่แหล่งชุมชนและบ้านเรือนประชาชน และแปลงเกษตรต่าง พบได้ตั้งแต่พื้นที่ราบจนถึงยอดเขาสูงสุดของประเทศไทย ผลการศึกษาในขั้นต้นพบหอยในสกุล *Hemiplecta* ในประเทศไทยทั้สิ้น 6 สปีชีส์ และมี 2 สปีชีส์ที่เป็นรายงายการพบครั้งแรกในประเทศไทย นอกจากนี้การศึกษาทบทวนทางอนุกรมวิธาน และการจัดจำแนกใหม่โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา และตัวอย่างต้นแบบ ได้ทำการศึกษาอย่างครบถ้วนเป็นครั้งแรกของโลก

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของสปีชีส์ โดยการเทียบตัวอย่างต้นแบบ ที่พิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยาต่าง โดยเน้นการศึกษาทบทวนในสกุลหอยเดื่อใหญ่ *Hemiplecta* เนื่องจากเป็นหอยที่มีขนาดใหญ่ มีจำนวนสปีชีส์ไม่มากนักและที่สำคัญเป็นหอยที่คนไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมบริโภคเช่น หอยเดื่อเหลือง *Hemiplecta distincta* และยังพบว่าเป็นหอยที่เป็นพาหะของโรคพยาธิในปอดในสัตว์เลี้ยงและอาจรวมถึงในคน ซึ่งหากได้มีการศึกษาการจัดจำแนกที่ถูกต้องแล้ว จะสามารถช่วยในการควบคุมหรือป้องกันการติดโรคทั้งในสัตว์เลี้ยงหรือในคน นอกจากนี้หอยเดื่อเปลือกไหม้ *Hemiplecta funerea* เป็นหอยที่พบครั้งแรกในประเทศไทย และจัดว่าเป็นหอยเฉพาะถิ่น ที่พบเฉพาะในแนวเทือกเขาสูงของจังหวัดน่าน ซึ่งพื้นที่ป่าในแถบนี้ส่วนใหญ่ถูกทำลาย ซึ่งอาจจะส่งผลทำให้หอยเดื่อเปลือกไหม้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

ผลการศึกษาครั้งนี้พบหอยเดื่อใหญ่สกุล *Hemiplecta* ในประเทศไทยทั้งสิ้น 5 สปีชีส์ ซึ่งน้อยกว่าที่มีรายงานในอดีต 6 สปีชีส์ เนื่องจากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของระบบสืบพันธุ์ และแผ่นฟันอย่างละเอียด และความผันแปรทางพันธุกรรมบ่งชี้ว่า หอยในอดีตที่เคยจัดจำแนกไว้ในสกุล Hemiplecta หลายสปีชีส์ (*Hemiplecta crossei*, *Hemiplecta danae*, *Hemiplecta dichromatica*, *Hemiplecta siamensis*, *Hemiplecta neptunus* และ *Hemiplecta zimmayensis* Godwin-Austen, 1888) นั้นจัดจำแนกไม่ถูกต้องแม้ว่าจะมีสัณฐานวิทยาของเปลือกที่คล้ายคลึงกับหอยในสกุล *Hemiplecta* กันมากก็ตามดังนี้ ด้วยลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ที่มีเอกลักษณะเฉพาะและแตกต่างอย่างสิ้นเชิงจึงควรย้าย "*Hemiplecta*" *danae* ไปอยู่ในสกุล *Pseudoplecta* วงศ์ Dyakiidae ด้วยลักษณะของเปลือกและระบบสืบพันธุ์แตกต่างจากหอยเดื่อของ "*Hemiplecta*" *crossei* "*Hemiplecta*" *dichromatica* และ "*Hemiplecta*" *siamensis* แต่คล้ายคลึงกับหอยในสกุล *Cryptozona* มากกว่า และจากการเปรียบเทียบตัวอย่างต้นแบบของ *Hemiplecta neptunus* และ *Hemiplecta zimmayensis* พบว่าตัวอย่างต้นแบบของหอยทั้งสองสปีชีส์นี้ไม่มีความแตกต่างจาก *Hemiplecta pluto* และ *Hemiplecta distincta* จึงเป็นชื่อพ้องของหอยทั้งสองสปีชีส์นั้นตามลำดับ ทั้งนี้จึงนำมาสู่การปรับปรุงการจัดจำแนกสปีชีส์ของหอยเหล่านี้ใหม่ให้ถูกต้องและเป็นทางการต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่ามีหอยเวียนซ้ายในสกุล *Dyakia* วงศ์ Dyakiidae (*Dyakia retrosa* และ *Dyakia salangana* ที่มีลักษณะของเปลือกที่แตกต่างจากหอยในวงศ์ Ariophantidae อย่างสิ้นเชิง และส่วนใหญ่ก็ได้จัดจำแนกไว้ในสกุล *Dyakia* นี้อย่างไม่น่าสงสัย แต่จากการศึกษาอย่างละเอียดและเปรียบเทียบกับตัวอย่างของหอยในสกุลนี้จากประเทศมาเลเซีย พบว่ามีลักษณะของระบบสืบพันธุ์แตกต่างจากหอยเวียนซ้ายสกุล *Dyakia* ย่างสิ้นเชิง กลับมีความคล้ายคลึงของระบบสืบพันธุ์กับหอยในสกุล *Hemiplecta* วงศ์ Ariophantidae มากกว่า ซึ่งการค้นพบครั้งนี้นำมาสู่การจัดจำแนกใหม่ของหอยในวงศ์ Ariophantidae-Dyakiidae และมีความเป็นไปได้ที่หอยเวียนซ้ายทั้งสองสปีชีส์นี้จะเป็นหอยสกุลใหม่ของวงศ์ Ariophantidae ต่อไป อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการด้วย DNA ในหอยกลุ่มวงศ์ Ariophantidae-Dyakiidae นี้ก็มีความจำเป็นเพื่อยืนยันความสัมพันธ์ดังกล่าว ซึ่งขณะนี้ได้เริ่มดำเนินการศึกษาไปบางส่วน ซึ่งจะได้เป็นการยืนยันความถูกต้องและแม่นในการใช้สัณฐานวิทยาของระบบสืบพันธุ์มาจัดจำแนกหอยในกลุ่ม Ariophantidae-Dyakiidae นี้ได้อย่างถูกต้อง



รูปที่ 3 หอยเดื่อใหญ่สกุล *Hemiplecta* ที่พบในประเทศไทย รูป **A-D** *Hemiplecta distincta* และ รูป **E, F** *Hemiplecta pluto*

4.4 กลุ่มหอยต้นไม้วงศ์ Camaenidae ในสกุล *Amphidromus*

บทนำ

การขดวนของหอยฝาเดียวมีทั้งแบบเวียนซ้าย (sinistral) หรือเวียนขวา (dextral) นั้นควบคุมด้วยยีนเพียงตำแหน่งเดียว (Murray and Clarke, 1976; Ueshima and Asami, 2003; Davision et al. 2005) โดยในประชากรหนึ่งๆ จะแสดงการเวียนของเปลือกเพียงแบบเดียว ยกเว้นบางครั้งในบางประชากรอาจพบได้ทั้งสองแบบ สาเหตุที่หอยฝาเดียวมักแสดงการเวียนของเปลือกเพียงแบบเดียวนั้นเนื่องจากพวกที่เปลือกมีการเวียนที่แตกต่างมักจะมีความถี่น้อยในประชากรและจะถูกคัดเลือกออกไปเพราะหาคู่ผสมพันธุ์ได้ยาก (Johnson, 1982, 1987) แม้ว่าในบางครั้งสามารถพบรูปแบบการเวียนของเปลือกได้ทั้งสองแบบในพื้นที่เดียวกัน แต่ก็มักจะไม่มี gene flow ระหว่างกันซึ่งทำให้เกิดการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ (Johnson, 1982, 1987; Johnson et al. 1993) และเป็นที่รู้กันโดยทั่วไปว่าหอยที่มีเปลือกเวียนต่างกันมักจะแยกกันเป็นคนละชนิด อย่างไรก็ตามในบรรดาหอยทากบกในโลกมีรายงานอยู่ 11 สกุลที่พบลักษณะการเวียนทั้งสองแบบ (Asami, 1993) แต่ส่วนใหญ่มักจะเป็นคนละชนิดกัน จะมีแต่เพียงหอยต้นไม้ เท่านั้นที่พบตัวเวียนซ้ายและเวียนขวานั้นไม่แบ่งแยกเป็นคนละชนิดกัน

ประเทศไทยซึ่งตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นแบบศูนย์สูตร ซึ่งเป็นบริเวณที่มีปัจจัยทางกายภาพเอื้อต่อความหลากหลายของพรรณสัตว์ซึ่งรวมถึงหอยทากบกกลุ่มต่างๆ ในบรรดาหอยทากบกที่พบในประเทศไทยพบมีทั้งที่อาศัยอยู่บนพื้นและบนต้นไม้ โดยหอยต้นไม้สกุล *Amphidromus* มีการแพร่กระจายในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยมีรายงานอยู่ประมาณ 12 ชนิด (Sutcharit, 2005) หอยในสกุลนี้มักแสดงลักษณะที่หลากหลายของสีสันและการเวียนของเปลือกอันน่าตื่นเต้น และมีศักยภาพที่จะใช้ในการศึกษากลไกทางวิวัฒนาการในรูปแบบต่างๆ และจากการศึกษาด้วยเทคนิคโปรตีนในเบื้องต้นพบว่าหอยเวียนซ้ายและเวียนขวาสามารถผสมพันธุ์กันและเกิด gene flow ระหว่างกันได้ (Clarke et al. 1969; Johnson et al. 1993) ซึ่งการเวียนต่างกันของเปลือกอาจไม่ได้เป็นข้อจำกัดในการแบ่งแยกชนิดของหอยในสกุลนี้ นอกจากนี้ *A. glaucolarynx* ยังแสดงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการที่ไม่สอดคล้องกับการจัดจำแนกแบบเดิมและยังมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สามารถแยกออกมาเป็นอีกสกุลย่อย

การเวียนที่แตกต่างกันของเปลือกหอยมีความสำคัญและทำให้เกิด speciation ในหอยทากบกได้ (Gittenberger, 1988; Ueshima and Asami, 2003; Davision et al. 2005) เนื่องจากการเวียนซ้ายหรือเวียนขวาไม่ได้ปรากฏที่เปลือกเพียงอย่างเดียวแต่ยังส่งผลให้อวัยวะภายในต่างๆ วางตัวในทิศทางกลับซ้ายขวากันด้วย ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้จะส่งผลให้หอยที่มีเปลือกขดวนต่างกันไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้เพราะช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์อยู่คนละด้านกัน (Vermeij, 1975; Asami et al. 1998; Ueshima and Asami, 2003) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าหอยที่เปลือกทรงยาวเรียวมักจะพบการผสมพันธุ์ข้ามกันระหว่างตัวที่มีเปลือกเวียนซ้ายและเวียนขวา (interchiral mating) ได้บ่อยกว่าพวกที่มีเปลือกทรงแบน (Asami et al. 1998) ด้วยเหตุนี้จึงอาจส่งผลให้ลักษณะ dimorphism นี้ปรากฏและคงอยู่ได้ในหอยสกุล *Amphidromus* นี้ อย่างไรก็ตามแต่การเฝ้าติดตามการผสมพันธุ์ของหอยในธรรมชาติเป็นไปได้ยากอีกทั้งหอยชนิดนี้มีวงจรชีวิตยาวประมาณ 3-4 ปี ดังนั้นวิธีการตรวจสอบสมมติฐานเรื่องการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างประชากรเวียนซ้ายกับเวียนขวาสามารถใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางโปรตีนและดีเอ็นเอ

เครื่องหมาย ที่ผ่านมาการศึกษาการกระจายตัวของประชากรที่มีเปลือกเวียนทั้งสองแบบของ *A. inversus* พบว่ามีการกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกันไม่แบ่งแยกกันแม้ว่าจะศึกษาในประชากรที่มีขนาดเล็ก (Goodacre and Wade, 2001; Schilthuizen et al. 2005) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานิเวศวิทยาประชากรดังกล่าว ยังไม่สามารถบ่งชี้ถึงการแบ่งแยกในการสืบพันธุ์และโครงสร้างทางพันธุกรรมในระดับประชากรได้ นอกจากนี้การคงอยู่ของลักษณะเวียนซ้ายและเวียนขวาที่พบได้บ่อยในหอยต้นไม้สกุล Amphidromus นี้ยังไม่มีการศึกษาทางพันธุกรรมในระดับประชากร (population genetic)

การศึกษาครั้งนี้เลือก *A. glaucolarynx* มาใช้ในการศึกษาเนื่องจากเป็นหอยเพียงชนิดเดียวในกลุ่มของหอยเวียนซ้ายซึ่งมีอยู่ประมาณ 40 ชนิด และพบการเวียนของเปลือกทั้งซ้ายและขวา (Pilsbry, 1900; Laidlaw and Solem, 1961; Solem, 1965; Sutcharit, 2005) ซึ่งลักษณะการเวียนทั้งสองแบบนี้อาจปรากฏเพียงชั่วคราวโดยลักษณะเวียนขวาจะค่อย ๆ หายไปจนในที่สุดเหลือเป็นหอยเวียนซ้ายที่เหมือนกับชนิดอื่นในสกุลย่อยเดียวกัน การศึกษาข้อมูลความถี่ของเปลือกเวียนซ้ายและเวียนขวาที่พบในแต่ละประชากรช่วยคาดการณ์แนวโน้มการเกิดวิวัฒนาการของ *A. glaucolarynx* ว่าจะเป็นไปในทิศทางใด ผู้วิจัยยังสนใจศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม และการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ ในประชากรที่มีทั้งเปลือกเวียนซ้ายและเวียนขวาโดยวิธี enzyme electrophoresis และ microsatellite marker โดยเทคนิค allozyme สามารถตรวจสอบการส่งผ่านยีน ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรได้ดีและไม่มีปัจจัยของสิ่งแวดล้อมมามีผล และความแตกต่างทางพันธุกรรม ของประชากรได้ดี และยังสามารถเปรียบเทียบระดับของความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากรได้ดีอีกด้วย หากว่า *A. glaucolarynx* สามารถแสดงพฤติกรรมการผสมข้ามกัน ได้ฉะนั้นหอยเวียนซ้ายและเวียนขวาคาดว่าจะมี gene pool ร่วมกัน

ผลการศึกษา

การศึกษาสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาบงชี้ว่าหอยนกขมิ้นน้อยปากสีม่วง *A. glaucolarynx* **รูปที่ 4** มีสัณฐานวิทยาระบบสืบพันธุ์ทั้งภายนอก (ขนาดและรูปร่าง) และภายใน โดยเฉพาะส่วนปลายของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ที่มีขนาดสั้นกว่าในหอยนกขมิ้นสกุลย่อย *Amphidromus* แต่ยาวกว่าของหอยนกขมิ้นน้อยในสกุลย่อย *Syndromus* ลวดลายภายในระบบสืบพันธุ์ยังมีรูปแบบเฉพาะซึ่งไม่พบในหอยทั้งสองสกุลย่อยข้างต้น การจัดเรียงตัวของซี่ฟันบนแผ่นฟันและรูปร่างของฟันยังมีเอกลักษณ์เฉพาะและแตกต่างจากหอยนกขมิ้นในสกุลย่อยอื่นเช่นกัน นอกจากนี้ลักษณะการพบทั้งเปลือกที่เวียนซ้ายและเวียนขวาในประชากรเดียวกัน แม้ว่าจะมีบางประชากรที่พบการขดวนของเปลือกเพียงแบบเดียว ยังเป็นลักษณะเด่นที่แตกต่างจากหอยนกขมิ้นน้อยในสกุลย่อย *Syndromus* ซึ่งทุกชนิดที่พบเปลือกจะเวียนซ้ายเพียงแบบเดียว ประกอบกับเปลือกที่บาง มีขนาดเล็กสูงประมาณ 2.5-3 ซม. จึงแตกต่างจากหอยนกขมิ้นในสกุลย่อย *Amphidromus* เปลือกหนา มีขนาดใหญ่สูงประมาณ 4-7 ซม. ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาที่เป็นเอกลักษณ์ดังกล่าวข้างต้น ทำให้สามารถจำแนกหอยนกขมิ้นน้อยปากสีม่วงออกเป็นสกุลย่อยใหม่ นอกจากนี้ข้อมูลจากความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการยังสนับสนุนความเป็นเอกลักษณ์ดังกล่าว

การศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ

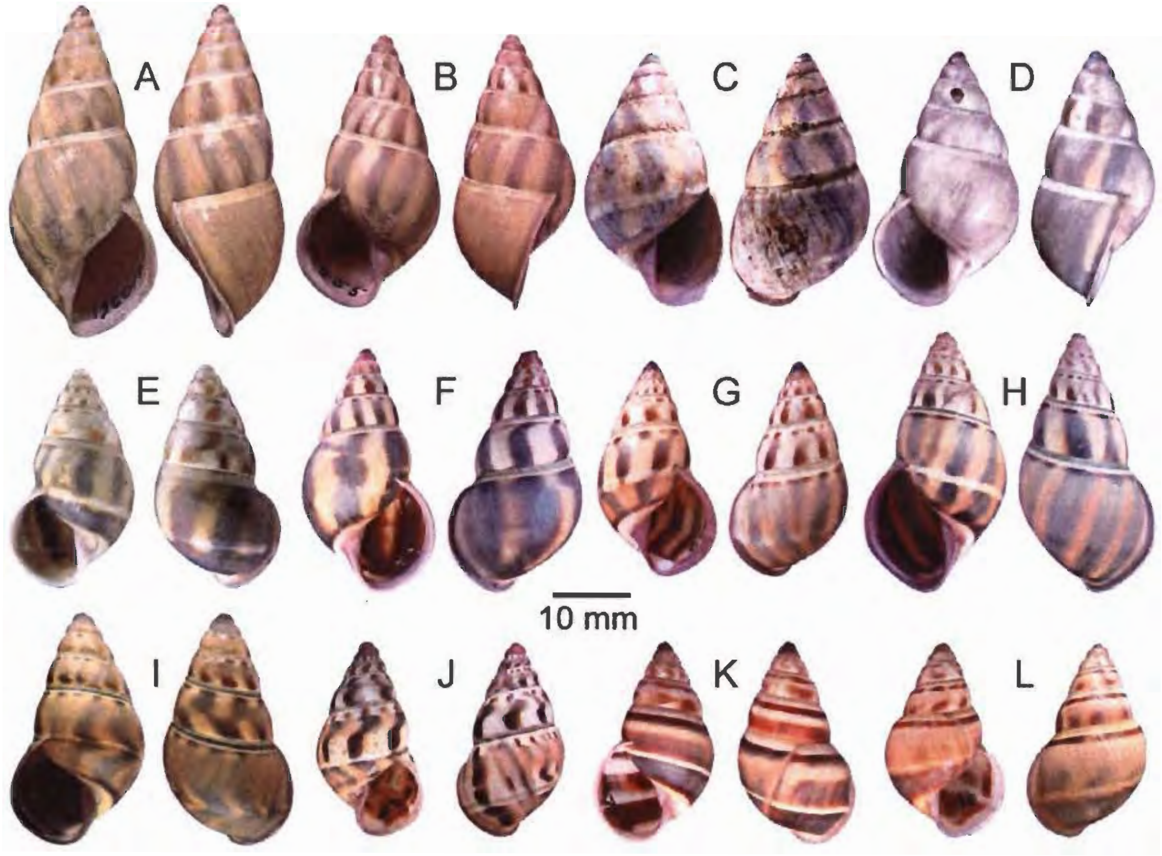
การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางโปรตีน พบลักษณะของความผันแปรทางพันธุกรรมที่น่าสนใจหลายประการเช่น พบว่าหอยที่เวียนซ้ายและเวียนขวาทั้งหมดที่ศึกษาไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร แสดงให้เห็นว่าหอยเวียนซ้ายและเวียนขวาสามารถผสมพันธุ์และแลกเปลี่ยนพันธุกรรมกันได้และรูปแบบการเวียนของเปลือกที่ต่างกัน ในกลุ่มของหอยนกขมิ้นน้อยปากสีม่วงนี้ ไม่ได้เป็นตัวแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์แต่อย่างใด ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมที่พบจะอยู่ในระดับระหว่างประชากรโดยประชากรที่น้ำตกเจ็ดคด จังหวัดสระบุรี มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากประชากรที่พบที่จังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดตากอย่างสิ้นเชิง ในขณะที่ประชากรในจังหวัดตากและกาญจนบุรียังคงพบว่ามีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม

สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยอาศัยลำดับเบสของยีน 16S rRNA นั้น โดยในการศึกษาได้ใช้ตัวอย่างหอยนกขมิ้นน้อยทั้งหมด 11 ประชากร จำนวน 35 ตัวอย่าง **รูปที่ 5** และใช้ outgroup ซึ่งเป็นสมาชิกในทั้งสองสกุลย่อยชนิดและสกุลอื่นในวงศ์เดียวกันทั้งหมด 3 ชนิด ทำการสกัดดีเอ็นเอทำ PCR และศึกษาลำดับเบสบนยีน 16S rRNA ซึ่งได้ความยาวของสายดีเอ็นเอประมาณ 780-800 เบส หลังจากนั้นจะนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PAUP ผลการวิเคราะห์พบว่าหอยนกขมิ้นน้อยปากสีม่วงมีความสัมพันธ์เป็นแบบวิวัฒนาการเชิงเดี่ยวและแตกต่างจากหอยต้นไม้ในทั้งสองสกุลย่อย ความสัมพันธ์ที่ได้ชี้ว่าประชากรที่น้ำตกเจ็ดคดเป็น basal clade และประชากรในจังหวัดกาญจนบุรีแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มด้วยกันคือ กลุ่มแรกประชากรที่น้ำตกไทรโยคน้อย สถานีช่องเขาขาดและอุทยานแห่งชาติเฉลิมรัตนโกสินทร์ กลุ่มต่อมาเป็นประชากรที่วัดท่าทุ่งนาฤธาราม และทับสาธร อำเภอไทรโยค และกลุ่มสุดท้ายเป็นประชากรที่บ้านห้วยเขย่งและอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ โดยที่มีประชาการที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตากมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับประชากรที่อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน นอกจากนี้ประชากรที่จังหวัดระนอง ยังมีความใกล้ชิดกับประชากรในจังหวัดกาญจนบุรีกลุ่มที่สาม เมื่อพิจารณาถึงการเกิดวิวัฒนาการของการเวียนของเปลือก มีความเป็นไปได้ว่าลักษณะเปลือกเวียนซ้าย (ประชากรน้ำตกเจ็ดคดพบเฉพาะเปลือกเวียนซ้ายเท่านั้น) อาจจะเป็นลักษณะบรรพบุรุษของหอยนกขมิ้นน้อยปากสีม่วง ในขณะที่ลักษณะเปลือกเวียนขวาอาจจะวิวัฒนาการขึ้นมาภายหลัง ดังจะเห็นได้จากประชากรที่จังหวัดระนอง (พบเฉพาะเปลือกเวียนขวาเท่านั้น) แต่ลำดับขั้นของการเกิดวิวัฒนาการของการเวียนของเปลือกในระดับสกุล นั้นยังไม่ชัดเจนจำเป็นจะต้องเพิ่มชนิดของหอยทั้งสองสกุลย่อยในการวิเคราะห์ให้มากขึ้น

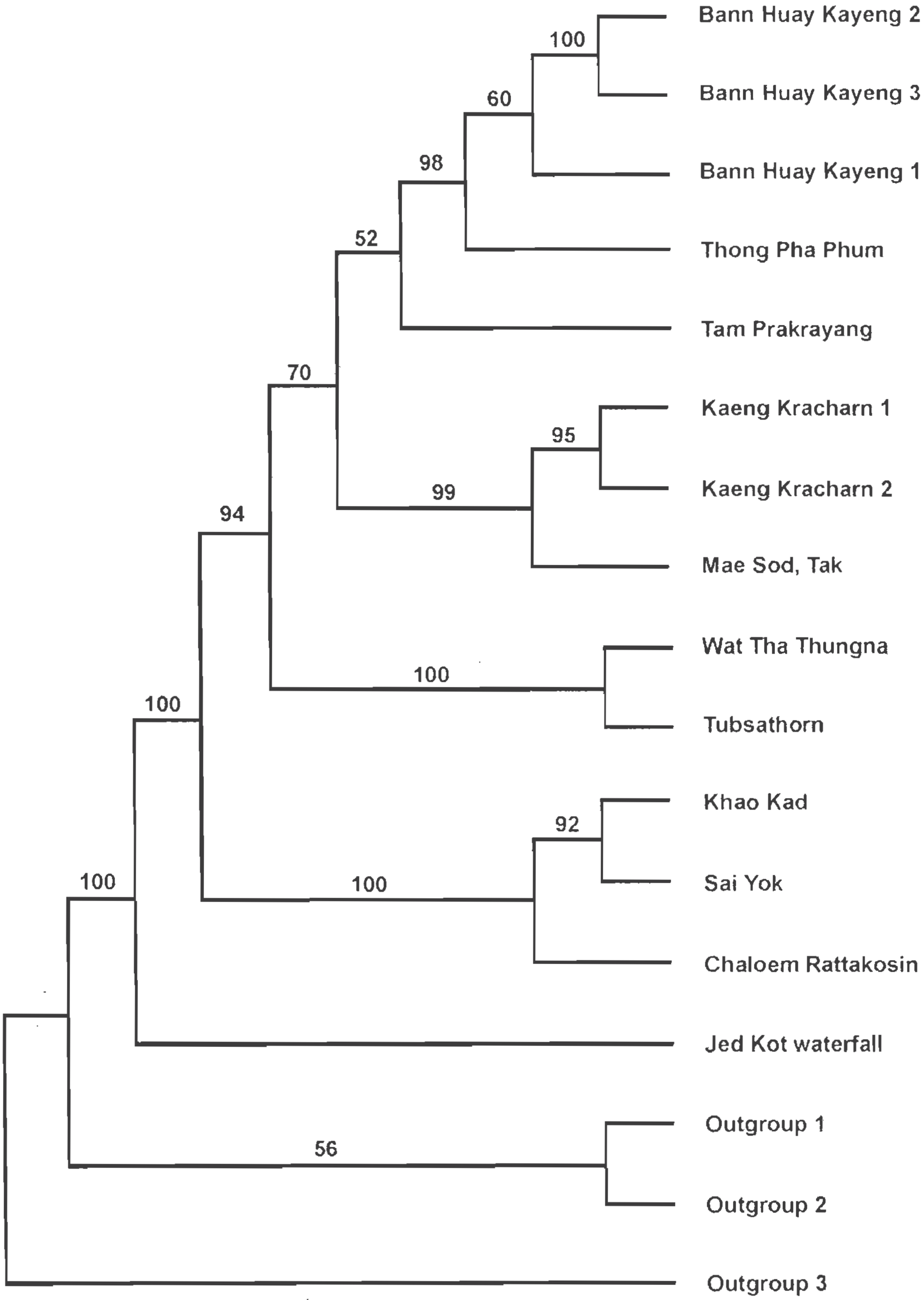
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

รูปแบบการเวียนของเปลือกหอยฝาเดียวในประชากรหนึ่งๆ มักจะแสดงการเวียนของเปลือกเพียงแบบเดียว [เวียนซ้าย (sinistral) หรือเวียนขวา (dextral)] เนื่องจากหอยที่มีเปลือกเวียนต่างจากพวกมักจะไม่สามารถผสมพันธุ์ข้ามกันได้ และมักจะถูกแยกให้เป็นชนิดที่ต่างกัน โดยกระบวนการทางวิวัฒนาการในที่สุด โดยที่การเวียนของเปลือกที่แตกต่างกันส่งผลให้อวัยวะภายในต่างๆ รวมทั้งอวัยวะสืบพันธุ์วางตัวในทิศทางตรงข้ามกัน อย่างไรก็ตามมีเพียงหอยต้นไม้สกุล *Amphidromus* เท่านั้นที่

สามารถพบทั้งตัวเวียนซ้ายและเวียนขวาในประชากรเดียวกัน ด้วยลักษณะของเปลือกที่เป็นทรงยาวเรียว จึงมักพบการผสมพันธุ์ข้ามกันระหว่างตัวที่มีเปลือกเวียนต่างกันได้บ่อยกว่าหอยที่มีเปลือกทรงแบน ด้วยเหตุนี้จึงอาจทำให้ทั้งตัวเวียนซ้ายและเวียนขวาปรากฏและคงอยู่ร่วมกันในประชากรได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้นำวิธีการทาง DNA มาใช้ในการตรวจสอบการแบ่งแยกการสืบพันธุ์ของประชากรหอยที่พบทั้งแบบเวียนซ้ายและเวียนขวา จากการศึกษาของ Johnson et al 1987 และ 1993 พบว่าหอยที่เปลือกเวียนซ้ายและเวียนขวาไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม แสดงให้เห็นว่าทั้งหอยเวียนซ้ายและเวียนขวาสามารถผสมพันธุ์และแลกเปลี่ยนพันธุกรรมกันได้อย่างอิสระ โดยที่การเวียนของเปลือกไม่เป็นอุปสรรคในการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์แต่อย่างใด แต่ความแตกต่างที่พบจะเป็นในระดับระหว่างประชากร โดยประชากรหอยนกขมิ้นน้อยปากสีม่วง ที่น้ำตกเจ็ดคต จังหวัดสระบุรี มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากประชากรที่จังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดตากอย่างสิ้นเชิง สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ mtDNA 16S rRNA gene ในการบ่งชี้ว่าลักษณะใด (เวียนซ้าย หรือเวียนขวา) เป็นลักษณะบรรพบุรุษ จากผลการวิเคราะห์ในขั้นต้นมีแนวโน้มว่าประชากรที่น้ำตกเจ็ดคตซึ่งมีเปลือกเป็นแบบเวียนซ้ายเพียงแบบเดียวอาจเป็นลักษณะบรรพบุรุษของหอยนกขมิ้นน้อยปากสีม่วงโดยที่มีลักษณะเวียนขวาเกิดมาภายหลัง ดังสังเกตุได้จากประชากรที่จังหวัดระนอง ซึ่งพบเพียงการเวียนขวาเพียงแบบเดียว แต่ก็ยังไม่ที่แน่ชัดว่าในระดับสกุลแล้ว ลักษณะเวียนซ้ายยังคงเป็นลักษณะของบรรพบุรุษหรือไม่ ซึ่งต้องรอการวิเคราะห์เพิ่มเติม นอกจากนี้การเก็บตัวอย่างจากหลายพื้นที่ ทำให้พบความผันแปรของลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกทั้งลวดลาย ขนาดและรูปทรงของเปลือก และนอกจากนี้ระบบสืบพันธุ์โดยเฉพาะลวดลายภายในของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ แผ่นฟัน และการจัดเรียงตัวของซี่ฟันและรูปร่างของฟัน มีความแตกต่างจากหอยนกขมิ้นใน 2 สกุลย่อย (*Amphidromus* และ *Syndromus*) ที่มีการค้นพบมาแล้ว และความแตกต่างดังกล่าวนี้มีเหตุผลเพียงพอในการที่จะแยกหอยนกขมิ้นน้อยปากสีม่วง *Amphidromus glaucolarynx* เป็นสกุลย่อยใหม่ออกจากหอยนกขมิ้นทั้งสองสกุลย่อยดังกล่าวได้อย่างชัดเจน อีกทั้งข้อมูลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในเบื้องต้นของ mtDNA 16S rRNA gene ของ Sutcharit, Asami & Panha (2007) สนับสนุนความแตกต่างดังกล่าว อย่างไรก็ดามความสัมพันธ์ในระดับสกุลย่อยยังไม่ชัดเจน



รูปที่ 4 รูป **A-L** ความผันแปรของเปลือหอยนกขนิ้นน้อยปากสีม่วง *Amphidromus glaucolarynx* จากพื้นที่ต่างของประเทศไทย



รูปที่ 5 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของหอยนกขมิ้นน้อยปากสีม่วง *Amphidromus glaucolarynx* จำนวน 11 ประชากร ด้วยวิธี maximum parsimony ตัวเลขแสดง bootstrap probability 100 replicated. Outgroup 1=*Amphidromus perversus*; Outgroup 2=*Amphidromus contrarius*; Outgroup 3=*Camaena illustris*

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษา

ความหลากหลายทางชีวภาพนับเป็นเรื่องที่ทุกคนให้ความสนใจมากในปัจจุบัน โดยเฉพาะภาวะคุกคามอันเป็นผลสืบเนื่องมากจากเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบนโลก ซึ่งการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพนั้นมีหลายส่วน ส่วนที่ความสำคัญมากอันหนึ่งคือความหลากสปีชีส์ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยในการวางนโยบายการจัดการทรัพยากรความหลากหลายที่มีอยู่ในพื้นที่ให้ได้เต็มประสิทธิภาพและยั่งยืน สำหรับประเทศไทยความรู้พื้นฐานของสิ่งมีชีวิตกลุ่มหอย มีอยู่น้อยอย่างจำกัด ซึ่งไม่สอดคล้องกับทรัพยากรความหลากหลายของชนิดพันธุ์และพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่มีอยู่อย่างมากมายในประเทศไทย

5.1 กลุ่มหอยมีฝาปิดเปลือก ได้แก่ Cyclophoridae และ Pupinidae

ผลงานในส่วนนี้ดีพิมพ์เผยแพร่ไปแล้ว 1 เรื่อง (ภาคผนวก 1 เรื่องที่ 1) และอยู่ระหว่างการเตรียมต้นฉบับอีก 1 เรื่องที่เกี่ยวข้องกับหอยงวงท่อสกุล *Rhiostoma*

1. 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. **(IF 2009 = 0.860)**

5.2 กลุ่มหอยนักล่า วงศ์ Streptaxidae และ Diapheridae

ผลงานในส่วนนี้ดีพิมพ์เผยแพร่ไปแล้ว 1 เรื่อง (ภาคผนวก 1 เรื่องที่ 2) และอยู่ระหว่างการเตรียมต้นฉบับอีก 1-2 เรื่องที่เกี่ยวข้องกับหอยนักล่าสกุล *Discartemon* และ *Oophana*

2. Sutcharit, C., Naggs, F., Wade, C.M., Fontanilla, I. and Panha, S. **2010**. The new family Diapheridae, a new species of Diaphera Albers from Thailand and the position of the Diapheridae within a molecular phylogeny of the Streptaxoidea (Pulmonata: Stylommatophora). Zoological Journal of the Linnean Society. 160: 1-16. **(IF 2009 = 2.374)**

5.3 กลุ่มหอยขัดเปลือก Ariphantidae และ Dyakiidae

ผลงานในส่วนนี้ยังไม่ได้ดีพิมพ์เผยแพร่แต่อยู่ระหว่างการแก้ไขต้นฉบับอีก 1-2 เรื่องที่เกี่ยวข้องกับหอยเดื่อใหญ่สกุล *Hemiplecta* และหอยเวียนซ้ายสกุล *Dyakia*

5.4 กลุ่มหอยต้นไม้วงศ์ Camaenidae

ผลงานที่เกี่ยวข้องกับหอยในวงศ์ Camaenidae หอยนกขมิ้น และหอยต้นไม้ที่เคยมีการจัดจำแนกที่สับสนกับหอยในวงศ์นี้ได้ตีพิมพ์เผยแพร่แล้ว 4 เรื่อง (ภาคผนวก 1 เรื่องที่ 3-6) นอกจากนี้ยังมีต้นฉบับเกี่ยวกับการศึกษาหอยในสกุล *Amphidromus* อีก 1 เรื่องที่อยู่ระหว่างการเตรียม และอีก 1 เรื่องได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์แล้ว

3. Sutcharit C. and Panha, S. **2010**. Taxonomic re-evaluation of Chloritis bifoveata (Benson, 1860) and C. diplochone Mollendorff, 1898 (Pulmonata: Camaeniade). Journal of Conchology. 40: 277-285. **(IF 2009 = 0.375)**
4. Panha, S., Sutcharit, C. and Can, D. N. **2010**. An anatomical note on Moellendorffia eastlakeana (Möllendorff, 1882) a camaenid land snail from Vietnam (Pulmonata: Camaenidae). The Nautilus. 124: 20-24. **(IF 2009 = 0.500)**
5. Sutcharit, C., Naggs, F. and Panha, S. **2010**. A first record of the family Cerastidae in Thailand, with a description of a new species (Pulmonata: Othurethra: Cerastidae). The Raffles Bulletin of Zoology. 58: 251-258. **(IF 2009 = 1.365)**
6. Nakadera, Y. Sutcharit, C., Ubukata, T., Seki, K., Utsuno, H., Panha, S. and Asami. T. **2010**. Enatiomorphs differ in shape in opposite directions between population. Journal of Evolutionary Biology. 23: 2377-2384. **(IF 2009 = 3.816)**

เอกสารอ้างอิง

Abbott, R. T. 1989. Compendium of landshells. American Malacologists, Inc. Melbourne, FL and Burlington, MA, 240 pp.

Ahmed M. 1976. Chromosome cytology of marine pelecypod mollusks. Journal of Science. Karachi 4: 77-94.

Asami, T. and Ohba, S. 1982. Shell polymorphism in the land snail Bradybaena similaris in the Kanto District. Sci. Rep. Takao. Mus. Nat. Hist. **11**: 13–28.Cain AJ, Sheppard PM. 1950. Selection in the polymorphic land snail Cepaea nemoralis. Heredity. 4: 275.

Bogan, A.E. 2008. Global diversity of freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia) in freshwater. Hydrobiologia. 595: 139-147.

Bogan, A.E. and Roe, K. 2008. Freshwater bivalve (Unioniformes) diversity, systematics, and evolution: status and future directions. Journal of the North American Benthological Society. 27: 349-369.

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

Bunje, P.M.E. and Lindberg, D.R. 2007. Lineage divergence of a freshwater snail clade associated with post-Tethys marine basin development. Molecular Phylogenetics and Evolution. 42: 373-387.

Butot, L.J.M. and Kiauta, B. 1969. Cytotaxonomy observation in the stylommatophoran family Helicidae, with considerations on the affinities within the family. Malacologia. 9: 261-262.

Cain, A.J. and Sheppard, P.M. 1950. Selection in the polymorphic land snail Cepaea nemoralis. Heredity. 4:275–294.

Cain, A.J. and Sheppard, P.M. 1952. The effects of natural selection on body colour in the land snail Cepaea nemoralis. Heredity. 6: 217–231.

Cain, A.J. and Sheppard, P.M. 1954. Natural selection in Cepaea. Genetics. 39:89–116.

Carter, A. 1983. Cadmium, copper, and zinc in soil animals and their food in a red clover system. Canadian Journal of Zoology. 61: 2751-2757.

Chiba, S. 1999. Accelerated evolution of land snails Mandarina in theoceanic Bonin Islands: evidence from mitochondrial DNA sequences. Evolution. 53:460–471.

Christian, A.D. and Harris, J.L. 2008. An introduction to directions in freshwater mollusk conservation: molecules to ecosystems. Journal of the North American Benthological Society. 27: 345-348.

Clements, R., Ng, P.K.L., Lu, X.X., Ambu, S., Schilthuizen, M. and Bradshaw, C.J.A. 2008. Using biogeographical patterns of endemic land snails to improve conservation planning for limestone karsts. Biological Conservation. 141: 2751-2764.

Dallinger, R. 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: Da Dallinger, R. and Rainbow, P. S. (eds). Ecotoxicology of metals in Invertebrates. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.

Davison, A., Chiba, S., Barton, N.H. and Clarke, B. 2005. Speciation and gene flow between snails of opposite chirality. Plos Biology. 3: 1559-1571.

Dillon, R.T., Earnhardt, C.E., and Smith, T.P. 2004. Reproductive isolation between Physa acuta and Physa gyrina in joint culture. American Malacological Bulletin. 19: 63-68.

Dindal, D.L. and Wurzinger, K. H. 1971. Accumulation and excretion of DDT by the terrestrial snail, Cepaea hortensis. Journal of Environmental Contamination and Toxicology. 6: 362-371.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A raid DNA isolation procedure from small amounts of fresh leaf tissue. Phylochemica Bulletein. 19: 11-15.

Giokas, S. Mylonas, M. and Rolan-alvares, E. 2006. Disassociation between weak sexual isolation and genetic divergence in a hermaphroditic land snail and implications about chirality. Journal of Evolutionary Biology. 19: 1631-1640.

Graf, D.L. and Cummings, K.S. 2009. Actual and alleged freshwater mussels (Mollusca: Bivalvia: Unionoida) from Madagascar and the Mascarenes, with description of a new genus, Germainaia. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. 158: 221-238.

Habe, T. 1964. Operculate land molluscs from Southeast Asia. Fauna and Flora Research Society Kyoto. 4: 111-127.

Habe, T. 1964. Shell of the Western Pacific in colour, vol. I 233 p. Osaka, Japan.

Hausdorf, B. and Hennig, C. 2006. Biogeographical tests of the vicarance model in Mediterranean land snails. Journal of Biogeography. 33: 1202-1211.

Jurado-Rivera JA, Vogler AP, Reid CAM, Petitpierre, E. and Gomez-Zurita J. 2009. DNA barcoding insect-host plant associations. Proceedings of the Royal Society B-Bilogical Sciences. 276: 639-648.

Keawjam, R.S. and Upatham, E.S. 1990. Shell morphology, reproductive anatomy and genetic patterns of three species of apple snails of the genus Pomacea. Journal of Medical and Applied Malacology. 2:45–57.

Kerney, M.P. and Cameron, R.A.D. 1979. A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe. Collins, London.

Kira, T. and Habe, T. 1965. Shell of the Western Pacific in colour, vol. II. Osaka, Japan.

Kohler , H. R., Rahman, B., Graff, S., Barkus, M. and Triebskorn, R. 1996. Expression of the stress-70 protein family (hsp70) due to heavy metal in the slug, Deroceras reticulatum : an approach to monitor sublethal stress conditions. Chemosphere. 33: 1327-1340.

Kohler , H. R., Triebskorn, R. Stocker, W., Kloetzel, P. M. and Alberti, G. 1992. The 70 Kd heat shock protein in soil invertebrates: a possible tool for monitoring environmental toxicants. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 22: 334-338.

Kolar, C.S. and Lodge, D.M. 2001. Progress in invasion biology: predicting invaders. Trends in Ecology and Evolution. 16: 199–204.

Kolnicki, R. L. 2000. Kinetochore reproduction in animal evolution: Cell biological explanation of karyotypic fission theory. Proceeding of the National Academy of Science. USA. 97: 9493-9497.

Komai, T. and Emura, S. 1955. A study of population genetics of the polymorphic land snail Bradybaena similaris. Evolution. 9: 400-418.

Kongim, B., Naggs, F. and Panha, S. 2006. Karyotype of operculate land snails of the genus Cyclophorus (Prosobranchia: Cyclophoridae) in Thailand. Invertebrate Reproduction and Development. 49: 1-8.

Kumar, S., Dudley, J., Nei, M. and Tamura, K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings in Bioinformatics. 9: 299-306.

Laidlaw, F.F. and Solem, A. 1961. The land snail genus Amphidromus, a synoptic catalogue. Fieldiana Zoology. 41: 507-677.

Laskowski, R. and Hopkin, S.P. 1996. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (Helix aspersa): implications for predators. Environmental Pollution. 91: 289-297.

Liu, H.P. and Hershler, R. 2005. Molecular systematics and radiation of western North American nymphophiline gastropods. Molecular Phylogenetics and Evolution. 34: 284-298.

Marigomez, J.A., Soto, M. and Kortabitarte, M. 1996. Tissue-level biomarkers and biological effect of mercury on sentinel slugs, Arion ater. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 31: 54-62.

Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press, New York.

Panha, S. 1995-1996. A checklist and classification of the terrestrial pulmonate snail of Thailand. Walkerana. 8: 31-40.

Panha, S. and Burch, J.B. 2005. Microsnail of Thailand. Malacological Review. 37/38: 1-155.

Parmakelis, A. and Mylonas, M. 2004. Dispersal and population structure of two sympatric species of the mediterranean land snail genus Mastus (Gastropoda, Pulmonata, Enidae). Biological Journal of the Linnean Society. 83: 131-144.

Patterson C.M. and Burch, J.B. 1978. Chromosomes of pulmonate mollusks. In: Fretter V, J Peake, (eds). Pulmonates: Systematics and Ecology. New York: Academic Press, pp. 171-217.

Pearson, R.G. and Boyero, L. 2009. Gradients in regional diversity of freshwater taxa. Journal of the North American Benthological Society. 28: 504-514.

Pfenninger, M. and Schwenk, K. 2007. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. BMC Evolutionary Biology. 7: 121-126.

Pilsbry, H. A. 1900. Manual of Conchology, structural and systematic with illustrations of the species, Series 2, Vol. 13. Academy of Natural Sciences of Philadelphia, Philadelphia.

Reichardt, A., Rabond, C., Burla, H. and Baur, B. 1985. Cause of death and possible regulatory processes in Arianta arbustorum (L.,1758) (Pulmonata, Helicidae). Basteria. 49: 37-46.

Rozas, J., Sanchez-delbarrio, J.C., Messeguer, X. and Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics. 19: 2496-2497.

Solem, A. 1965. Land snails of the genus Amphidromus from Thailand (Mollusca: Pulmonata: Camaenidae). Proceeding of the United States National Museum. 117: 615-627.

Strong, E.E., Gargominy, O., Ponder, W.F. and Bouchet, P. 2008. Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. Hydrobiologia. 595: 149-166.

Sutcharit, C., and Panha, S. 2006. Taxonomic review of the tree snail Amphidromus Albers, 1850 (Pulmonata: Camaenidae) in Thailand and adjacent areas: Subgenus Amphidromus. Journal of Molluscan Studies. 72: 1-30.

Sutcharit, C., Asami, T. and Panha, S. 2007. Evolution of whole-body enantiomorphy in the tree snail genus Amphidromus. Journal of Evolutionary Biology. 20: 661-672.

Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. Genetics. 105: 437-460.

Tempel, D.J., Cilimburg, A.B. and Wright, V. 2004.The status and management of exotic and invasive species in national wildlife refuge wilderness areas. Natural Areas Journal. 24:300–306.

Tesana, S., Srisawangwong, T., Sithithaworn, P. and Laha, T. 2008. Angiostrongylus cantonensis: experimental study on the susceptibility of apple snails, Pomacea canaliculata compared to Pila polita. Experimental Parasitology. 118:531-535.

Thiriot- Quiévreux, C. 1994. Advances in cytogeneics of aquatic organisms. In: Genetics and evolution of aquatic organism. pp. 369-388.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weight, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleotide Acids Research. 22: 4673-4680.

Tongkerd, P., Lee, T., Panha, S., Burch, J.B. and O' Foighil, D. 2004. Molecular Phylogeny of Certain Thai Micro Land Snails (Stylommatophora; Pupillidae; Gastrocoptinae) Inferred from Mitochondrial and Nuclear Ribosomal DNA Sequences. Journal of Molluscan Studies. 70: 139-147.

Upatham, E.S., Kruatrachu, M. and Baidikul, V. 1988. Cultivation of the giant African snail, Achatina fulica. Journal of the Science Society of Thailand. 14: 25-40.

Wade, C.M., Mordan, P.B. and Naggs, F. 2006. Evolutionary relationships among the pulmonate land snails and slugs (Pulmonata, Stylommatophora). Biological Journal of the Linnean Society. 87: 593-610.

Wangkulangkul, K. and Lheknim, V. 2008. The occurence of an invasive alien mussel Mytilopsis adamsi Morrison, 1946 (Bivalvia: Dreissenidae) in estuaries and lagoons of the lower south of the Gulf of Thailand with comments on their establishment. Journal Aquatic Invasions. 3:325-330.

Weerd de, D.R.U., Groenenberg, D.S.J., Schilthuizen, M. and Gittenberger, E. 2006. Reproductive character displacement by inversion of coiling in clausiliid snails (Gastropoda, Pulmonata). Biological Journal of the Linnean Society. 88: 155-164.

Wiwegweaw, A., Seki, K., Mori, H. & Asami, T. 2009. Asymmetric reproductive isolation during simultaneous reciprocal mating in pulmonates. Biology Letters. 5: 240-243.

Woodruff, D.S. and Solem, A. 1990. Allozyme variation in the Australian camaenid land snail Cristilabrum primum: A prolegomenon for a molecular phylogeny of an extraorinary radiation in an isolated habitat. Veliger. 33: 129–139.

Zhang, J.M., Wang, J.X., Xia, T. and Zhou, S. 2009. DNA barcoding: species delimitation in tree peonies. Science in Cina series C: Life Sciences. 52: 568-578.

Zilch, A. 1959. Gastropoda, Euthyneura. In: O. H. Schindewolf (ed.). Handbuch der Paleozoologie, 6: 1–400. Gebrüder Borntraeger, Berlin.

ภาคผนวก 1
สรุปผลงานตีพิมพ์ภายใต้ทุนวิจัยโครงการนำร่อง

1. 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. **(IF 2009 = 0.860)**
2. Sutcharit, C., Naggs, F., Wade, C.M., Fontanilla, I. and Panha, S. **2010**. The new family Diapheridae, a new species of Diaphera Albers from Thailand and the position of the Diapheridae within a molecular phylogeny of the Streptaxoidea (Pulmonata: Stylommatophora). Zoological Journal of the Linnean Society. 160: 1-16. **(IF 2009 = 2.374)**
3. Sutcharit C. and Panha, S. **2010**. Taxonomic re-evaluation of Chloritis bifoveata (Benson, 1860) and C. diplochone Mollendorff, 1898 (Pulmonata: Camaeniade). Journal of Conchology. 40: 277-285. **(IF 2009 = 0.375)**
4. Panha, S., Sutcharit, C. and Can, D. N. **2010**. An anatomical note on Moellendorffia eastlakeana (Möllendorff, 1882) a camaenid land snail from Vietnam (Pulmonata: Camaenidae). The Nautilus. 124: 20-24. **(IF 2009 = 0.500)**
5. Sutcharit, C., Naggs, F. and Panha, S. **2010**. A first record of the family Cerastidae in Thailand, with a description of a new species (Pulmonata: Othurethra: Cerastidae). The Raffles Bulletin of Zoology. 58: 251-258. **(IF 2009 = 1.365)**
6. Nakadera, Y. Sutcharit, C., Ubukata, T., Seki, K., Utsuno, H., Panha, S. and Asami. T. **2010**. Enatiomorphs differ in shape in opposite directions between population. Journal of Evolutionary Biology. 23: 2377-2384. **(IF 2009 = 3.816)**

ผลงานตีพิมพ์ฉบับที่ 1

Zoological Studies **49**(1): 125-131 (2010)

Zoological Studies

Karyotype Variations in the Genus *Pollicaria* (Caenogastropoda: Pupinidae)

Bangon Kongim[1], Chirasak Sutcharit[2], Piyoros Tongkerd[2], Shau-Hwai Aileen Tan[3], Nguyen Xuan Quynh[4], Fred Naggs[5], and Somsak Panha[2,*]

[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand*
[2]*Animal Systematics Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*
[3]*School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, Minden, Penang 11800, Malaysia*
[4]*Faculty of Biology, Hanoi University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam*
[5]*Department of Zoology, The Natural History Museum, London SW7 5BD, UK*

(Accepted May 5, 2009)

Bangon Kongim, Chirasak Sutcharit, Piyoros Tongkerd, Shau-Hwai Aileen Tan, Nguyen Xuan Quynh, Fred Naggs, and Somsak Panha (2010) Karyotype variations in the genus *Pollicaria* (Caenogastropoda: Pupinidae). *Zoological Studies* **49**(1): 125-131. The karyotypes of 4 recognized Southeast Asian species of the genus *Pollicaria* were examined. All 7 populations studied were found to possess the same chromosome pattern: $n = 13$, $2n = 26$. However, the fundamental chromosome number (FN) of both populations of *P. elephas* from the south (Malaysia) was 46, while those for the other 3 species (5 populations) were all 50. Moreover, although each species had a unique karyotype, the karyotype of the isolated species, *P. elephas*, differed from the other 3 northern species in exhibiting 3 distinct telocentric chromosomes (2m+6sm+2st+3t). The 3 smaller species, *P. mouhoti* from northeastern Thailand, *P. myersii* from Laos, and *P. gravida* from 2 localities in northern Vietnam, exhibited similar karyotypes of 6m+4sm+2st+1t, 4m+6sm+2st+1t, and (3m+7sm+2st+1t and 2m+8sm+2st+1t) respectively, with only 1 telocentric chromosome. The karyotypes of the 2 morphologically variant populations of *P. gravida* from Vietnam differed by 1 in the number of metacentric and submetacentric chromosomes. The genus *Pollicaria* exhibits slight rearrangements in the centromeric positions of the smaller chromosomes and the deletion of 1 chromosome pair. A ZZ-ZW sex-determining system is proposed for this genus. http://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/49.1/125.pdf

Key words: Operculate snails, *Pollicaria*, Karyotype variation, Sex determination, Sex chromosome.

The operculate land-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, has an expanded aperture in the adult, and is orange. Although the isolated, southern species, *P. elephas*, which is the largest of the species, has a cream-colored shell, the aperture and peristome of the shell are bright orange (Morgan 1885, Pain 1974). The distributional range of *Pollicaria* is quite narrow, with at least 4 species from the genus having been recorded in the northern part of Southeast Asia (Myanmar, Thailand, Cambodia, Laos, and Vietnam) and only 1 species, *P. elephas*, recorded in the south, on the Malay Peninsula (Morgan 1885, Kobelt 1902, Pain 1974). So far, the 4 recognized species of *Pollicaria* have been entirely discriminated based on shell characters

*To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Tel and Fax: 66-2-2185273. E-mail:somsakp@sc.chula.ac.th; somsak.pan@chula.ac.th

(Crosse 1885, Fischer 1885, Pain 1974). Even the recent work by Pain (1974), a revision of the systematics of *Pollicaria*, was based solely upon shell morphology, with *P. gravida* from Vietnam being hypothesized to have 2 shell morphotypes (i.e., a large, brown-shelled form and a smaller, orange form, Fig. 1). In this study, we karyologically analyzed both morphotypes of *P. gravida* using samples of the smaller form collected from Cuc Phuong National Park and of the large form from Khe Se in northern Vietnam. We compared these forms with 3 other *Pollicaria* species. Our initial anatomical investigation of *Pollicaria* indicated that the 2 morphotypes of *P. gravida* were conspecific, as suggested by Pain (1974), but the karyotypic analysis presented here suggests that the 2 forms are distinct species.

The karyotypes of the 4 species of *Pollicaria* from Thailand, Laos, Vietnam, and Malaysia, presented herein, represent the 1st karyotypic analysis of the genus *Pollicaria*.

MATERIALS AND METHODS

The locality, sex (i.e., determined by the presence/absence of a penis near the lower right tentacle), and number of snails karyotyped are given in figures 1, 2 and table 1. 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, UK (NHM), Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France (NMHN) and Senckenberg Museum, Frankfurt, Germany (SMF).

Chromosome preparations were made from metaphase-arrested gonadal tissue of both males and females using an air-drying method modified from Patterson and Burch (1978) and Park (1994). Gonads were enriched for mitotic metaphase cells by the direct injection with 0.1 ml of 0.1% colchicine (Sigma, D-89552 Steinheim, Germany). After a period of 4 h, the gonads were dissected and cut into small pieces after being placed in a 0.07% hypotonic KCl solution. The separated cells were collected by centrifugation at 1000 rpm for 10 min, and were subsequently fixed in fresh Carnoy's fixative (3 parts absolute ethanol with

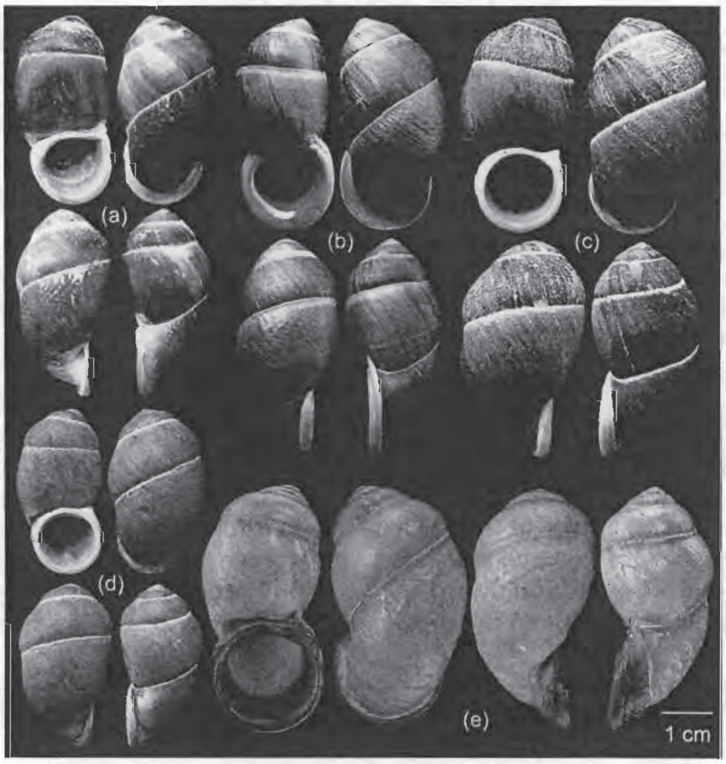


Fig. 1. Shells of (a) *Pollicaria mouhoti*, (b) *P. myersii*, (c) *P. gravida* (big brown shell), (d) *P. gravida* (small orange shell), and (e) *P. elephas*.

1 part glacial acetic acid). The supernatant was replaced with fresh fixative for each of 2 centrifugation-based washes. The cells were re-suspended, and the suspensions were placed on clean glass slides, which had been preheated to 60°C. The slides were air-dried and then stained with a 4% Giemsa solution for 15 min. Photomicrographs of 10 well-spread metaphase

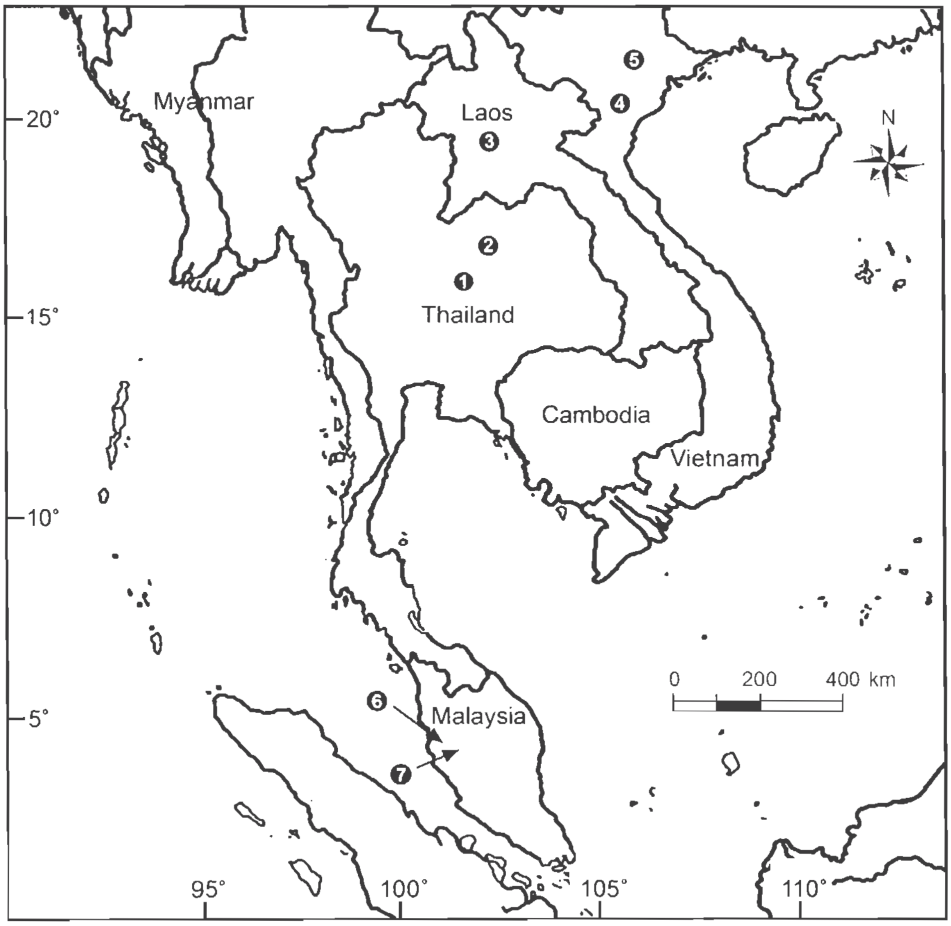


Fig. 2. Southeast Asian localities where *Pollicaria* was sampled in this study. Collection locality numbers are the same as those in table 1.

Table 1. Scientific names, sample localities, diploid number (2*n*), fundamental number (FN), and karyotype formula of species of *Pollicaria* investigated in the present study

Scientific name	Locality	Sex	No.	(2*n*, FN)	Karyotype
P. mouhoti (Pfeiffer, 1862)	1. Chiayaphum, Thailand	Male, Female	10, 9	26, 50	6m+4sm+2st+1t
P. mouhoti (Pfeiffer, 1862)	2. Khon Kaen, Thailand	Male, Female	9, 7	26, 50	6m+4sm+2st+1t
P. myersii (Haines, 1858)	3. Vang Vieng, Laos	Male, Female	10, 6	26, 50	4m+6sm+2st+1t
P. gravida (Benson, 1856) (small orange shell)	4. Cuc Phuong, Ninh Binh, Vietnam	Male	10	26, 50	2m+8sm+2st+1t
P. gravida (Benson, 1856) (big brown shell)	5. Khe Se, Vietnam	Male	10	26, 50	3m+7sm+2st+1t
P. elephas (Morgan, 1885)	6. Tangung Rambutan, Ipoh, Perak, Malaysia	Male, Female	10, 10	26, 46	2m+6sm+2st+3t
P. elephas (Morgan, 1885)	7. Gunung Genting, Ipoh, Perak, Malaysia	Male, Female	10, 10	26, 46	2m+6sm+2st+3t

m, metacentric; sm, submetacentric; st, subtelocentric; t, telocentric chromosome.

cells were measured to evaluate the relative length and centromeric index. Mitotic karyotype images were arranged and numbered for chromosome pairs in order of the decreasing mean relative length; the nomenclature of morphological chromosome types followed that of Levan et al. (1964).

RESULTS

The 4 species (from 7 populations) of *Pollicaria* all exhibited the same number of haploid and diploid chromosomes (n = 13, 2n = 26), but the 2 fundamental chromosome numbers (FNs) were 46 in both *P. elephas* populations, compared to 50 in the other 3 species.

Each species possessed a unique karyotype, but the isolated Malaysian species, *P. elephas*, significantly differed from the other 3 northern species. It exhibited 3 distinct telocentric chromosomes (2m+6sm+2st+3t), in contrast to the single telomeric chromosome of the 3 northern species. The karyotypes of *P. mouhoti* from northeastern Thailand, *P. myersii* from Laos, and *P. gravida* from 2 localities in northern Vietnam were more similar to each other than to that of *P. elephas* and were respectively 6m+4sm+2st+1t, 4m+6sm+2st+1t, and (3m+7sm+2st+1t and 2m+8sm+2st+1t) (Figs. 3, 4, Table 1). The number of metacentric and submetacentric chromosomes of the 2 morphologically variant populations of *P. gravida* from Vietnam (Fig. 1, Table 1) differed by 1.

Comparison of the female karyotypes of the 4 species, *P. mouhoti* from Chiayaphum, Thailand, *P. myesii* from Vang Vieng, Laos, *P. elephas* from Ipoh, Malaysia, and *P. gravida* from Cuc Phuong, Vietnam, revealed distinct size heteromorphism of metacentric and submetacentric chromosome pairs akin to ZW chromosomes (Fig. 4). In contrast, all of the males examined had homologous pairs of chromosomes. This suggests the presence of ZZ-ZW sex chromosomes (ZZ in males and ZW in females) and a probable sex-determining system.

The 3 northern species showed a larger portion of metacentric chromosomes than telocentric chromosomes with a ratio of 10: 3. In contrast, the southern species, *P. elephas*, has a ratio of 8: 5, and this evidence indicates that chromosome rearrangements have occurred in *Pollicaria*. The form, aperture, and color of the shell of *P. elephas* greatly differed from those of the other 3 species (Fig. 1).

DISCUSSION

Karyotype data offer valuable systematic characters in cyclophoroideans because the metaphase chromosomes in the group exhibit a clear bi-armed form which is rarely found in land pulmonate snails (Burch 1967, Kongim 2006). Chromosome numbers in the superfamily Cyclophoroidea are highly conserved. For example, the very common genus *Cyclophorus* shows a relatively invariable low diploid number (2n = 28), the presence of 2 distinct size groups, and the numerical predominance of metacentrics in both size groups, while some species contain

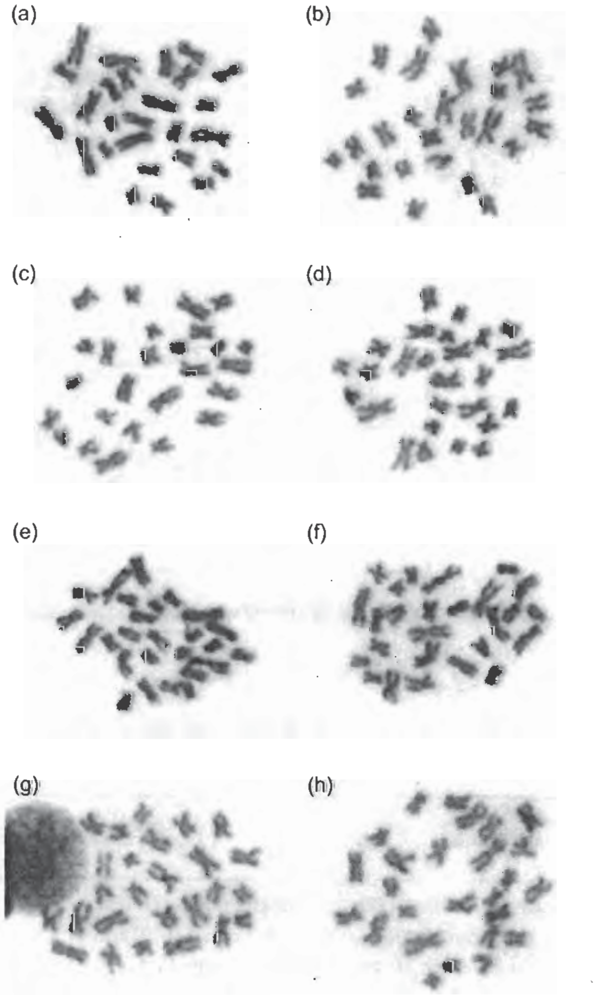


Fig. 3. Mitotic chromosome spreads of the 4 recognized Southeast Asian *Pollicaria* species: (a) *Pollicaria mouhoti* (male); (b) *P. mouhoti* (female); (c) *P. myersii* (male); (d) *P. myersii* (female); (e) *P. elephas* (male); (f) *P. elephas* (female); (g) *P. gravida* (male of big brown shell); and (h) *P. gravida* (male of small orange shell).

only metacentric chromosomes (Kasinathan and Natarajan 1975, Choudhury and Pandit 1997, Kongim et al. 2006). The 10 tiny cyclophoroideans belonging to *Diplommatina* also show a conservative chromosome number similar to that of *Pollicaria* (2*n* = 26) and similar morphologies of the metacentric and submetacentric chromosomes (Ieyama and Tada 1991, Ieyama et al. 1993, Ogaito and Ieyama 1997, Ieyama and Ogaito 1998 2000). Also within the Pupinidae, Burch (1967) demonstrated the presence of haploid (*n* = 13) and diploid chromosome numbers (2*n* = 26) in *Pupina* sp.

Karyotypes of *Pollicaria* described in this study indicate a divergence in characteristics of both karyotype formation and the lesser FN value between *P. elephas*, and the 3 other species analyzed. This result is consistent with the current geographic distribution of these taxa. *Pollicaria elephas* is the only species recorded from the south, whereas the other 3 species have been recorded from more-northerly parts of Southeast Asia.

In contrast to *P. elephas* which has a telocentric karyotype, the 3 northern species have karyotypes that share many similarities with each other, such as metacentricity mostly in pairs 1 to 9, and an FN value of 50. According to White (1978a), karyotypes with a higher proportion of metacentric chromosomes are probably primitive, and show relative stability, a notion that is supported by the degree of asymmetry in karyotypes where the primitive karyotype has the lowest asymmetry and the derived karyotype has higher asymmetry (Diupotex-Chong et al. 2004). Thus, in showing the highest asymmetry, with 2m+6sm+2st+3t, the karyotype of *P. elephas* is hypothesized as exhibiting a derived character state within *Pollicaria*, whereas the karyotype with the lowest asymmetry in *Pollicaria*, exhibited by *P. mouhoti* (Thailand) with 6m+4sm+2st+1t, is hypothesized to be a plesiomorphic state.

As is currently known, *P. gravida* ranges in distribution from Myanmar (type locality) to Vietnam and is notable for exhibiting significant variation in shell morphology. Nevertheless, our examination of shells from various natural history museums in Europe showed that the shell characters described above are a consistent feature of this species. It is, therefore, noteworthy that comparisons of the karyotypes of populations of *P. gravida* from Khe Se and Cuc Phuong, northern Vietnam differed (i.e., 3m+7sm+2st+1t and 2m+8sm+2st+1t, respectively), as did the shell morphology, particularly the shell size and color of the periostracum. These differences are consistent with King's (1993) suggestion that the 2 populations are distinct species. Karyotypic

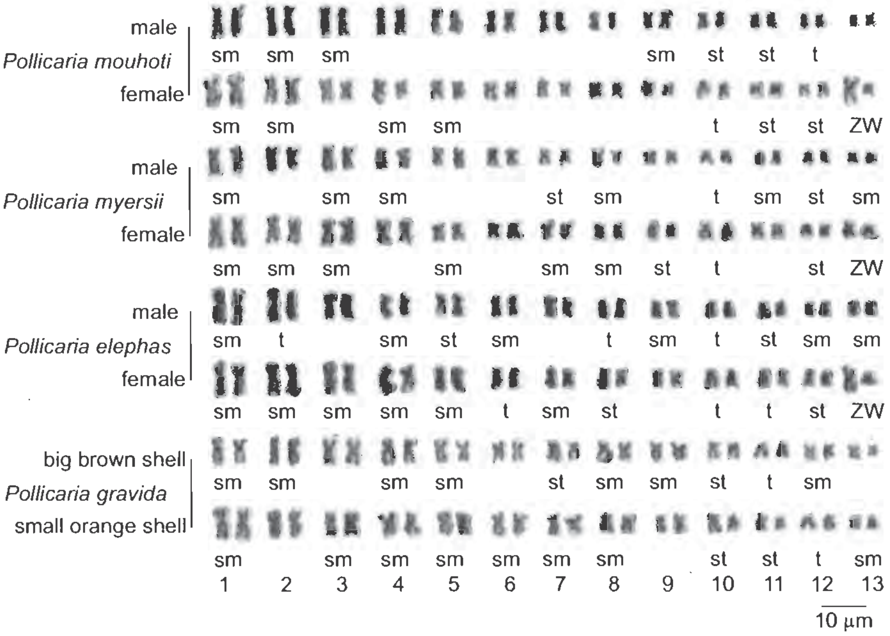


Fig. 4. Karyotypes of the 4 recognized Southeast Asian *Pollicaria* species: *P. mouhoti* (male above and female below); *P. myersii* (male above and female below); *P. elephas* (male above and female below); *P. gravida* (big brown shell above and small orange shell below). Metacentric (unlabeled); sm, submetacentric; st, subtelocentric; t, telocentric.

divergence may occur as part of population differentiation, as well as an adaptive component in phyletic evolution (Bickham and Baker 1979, Bush et al. 1977, White 1973 1978b, Espinosa et al. 2007). Such chromosomal differences are often associated with species-level differentiation and may in some cases either cause or reinforce speciation events (Swanson et al. 1967, Patton and Sherwood 1983, Clark and Wall 1996, Rickart et al. 1999)

The ZZ/ZW-type sex chromosome determination is known to occur in *Cyclophorus* (Caenogastropoda: Cyclophoridae) (Kongim et al. 2006) and other related gastropods (Baršienė and Ribi 1998–1999, Baršienė et al. 2000). The likely existence of ZZ/ZW sex chromosomes and thus a sex -determining system in *Pollicaria* is not conclusive given the rapid and multiple evolution of different sex-determining systems including ZZ/ZW as exhibited between other closely related animals such as in the Lepidoptera (Yoshido et al. 2005, Traut et al. 2008).

As with other cyclophoroideans, species boundaries between allopatric populations are extremely difficult to determine. For example, an anatomical study of *P. elephas* by Fischer (1885) and an investigation including the 'soft' anatomy (unpublished investigation by BK) found that the 3 species of *P. elephas* from Ipoh, Malaysia, *P. myersii* from Laos, and *P. mouhoti* from Thailand, showed no significant differences. With current evidence, morphological information alone provides insufficiently distinct characters to allow recognition of species within the Cyclophoroidea (Kongim 2006, Lee et al. 2008). Karyotype analysis in combination with anatomical information and karyotype analysis is proving to be a valuable tool for determining species-level boundaries and relationships in terrestrial operculate snails.

Acknowledgments: We are indebted to R. Janssen (SMF, Frankfurt), P. Bouchet, and V. Héros (MNHN, Paris) for kindly permitting C. Sutcharit and S. Panha to study type specimens. We are also grateful to Z. Yasin, B.W. Ng, N. Razalli, P. Prasankok, P. Pimwichai, and R. Chanaboon for assistance with fieldwork. This project were funded by the BRT Program (TRF-CNRS) and the CHE-RG to S. Panha, Mahasarakham Univ. (grant year 2008) and the Darwin Initiative (grant 15-018).

REFERENCES

Abbott RT. 1989. Compendium of landshells. Melbourne, FL: American Malacologists.

Baršienė J, G Ribi. 1998-1999. Karyological studies of *Viviparus ater* (Gastropoda: Prosobranchia) from different populations in Switzerland. Malacol. Rev. **31-32:** 93-100.

Baršienė J, G Ribi, D Barsyte. 2000. Comparative karyological analysis of five species of *Viviparus* (Gastropoda: Prosobranchia). J. Moll. Stud. **66:** 259-271.

Benson WH. 1856. Characters of seventeen new forms of the Cyclostomacea from the British Provinces of Burmah, collected by W. Theobald, jun., Esq. Ann. Mag. Nat. Hist. Lond. Ser 2, **17:** 225-233.

Benson WH. 1859. Observation of shell and animal of *Hybocystis*, a new genus of Cyclostomidae, base on *Megalostoma gravidum* and *Otopoma blennus*, B; with notes on other living shells from India and Burmah. Ann Mag Nat Hist Lond. Ser 3, **4:** 90-93.

Bickham JW, RJ Baker. 1979. Canalization model of chromosome evolution. Bull. Carnegie Mus. Nat. Hist. **13:** 70-84.

Burch JB. 1967. Cytological relationship of Pacific gastropods. Venus. **25:** 118-135.

Bush GL, SM Case, AC Wilson, JL Patton. 1977. Rapid speciation and chromosomal evolution in animals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74:** 3942-3946.

Choundhury RC, RK Pandit. 1997. Chromosome of prosobranch gastropods from Viviparidae, Pilidae and Cyclophoridae (Order Mesogastropoda). Caryologia. **50:** 303-315.

Clark MS, WJ Wall. 1996. Chromosome: the complex code. Oxford, UK: Alden Press.

Crosse H. 1885. Etude monographique sur les espèces du genre *Hybocystis* de Benson. J. Conch. Paris. **33:** 180-193

Diupotex-Chong ML, N Cazzaniga, A Hernández-Santoyo, JM Betancourt-Rule. 2004. Karyotype description of *Pomacea patula catemacensis* (Caenogastropoda, Ampullariidae), with an assessment of the taxonomic status of *Pomacea patula*. Biocell **28:** 279-285.

Espinosa F, I Dominguez, JC Garcia-Gomez. 2007. Chromosome and cytological analysis of the endangered limpet *Patella ferruginea* Gmelin, 1791 (Gastropoda: Patellidae): taxonomical and monitoring implications. J. Conch. **39:** 347-356.

Fischer P. 1885. Note sur l'animal de l'*Hybocystis elephas* de Morgan. J. Conch. Paris. **33:** 174-179.

Gould AA. 1856. Descriptions of shells. Proc. Boston Soc. Nat. Hist. **6:** 11-16.

Gude GK. 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.

Habe T. 1964. Operculate land molluscs from Southeast Asia. Fauna. Flora. Res. Soc. Kyoto **4:** 111-127.

Haines WA. 1858. Descriptions of four new species of terrestrial shells from Siam. Ann. Lyc. Nat. Hist. NY **6:** 157-158.

Ieyama H, S Henmi, A Tada. 1993. Chromosomal studies and quantitative evaluation of cellular DNA in several species of the Diplommatinidae (Mollusca: Gastropoda). Mem. Fac. Educ. Ehime Univ. Nat. Sci. **13:** 33-39.

Ieyama H, H Ogaito. 1998. Chromosomes and nuclear DNA

contents of two species in the Diplommatinidae. Venus **57:** 133-136.
Ieyama H, H Ogaito. 2000. Chromosomes and nuclear DNA contents of some species in the Diplommatinidae. Venus **59:** 217-224.
Ieyama H, A Tada. 1991. Chromosomal studies and the quantitative evaluation of nuclear images stained with Feulgen dye of the Diplommatinidae. Venus **50:** 68-78.
Kasinathan R, R Natarajan. 1975. Chromosome numbers of five species of Cyclophoridae (Prosobranchia: Mesogastropoda) from South India. Malacol. Rev. **8:** 109-110.
King M. 1993. Species evolution: the role of chromosome change. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press.
Kobelt W. 1902. Cyclophoridae. Berlin: Das Tiereich, Friedländer and Son.
Kongim B. 2006. Taxonomy and systematics of operculate land snails genus *Cyclophorus* Montfort, 1810 in Thailand. PhD dissertation. Chulalongkorn Univ., Bangkok. Thailand.
Kongim B, S Panha, F Naggs. 2006. Karyotype of land operculate snails of the genus *Cyclophorus* (Prosobranchia: Cyclophoridae) in Thailand. Invert. Rep. Develop. **49:** 1-8.
Lee YC, KY Lue, WL Wu. 2008. A molecular phylogenetic investigation of *Cyathopoma* (Prosobranchia: Cyclophoridae) in East Asia. Zool. Stud. **47:** 591-604.
Levan A, K Frega, AA Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position chromosomes. Heredity **52:** 201-205.
Mabille J. 1887. Sur quelques mollusques du Tonkin. Bull. Malacol. Soc. Fr. **4:** 73-164.
Morgan de J. 1885. Mollusques terrestres et fluviatiles de Royaume de Pérak et des pays voisins (presqu'ile malaise). Bull. Soc. Zool. Fr. **10:** 353-429.
Ogaito H, H Ieyama. 1997. *Diplommatina* (*Sinica*) *hidaensis* n. sp. (Diplommatinidae) from mountains districts of Gifu and Nagano Prefectures, Central Japan. Venus. **56:** 197-203.
Pain T. 1974. The land operculate genus *Pollicaria* Gould (Gastropoda), a systematic revision. J. Conchol **28:** 173-178.
Park GM. 1994. Cytotaxonomic studies of freshwater gastropods in Korea. Malac. Rev. **27:** 23-41.
Patterson CM, JB Burch. 1978. Chromosomes of pulmonate mollusks. *In* V Fretter, J Peake, eds. Pulmonates: systematics and ecology. New York: Academic Press, pp. 171-217.
Patton JL, SW Sherwood. 1983. Chromosome evolution and speciation in rodents. Ann. Rev. Ecol. Syst. **14:** 139-158.
Pfeiffer L. 1862. Descriptions of thirty-six new land shells, from the collection of H. Cuming, Esq. Proc. Zool. Soc. Lond. **1862:** 268-278.
Rickart EA, JA Mercier, LR Heanney. 1999. Cytogeography of Philippine bats (Mammalia: Chiroptera). Proc. Biol. Soc. Washington **112:** 453-459.
Solem A. 1966. Some non marine mollusks from Thailand. Spolia. Zool. Mus. Haun. **24:** 9-13.
Swanson CP, T Merz, WJ Young. 1967. Cytogenetics. New Jersey, USA: Prentice Hall, Inc.
Traut W, K Sahara, F Marec. 2008. Sex chromosome and sex determination in Lepidoptera. Sex Develop. **1:** 332-346.
White MDJ. 1973. Animal cytology and evolution. London/ New York: Cambridge Univ. Press.
White MDJ. 1978a. Chain processes in chromosomal speciation. Syst. Zool. **27:** 17-26.
White MDJ. 1978b. Modes of speciation. San Francisco, CA: WH Freeman.
Yoshido A, F Marec, K Sahara. 2005. Resolution of sex chromosome constitution by genomic in situ hybridization and fluorescence *in situ* hybridization with (TTAGG)n telomeric probe in some species of Lepidoptera. Chromosoma **114:** 193-202.

ผลงานตีพิมพ์ฉบับที่ 2

THE LINNEAN SOCIETY of London ZOOLOGICAL Journal of the Linnean Society

Zoological Journal of the Linnean Society, 2010, **160**, 1–16. With 3 figures

The new family Diapheridae, a new species of *Diaphera* Albers from Thailand, and the position of the Diapheridae within a molecular phylogeny of the Streptaxoidea (Pulmonata: Stylommatophora)

CHIRASAK SUTCHARIT[1], FRED NAGGS[2], CHRISTOPHER M. WADE[3], IAN FONTANILLA[3] and SOMSAK PANHA[1]*

[1]*Animal Systematic Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*
[2]*Department of Zoology, The Natural History Museum, London SW7 5BD, UK*
[3]*Institute of Genetics, University of Nottingham, Queens Medical Centre, Clifton Boulevard, Nottingham NG7 2UH, UK*

Received 27 November 2008; accepted for publication 17 May 2009

The Streptaxoidea are an ancient and species diverse group that is poorly understood. Examination of the reproductive anatomy of *Diaphera* showed it to be notably distinct from that of most other streptaxid genera but to exhibit similarities with the reproductive anatomy of *Sinoennea* (Enneinae), *Careoradula* (Strepaxinae), *Discartemon* (Strepaxinae), *Augustula* (Strepaxinae), and a species of *Imperturbatia* (Gibbinae). Our molecular phylogenetic analysis placed the two genera with high-spired shells, *Sinoennea* and *Diaphera*, in an isolated position as a sister group to the Streptaxidae *sensu stricto*. This basal divergence within the Streptaxoidea provides support to the proposed recognition of a new family, the Diapheridae. None of the genera possessing low-spired shells, *Careoradula*, *Discartemon*, *Augustula*, and *Imperturbatia*, were available for inclusion in the molecular analysis and we therefore provisionally restrict the Diapheridae to *Diaphera* and *Sinoennea*. However, based on their reproductive anatomy *Careoradula*, *Discartemon*, *Augustula* and a species of *Imperturbatia* may cluster with the Diapheridae when included in a molecular analysis.

© 2010 The Linnean Society of London, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2010, **160**, 1–16.
doi: 10.1111/j.1096-3642.2009.00598.x

ADDITIONAL KEYWORDS: Achatinoidea – carnivorous snail – land snails – molecular phylogeny – rRNA – taxonomy.

INTRODUCTION

The approximately 1000 described species in the Streptaxoidea have been placed in a single family and about 60 genera, largely on the basis of shell characters (Zilch, 1960; Bruggen, 1967; Richardson, 1988; Schileyko, 2000). The group is widely distributed in the tropics and some subtropical areas but is absent from the eastern and southern Pacific regions. Some 15 genera have been reported from South-East Asia. In reviewing the group, Schileyko (2000) recognized six subfamily categories and provided supporting information on the reproductive morphology. However, the internal anatomy of most species is unknown and the only evidence to support their inclusion in subfamily or generic categories is based on shell characters and, to some extent, this is influenced by geographical distribution. Shell shape is diverse ranging from helicoid to pupiform and turriform, often with axial distortion (Bruggen, 1967). In many stylommatophoran groups complex structures of the reproductive organs proximal to the genital orifice have proved to be valuable for recognizing species and genera. Apart from the possession of penial armature, generally in the form of hooks or claws, few accessory organs in the reproductive

*Corresponding author. E-mail: somsakp@sc.chula.ac.th

system of streptaxids have been recognized as providing useful characters for identifying generic groupings.

Diaphera Albers, 1850, is a poorly known genus endemic to the South-East Asian region. Bruggen (1967, 1972, 1974) and Dance (1970) suggested that *Diaphera* may have originated in the Philippines and subsequently dispersed to the Sunda shelf and to southern mainland South-East Asia. Of the 38 described species, most exhibit localized distributions in the Philippines, one species is recorded from Borneo, and six species are recorded from mainland southern South-East Asia (Stoliczka, 1871; Beddome, 1891; Quadras & Möllendorff, 1894: 1895, 1896; Blanford & Godwin-Austen, 1908; Zilch, 1961; Benthem Jutting, 1962; Bruggen, 1974; Richardson, 1988; Vermeulen, 1990). There have previously been no confirmed records of *Diaphera* from Thailand, only ambiguous statements by Blanford (1899) and Blanford & Godwin-Austen (1908) that *Diaphera seatoni* (Beddome, 1891) occurred near the Thai–Burmese border. *Diaphera* was discovered on several isolated limestone hills in eastern Thailand during malacological surveys carried out between 1999 and 2007. The striking turretted shell with a partly detached last whorl serves to distinguish *Diaphera* from other streptaxoid genera in the region.

MATERIAL AND METHODS

Samples and morphology

A total of 148 specimens collected from our eastern Thailand surveys were identified from the publications of Stoliczka (1871), Möllendorff (1887, 1890), Beddome (1891), Quadras & Möllendorff (1894, 1895, 1896), Kobelt (1904, 1910), Blanford & Godwin-Austen (1908), Zilch (1961), Benthem Jutting (1962), Dance (1970), Bruggen (1974, 1975), and Vermeulen (1990), and were subsequently compared with the relevant type specimens. Living examples of *Diaphera prima* sp. nov. were frozen at –20 °C and ten specimens were dissected and examined under a stereomicroscope as detailed below. With the aid of a camera lucida attachment, the genital morphology of one specimen was figured and shell sculpture and radula morphology (form and formula of radula teeth) were examined by scanning electron microscopy (SEM: JEOL, JSM-5410 LV). For details of other streptaxids, plus other stylommatophoran taxa used in the molecular analysis in this study, see Table 1.

Molecular methods

DNA extraction, PCR amplification, and sequencing of a fragment of the rRNA gene spanning the 3′ end (~80 nucleotides) of the 5.8S gene, the complete internal transcribed spacer 2 (ITS-2) region, and the 5′ end (~840 nucleotides) of the large subunit (LSU; 28S) gene were undertaken on single samples of each species as described in Wade, Mordan & Naggs (2006). Sequences were assembled using the STADEN package (Staden, 1993) and aligned within the Genetic Data Environment (GDE) package (Smith *et al.*, 1994). Sequence analyses were performed using a representative subset of taxa (see Table 1 for details) selected from the phylogenies presented in Wade *et al.* (2006). In total, 823 nucleotide sites could be aligned unambiguously in comparisons of all taxa and analyses were therefore based on this 823 nucleotide dataset. As the ITS-2 region showed extremely high variability amongst taxa, all ITS-2 sites were excluded. Phylogenetic trees were constructed using neighbor-joining (NJ), maximum likelihood (ML), and Bayesian inference (BI). For all methods, the general time reversible model of sequence evolution incorporating a gamma correction to account for between-site rate variation (GTR + Γ) was used to account for multiple hits (this was determined to be the most appropriate model for the data based on likelihood ratio tests). NJ analysis was carried out using PAUP* (version 4.0b10) (Swofford, 2003), with ML analysis undertaken using PHYML (version 2.4.5) (Guindon & Gascuel, 2003). BI analysis was performed using MrBayes (version 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), with the tree space explored using four chains of a Markov chain Monte Carlo algorithm for 3 000 000 generations (heating parameter = 0.175), sampling every 100 generations. A consensus tree was built using the last 1000 trees with a burnin of 29001 samples. Bootstrap resampling (Felsenstein, 1985) with 1000 replicates was undertaken in order to assign support to particular branches within the NJ and ML trees. Nucleotide sequences new to this study have been deposited in GenBank under accession numbers GQ330503 to 330511.

Anatomical abbreviations

In the description of the genitalia the term ‘proximal’ refers to the region closest to the genital orifice and the term ‘distal’ refers to the region furthest away from the genital orifice. The following abbreviations were used following Stoliczka (1871), Berry (1963, 1965), Winter, Gomez & Prieto (1999), and Herbert (2002): ag, albumin gland; at, atrium; eg, egg; fo, free oviduct; g, gonad; hd, hermaphroditic duct; ov, oviduct; p, penis; pp, penial pilaster; pr, penial retractor muscle; sv, seminal vesicle; v, vagina; vd, vas deferens.

Institutional abbreviations

BMNH, The Natural History Museum, London; CUMZ, Chulalongkorn University, Museum of

Table 1. Details of samples, collectors, localities, and GenBank accession numbers for the sequences used in the molecular phylogenetic analysis (Fig. 3)

Family	Species	Collection/location	Collector	GenBank accession nos
Stylommatophoran Pulmonates [Phylum Mollusca, Class Gastropoda, Subclass Pulmonata, Order Eupulomonata, Suborder Stylommatophora]				
Infraorder Orthurethra				
Pupillidae	*Pupoides albilabris* (Adams, 1841)	Wilson County, Tennessee, USA	J. Slapcinsky & B. Coles	AY841283 & AY841284
Orculidae	*Orcula austriaca* Zimmerman, 1932	Kuhberg, Austria	P. Miltner	AY014028
Chondrinidae	*Chondrina clienta* (Westerlund, 1883)	Villach, Austria	P. Miltner	AY014031
Enidae	*Buliminus labrosus* (Olivier, 1804)	Saladin's Castle, Syria	P. Mordan	AY014034
Partulidae	*Partula suturalis* Pfeiffer, 1855	Moorea	B. Clarke	AY014042
Infraorder Mesurethra				
Clausiliidae	*Albinaria xantostoma* (Boettger, 1883)	Crete	D. Thomaz	AY014048
	Mundiphaedusa decapitata (Pilsbry, 1902)	Osaka City, Japan	P. Callomon	AY014054 & AY014055
Infraorder Elasmognatha				
Succineidae	*Succinea putris* (Linnaeus, 1758)	Southampton, UK	C. MacDonald	AY014056 & AY014057
Athoracophoridae	*Athoracophorus bitentaculatus* (Quoy & Gaimard, 1832)	Mere Mere, New Zealand	G. Barker	AY014018
Infraorder Sigmurethra				
Orthalicidae	*Drymaeus discrepans* (Sowerby, 1833)	Guatemala	Unknown	AY841300
Amphibulimidae	*Gaeotis nigrolineata* Shuttleworth, 1854	El Yunque, Puerto Rico	A. Davison	AY841301
Cerionidae	*Cerion incanum* (Binney, 1851)	Florida Keys, USA	J. Taylor	AY014060
Ferussaciidae	*Ferussacia foilliculus* (Gmelin, 1791)	Los Alcornales, Prov Cadiz, Spain	M. Seddon	AY841302
Subulinidae	*Zootecus insularis* (Ehrenberg, 1831)	Dubai, United Arab Emirates	S. Green	AY014068
Glessulidae	*Glessula ceylanica* (Pfeiffer, 1845)	Colombo, Sri Lanka	P. Karunaratne	AY014063 & AY014064
Achatinidae	*Lissachatina fulica* (Bowdich, 1822) [= *Achatina fulica*]	Unknown (Zoological Society of London collection)	P. Pearce-Kelly	AY014069
Coeliaxidae	*Coeliaxis blandii* (Pfeiffer, 1852)	New Bradford, South Africa	N. Smith	AY841306 & AY841307
Thyrophorellidae	*Thyrophorella thomensis* Greeff, 1882	Zampala, São Thomé, West Africa	A. Gascoigne	AY841308
Spiraxidae	*Euglandina rosea* (Férussac, 1821)	Moorea (Zoological Society of London collection)	P. Pearce-Kelly	AY014074
Testacellidae	*Testacella scutulum* Sowerby, 1821	North London, UK	R. Hurst	AY014075
Streptaxidae				
Streptaxinae	* *Indoartemon* sp. A	Sri Lanka	D. Raheem	GQ330503
Enneinae	* *Streptostele* sp.	Kenya	M. Pickford	GQ330504
	* *Diaphera prima* n. sp.	Chonburi, Thailand	S. Panha	GQ330505
	* *Sinoennea ridleyi* (Piele, 1926)	Selangor, Malaysia	C. Sutcharit	GQ330506
Gibbinae	* *Gibbulinella dewinteri* Bank, Groh & Ripken, 2002	La Gomera Island, Canary Islands	M. Ibañez	GQ330507
	Gonaxis quadrilateralis Preston, 1910	Reunion	O. Griffiths	AY014076
	Gonospira sp.	Mauritius	O. Griffiths	AY014077
Marconiinae	* *Marconia* sp.	Kenya	M. Pickford	GQ330508
Odontartemoninae	* *Pseudogonaxis* sp.	Kenya	M. Pickford	GQ330509
Ptychotrematinae	* *Gulella caryatis diabensis* Connolly, 1939	Namibia	Unknown	GQ330510
	* *Huttonella bicolor* (Hutton, 1834)	Sri Lanka	D. Raheem	GQ330511

Table 1. *Continued*

Family	Species	Collection/location	Collector	GenBank accession nos
Dorcasiidae	*Dorcasia alexandri* Gray, 1938	Windhoek, Namibia	C. Boix-Hinzen	AY014079
Acavidae	*Acavus phoenix* (Pfeiffer, 1854)	Kitulgala, Sri Lanka	P. Karunaratne	AY014082 & AY014083
	Leucotaenius proctori (Sowerby, 1894)	Beheloa, Madagascar	O. Griffiths	AY014084 & AY014085
Chlamydephoridae	*Chlamydephorus burnupi* (Smith, 1892)	Pevensey, Natal	D. Herbert	AY014089
Corillidae	*Corilla adamsi* Gude, 1914	Sri Lanka	D. Raheem	AY014091 & AY014092
Discidae	*Anguispira alternata* (Say, 1816)	Wilson Co. Tennessee, USA	J. Slapzinsky & B. Coles	AY841309
Euconulidae	*Euconulus fulvus* (Müller, 1774)	New Forest, Hampshire, UK	P. Mordan	AY014098
Helicarionidae	*Rhysotina hepatizon* (Gould, 1848)	São Thomé	A. Gascoigne	AY014100
Ariophantidae	*Euplecta gardeneri* (Pfeiffer, 1846)	Sri Lanka	D. Raheem	AY841310 & AY841311
Vitrinidae	*Vitrina pellucida* (Müller, 1774)	Kirkdale, Derbyshire, UK	C. Wade	AY014111
Milacidae	*Tandonia budapestensis* (Hazay, 1881) [= *Milax budapestensis*]	Kirkdale, Derbyshire, UK	C. Wade	AY014117
Polygyridae	*Triodopsis alleni* (Wetherby, 1883)	Williams Creek, Iowa, USA	R. Cameron	AY841316
Camaenidae	*Amphidromus* sp.	Unknown	D. Reid	AY841317 & AY841318
Hygromiidae	*Cochlicella acuta* (Müller, 1774)	Porthcurnick, Cornwall, UK	E. Bailes	AY014126
Helicidae	*Helix lucorum* Linnaeus, 1758	Unknown	Unknown	AY841334
Helminthoglyptidae	*Cepolis streatori* (Pilsbry, 1889)	Grand Cayman	S. Chiba	AY841346
Arionidae	*Arion hortensis* Férussac, 1819	Kirkdale, Derbyshire, UK	C. Wade	AY014143
Philomycidae	*Philomycus carolinianus* (Bosc, 1802)	Wake Co., USA	A. Braswell	AY841349
Non-Stylommatophoran Pulmonates [Phylum Mollusca, Class Gastropoda, Subclass Pulmonata]				
Order Eupulmonata				
Ellobiidae	*Melampus luteus* (Quoy & Gaimard, 1832)	Souilla, Mauritius	O. Griffiths	AY014146
	Laemodonta sp.	Suralaya, West Java	B. Dharma	AY014147
Carychiidae	*Carychium tridentatum* (Risso, 1826)	Abelheira, São Miguel, Azores	P. Mordan	AY014148
Order Basommatophora				
Siphonariidae	*Siphonaria pectinata* (Linnaeus, 1758)	Zamara Los Atunes, Spain	S. Hawkins	AY014149 & AY014150
Order Systellomatophora				
Veronicellidae	*Laevicaulis alte* (Férussac, 1823)	Dubai, United Arab Emirates	A. Green	AY014151
Phylum Mollusca, Class Gastropoda, Subclass Opisthobranchia, Order Anaspidea				
Aplysiidae	*Aplysia punctata* Cuvier, 1803	Bessaker, Trondelag, Norway	J. Evertsen & T. Bakken	AY014153 & AY014154

*Denotes taxa which are new to this study.
The classification broadly follows Vaught (1989).

Zoology, Bangkok, Thailand; MNHN, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris; SMF, Forschungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Frankfurt, a.m.; ZMA, Zoological Museum, Amsterdam, the Netherlands.

SYSTEMATIC DESCRIPTION

SUPERFAMILY STREPTAXOIDEA GRAY, 1860

FAMILY **DIAPHERIDAE** PANHA & NAGGS **FAM. NOV.**

Type genus: Diaphera Albers, 1850.

Diagnosis: Shell high spired and narrow or pupiform; whorls symmetrical about straight axis, apart from a portion of the last whorl, which is detached in *Diaphera*. Penis simple, long, and without a penial sheath or internal hooks.

Remarks: The Diapheridae is defined by the type genus *Diaphera*. On currently available evidence only *Diaphera* and *Sinoennea* Kobelt, 1904 are included in the Diapheridae. The shell form with a simple reproductive system, lacking a penial sheath and internal hooks, set *Diaphera* and *Sinoennea* apart from other streptaxoid taxa. Although no single morphological synapomorphy characterizing the Diapheridae has been identified, the robust, distinct, and basal position of the Diapheridae within the molecular streptaxoid clade presented below supports the distinct identity of this group.

GENUS *DIAPHERA* ALBERS, 1850

Type species: Cylindrella cumingiana Pfeiffer, 1845, by original designation; lectotype BMNH 20080230 (Fig. 1A); type locality: the Philippines ('in grass, Guimaras, the Philippines', given on original label).

Diagnosis: Shell ovate to cylindrical, thin, transparent, and glossy, surface smooth or sculptured; apex obtuse, surface smooth, subsequent whorls smooth or with radial ribs; part of last whorl always detached; aperture circular to ovate; lip expanded and slightly reflexed; apertural dentition usually comprised of parietal, palatal, basal, and columellar lamellae. Radula plate narrow; teeth lanceolate, central tooth minute, lateral and marginal teeth similar with long cusp. Genitalia with well-developed penis; penial sheath, verge, and spines are absent.

Remarks: Diaphera currently includes 39 nominal species that range from Burma, Thailand, Cambodia, and the Philippines to Kalimantan (Blanford, 1899; Bruggen, 1975; Richardson, 1988; Vermeulen, 1990; Schileyko, 2000). In Thailand *Diaphera* can be distinguished conchologically from similar genera such as *Sinoennea* (with six to seven whorls) by possessing a greater number (eight to 20) of more elongate, cylindrical whorls; partially detached last whorl and ovate aperture (Tryon, 1885; Zilch, 1960; Richardson, 1988; Schileyko, 2000).

Diaphera was treated as a subgenus of *Gibbus* Montfort, 1810 by Tryon (1885) and of *Gulella* Pfeiffer, 1856 by Thiele (1931). Zilch (1960) subsequently treated *Diaphera* as a distinct genus. Richardson (1988) placed 46 species from the Philippines and Indochina in *Diaphera*. However, Richardson's inclusion of the two pupiform Madagascan species, *Gulella miaryi* (Fischer-Piette & Bedoucha, 1964) and *Gulella gallora* (Fischer-Piette, Blanc & Salvat, 1975), both of which lack a detached last whorl, seems unjustified (see Fischer-Piette & Bedoucha, 1964; Fischer-Piette *et al.*, 1975). The Madagascan taxa are likely to be part of or allied to the *Gulella* group. Eight cylindrically shelled species from the Philippines *Ennea sericina* Möllendorff (1887), *Ennea hidalgoi* Möllendorff, 1888, *Ennea cardiostoma* Quadras & Möllendorff, 1894, *Ennea nitidula* Quadras & Möllendorff, 1894, *Ennea otostoma* Quadras & Möllendorff, 1894, *Ennea cylindrica* Quadras & Möllendorff, 1895, *Ennea cristatella* Möllendorff, 1896, and *Ennea samarica* Möllendorff, 1896 were placed in *Diaphera* by Zilch (1961) and Richardson (1988). However, these taxa lack a partially detached last whorl and are thus more likely to be related to *Ennea* H. & A. Adams, 1855. Richardson (1988) followed Kobelt (1904) and Blanford & Godwin-Austen (1908) in placing *Ennea brevicollis* Blanford, 1899 in *Sinoennea*, but this species possesses a multiwhorled turriform shell with detached body whorl and belongs in *Diaphera* (Table 2).

DIAPHERA PRIMA PANHA **SP. NOV.** (FIGS 1B–G, 2)

Type material: Holotype CUMZ 3544 (height 6.2 mm, width 2 mm, whorls eight) (Fig. 1B, C); paratypes CUMZ 3543 (2a shells), 3545 (3a ethanol; Fig. 1G), 3627 (8a + 8j shells), 3629 (13a ethanol; Fig. 1E, F), 3630 (1j shell; Fig. 1D), 3649 (10a + 13j shells), 4299 (10a + 3j ethanol), 4656 (5a shells); BMNH 20070007 (2a shells); MNHN 21991 (2a shells); SMF 333515 (2a shells); ZMA 409052 (2a shells). Type locality: Khao Cha Ang-Oan, Bor Thong, Chonburi, Thailand (13°11′5″N, 101°34′59″E). *Other material examined*: Khao Chakan, Srakeo, Thailand (13°39′80.2″N, 102°05′71.1″E): CUMZ 3541, 3542, 3546, 3628, 3650, 4296, 4297, 4298. Tam Khao Loy, Khao Chamao, Rayong, Thailand (13°03′28.9″N, 101°36′27.6″E): CUMZ 3800.

Description: Shell small, turreted, tapering slightly away from apex, thin, transparent, and glossy when fresh; part of last whorl detached (Fig. 1B). Apex

Table 2. Comparison of shell characters amongst five species of *Diaphera* Albers, 1850 from Indochina

Characters	***D. prima* sp. nov.**	*D. saurini**	*D. brevicollis*†	*D. seatoni*†	*D. cylindrelloidea*†
Shell height of holotype in mm	6.2	8.8	8	9.5	4.5
Shell width of holotype in mm	2	3	2	2.25	1.3
Number of whorls	7–8	10	11	11	8
Apex	Obtuse and smooth	Obtuse and smooth	Obtuse and smooth	Obtuse and smooth	Obtuse and smooth
Shell sculpture	Almost smooth, only short ribbed below suture	Distinct rib	Distinct rib	Not closely ribbed	Closely ribbed
Shape of aperture	Rounded	Rounded	Rounded	Ovate	Rounded
Apertural lamellae	Parietal, 2 palatals, basal, columellar	Parietal, palatal, columellar	Parietal, thin palatal	Parietal, palatal, columellar	Parietal, thin palatal
Distribution	Eastern Thailand	Battambang, Cambodia	Moulmein, Tenasserim, Burma	Tenasserim, Burma	Moulmein, Tenasserim, Burma
Total number of specimens examined	46	2	1	1	1

*Holotype ZMA 3.62.016.
†Indicates data derived from Stoliczka (1871); Beddome (1891); Blanford (1899); Blanford & Godwin-Austen (1908).

smooth, obtusely conical. Whorls seven to eight (excluding detached section) slightly convex; suture depressed. Shell surface with very fine growth lines in appearance; short transverse ridges immediately below suture extend around circumference of detached section of body whorl. Detached part of last whorl long, being approximately one third the length of last whorl, descending, with sutural line extending as vallicular depression and corresponding with parietal lamella (P). Umbilicus wide, deep with strong transverse ribs. Aperture circular (Fig. 1C); inner surface with thin wrinkles. Lip slightly thickened and expanded. Dentition of peristome comprises one large and curved parietal lamella fold and two small palatal lamellae (Pl) (one on the margin of the peristome and one inside the peristome), one convex basal lamella (Bl), and one large internal columellar lamella (Cl) (Fig. 1C). Juvenile shell composed of about four whorls and shows distinct parietal, palatal, basal, and columellar lamellae in peristome (Fig. 1D).

Animal body colour externally pale greenish yellow; digestive gland pale brownish yellow, extended body entirely lacking bright skin pigmentation and bright red, orange, or yellow eye retractor muscles often associated with streptaxids (Fig. 1E, F). Foot narrow and undivided (holopoda), anterior long, posterior rather short as typical of streptaxids. Upper tentacle long with black eye spot on tip, lower tentacles very short.

Radula: Radula teeth arranged in anteriorly pointed V-shaped rows on the dorsal odontophore, each row contains 31–33 teeth with formula (15–16)–1–(15–16). Central tooth triangular, minute with pointed cusp. Lateral and marginal teeth weakly differentiated, unicuspid, lanceolate, basal plate well developed; lateral teeth gradually reduced in length and size towards radular margin; inner lateral teeth straight and slightly curved cusp (Fig. 1G).

Genitalia: Genital atrium (at) short. Penis (p) very long, slender with thick muscular wall. Epiphallus, penial verge and penial sheath absent. Vas deferens (vd) small tube, inserting on penial apex and almost coincident with attachment of penial retractor muscle. Penial retractor muscle (pr) thin, very long, originating from columellar muscle (Fig. 2A). Internal wall of penis smooth with two longitudinal pilasters (pp); major pilaster extends almost the entire penis length; minor pilaster about half as long. Penial armature in form of hooks characteristic of streptaxids entirely absent (Fig. 2B). Vagina (v) short, about one fifth of the length of the penis. Duct of gametolytic organ (gd) slender and short, ending without distinct gametolytic sac, and attached to free

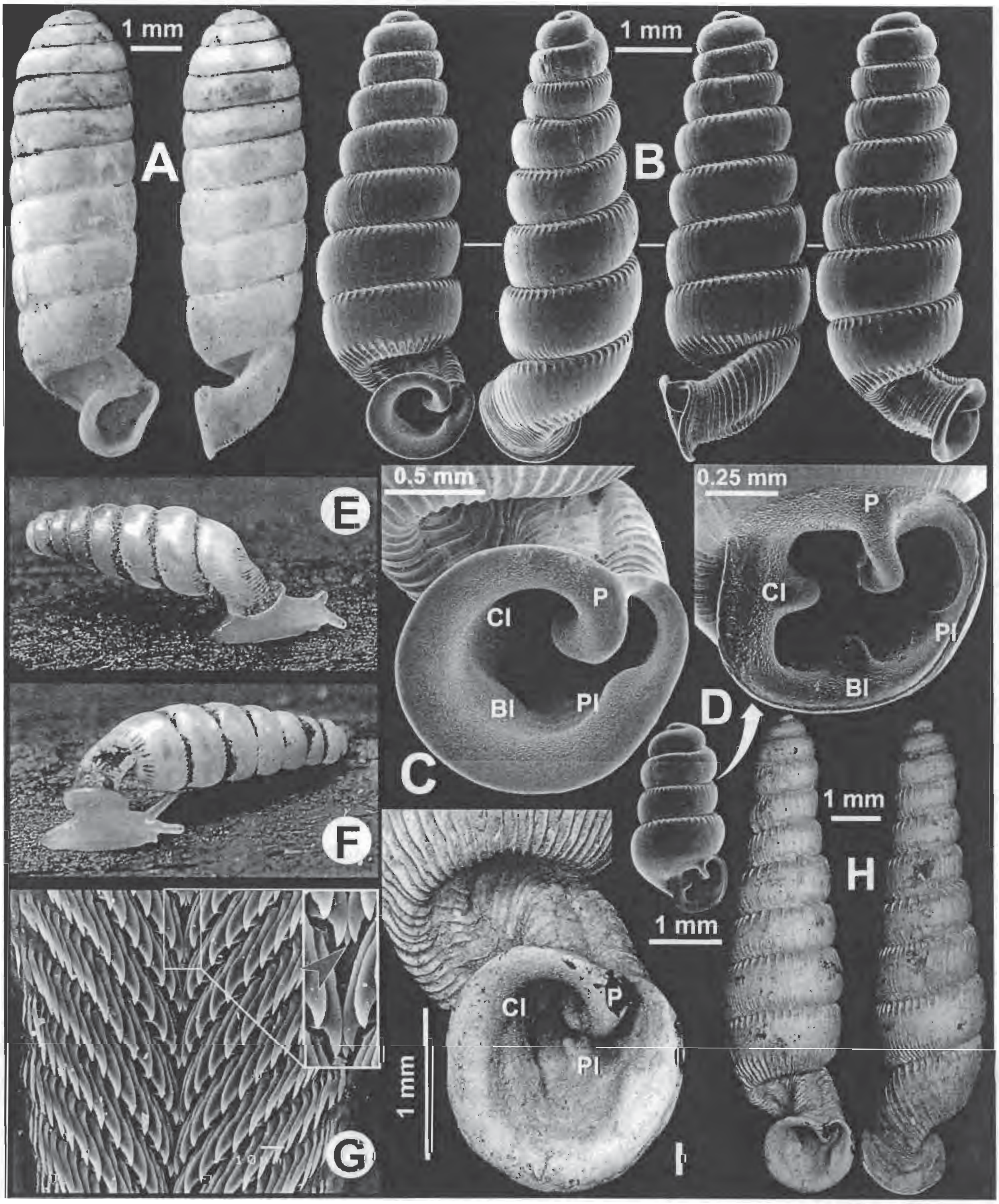


Figure 1. A, shell morphology of *Diaphera cumingiana* (Pfeiffer, 1845) (lectotype BMNH 20080230). B–G, morphology of shell and radular and living animals of ***Diaphera prima* sp. nov.** B, the shell and C, the aperture of holotype (CUMZ 3544) showing lamellae. D, juvenile specimen showing apertural lamellae (paratype CUMZ 3630). E, F, living animals (paratype CUMZ 3629): E, shell height 6.5 mm; and F, shell height 6.8 mm. G, radula morphology (paratype CUMZ 3545); arrow on top-right inset indicates the central tooth. H, I, morphology of shell of *Diaphera saurini* Benthem Jutting, 1962. H, the shell and I, aperture of holotype (ZMA 3.62.016) showing lamellae. Abbreviations: P, parietal lamella; Pl, palatal lamella; Bl, basal lamella; Cl, columellar lamella.

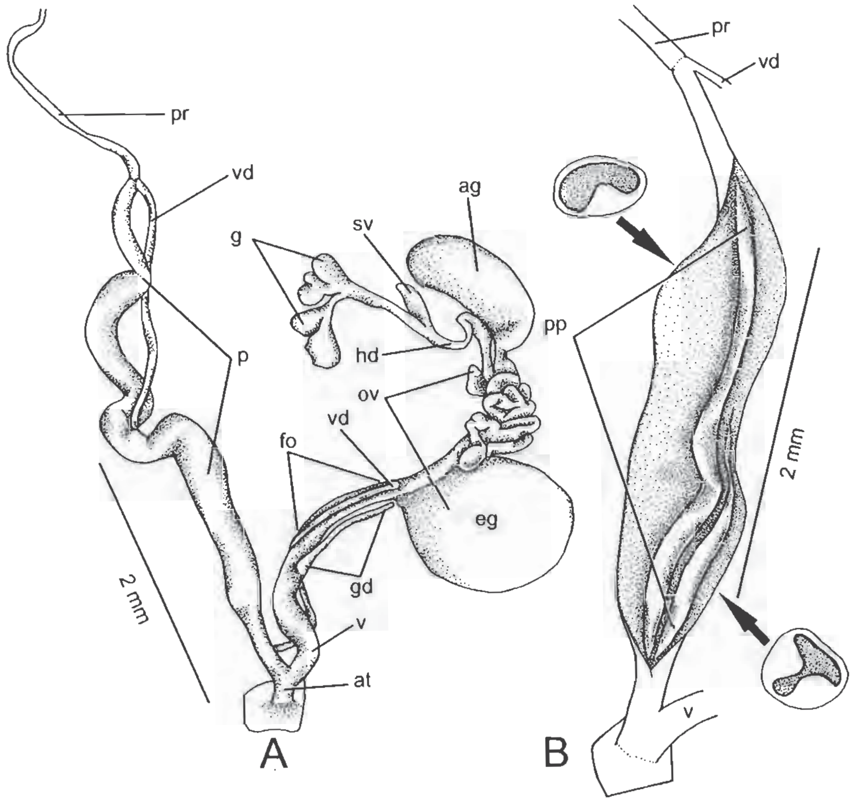


Figure 2. Genitalia of ***Diaphera prima* sp. nov.** (paratype CUMZ 3545). A, whole genital system. B, details of internal wall of penis. Abbreviations: ag, albumin gland; at, atrium; eg, egg; fo, free oviduct; g, gonad; hd, hermaphroditic duct; ov, oviduct; p, penis; pp, penial pilasters; pr, penial retractor muscle; sv, seminal vesicle; v, vagina; vd, vas deferens.

oviduct by thin connective tissue. Free oviduct (fo) long; oviduct (ov) enlarged with lobular shape (figured specimen contained one large spherical egg proximally). Inconspicuous prostate gland bound to external section of oviduct. Albumen gland (ag) thick, bean-shaped. Gonad (g) lobular; hermaphroditic duct (hd) slender and straight, bearing globular seminal vesicle (sv) in middle (Fig. 2A).

Distribution: The species is presently known from three localities, namely the isolated limestone hills at the type locality, at Khao Chakan, Srakeo, Thailand, and at Tam Khao Loy, Khao Chamao, Rayong, Thailand. The shells of specimens from Khao Chakan are slightly smaller than those from the type locality, but shell shape, sculpture, and apertural dentition are essentially identical to that of the type specimens. The slight difference in size is probably indicative of local population variation.

Etymology: From the Latin '*prima*' meaning 'first, original'. It refers to the fact that this new species is the first *Diaphera* definitely recorded from Thailand.

Remark: Several of the Philippines *Diaphera* such as *Diaphera canaliculata* (Quadras & Möllendorff, 1896) are pupiform with few whorls, and are quite distinct from the more common high, narrow shelled species (Zilch, 1961). These two groups may represent distinct genera. We limit our discussion of *Diaphera* species to *D. prima* sp. nov. and the four high-spired geographically proximal (from Indochina) species, *Diaphera cylindrelloidea* (Stoliczka, 1871), *D. seatoni* (Beddome, 1891), *Diaphera brevicollis* (Blanford, 1899), and *Diaphera saurini* Benthem Jutting, 1962.

Diaphera prima sp. nov. can be distinguished from these four regional species on the basis of several conchological characters (Table 2). *Diaphera cylindrelloidea* and *D. brevicollis* from Burma resemble each other in shell form with smooth embryonic whorls, distinct transverse ribs on the later whorls, and only parietal and thin palatal lamellae in the aperture (Stoliczka, 1871; Beddome, 1891; Blanford, 1899; Blanford & Godwin-Austen, 1908). Compared to other species within the genus, *D. seatoni* from Mooleyit Mountain, Tenasserim, Burma, possesses a higher shell with distinct transverse ribs and the detached part of the last whorl is slightly shorter

than *D. prima* sp. nov. (Blanford, 1899; Blanford & Godwin-Austen, 1908). *Diaphera seatoni* can be distinguished from *D. cylindrelloidea* and *D. brevicollis* by its higher shell, ovate aperture with a sinus on upper corner, the presence of a basal lamella and shorter detached part to the last whorl (Stoliczka, 1871; Beddome, 1891; Blanford & Godwin-Austen, 1908). In the morphologically similar species *D. saurini* from Cambodia (Fig. 1H, I), the fourth and later whorls have strong transverse ribs, the penultimate and last whorls are enlarged, and the basal lamella is absent (Benthem Jutting, 1962).

The soft internal anatomy of a limited number of streptaxid genera has been previously described (Table 3) and this is the first account of the reproductive anatomy of *Diaphera*. The anatomical descriptions of *Sinoennea kanchingensis* Tomlin, 1948 and *Huttonella bicolor* (Hutton, 1834) were the most comprehensive available for comparing the morphology of *Diaphera* (Stoliczka, 1871; Berry, 1963, 1965; Schileyko, 2000). *Diaphera* possesses a very long penis, the penial retractor muscle inserts on the distal penis, being almost coincident with entry of the vas deferens; the gametolytic organ is slender, a short duct, and lacks a distinct gametolytic sac; the seminal vesicle is cylindrical. In *Sinoennea* and *Huttonella* Pfeiffer, 1856 the penis is shorter, the vas deferens inserts centrally on the penis, remote from the distally inserting penial retractor muscle; and the gametolytic organ has a long duct and terminates in a globular gametolytic sac.

MOLECULAR RESULTS

rRNA sequences of nine new streptaxoid genera were obtained in this study. Together, with the two streptaxid rRNA sequences obtained by Wade, Mordan & Clarke (2001), molecular data for the rRNA gene are now available for 11 streptaxoid genera (Table 1), with at least one representative species from each of the six currently recognized subfamilies in the Streptaxidae. A phylogenetic tree showing the evolutionary relationships amongst the Streptaxoidea and its position within the Stylommatophora is presented in Figure 3. The tree is rooted on the aplysiid opisthobranch *Aplysia punctata*. The phylogeny is based on the analysis of 823 unambiguously aligned nucleotide sites, of which 287 were variable and 206 were parsimony informative. DNA base frequencies were highly consistent across all taxa in the tree, ranging from 60.0 to 63.5% GC.

The Streptaxoidea are a monophyletic group within the rRNA molecular phylogeny supported in 100% of NJ and ML bootstraps and with a Bayesian posterior probability of 1.00. Representatives from all six currently recognized streptaxoid subfamilies are included in the tree (Fig. 3; Schileyko, 2000; Bouchet & Rocroi, 2005). *Diaphera prima* and *Sinoennea* cluster together within the tree with 100% NJ and 98% ML bootstrap support and with a Bayesian posterior probability of 1.00. This 'diapherid' group is a sister group of the Streptaxidae *sensu stricto*, following a basal divergence within the Streptaxoidea and is highly divergent from the other streptaxoids with the branch falling at a similar depth to that between the Ferussaciidae and the Achatinidae/Subulinidae clade.

DISCUSSION

In many Stylommatophoran groups complexities in morphology of the reproductive system have proved to be of considerable value for recognizing species, genera, and higher level taxa. Despite the relative simplicity of reproductive morphology in the achatinoid/streptaxoid clade (discussed below) genitalic characters have nevertheless been of value in recognizing achatinoid species and genera (Naggs, 1994). However, the same does not hold for the streptaxoids as few characters have proved to be of value for recognizing systematic groups. For example, judged by current concepts of subfamily units, the presence or absence of a penial sheath appears to be of little value in recognizing groups above generic level in streptaxids. A penial sheath is present in 23 streptaxid genera and is recorded as being absent not only in *Diaphera* but also in *Augustula* Thiele, 1931 and *Careoradula* Gerlach & Bruggen, 1999 (Streptaxinae), *Sinoennea* (Enneinae), *Gulella* and *Huttonella* (Ptychtrematinae), and *Odontartemon* Pfeiffer, 1856 (Odontartemoninae) (Table 3).

Penial armature in the Mollusca is confined to the Euthyneura and occurs in some carnivorous opisthobranchs and such diverse stylommatophoran taxa as the Himalayan arionid slug Anadenus Heynemann, 1863 (lanceolate penial armature), the African urocyclid Polytoxon (calcareous needles located in penial pits), and the Streptaxidae (Godwin-Austen, 1882; Schileyko, 2002) (generally cat-like claws). Penial armature is clearly an important feature within the Streptaxidae; it has been considered to be an apomorphy for the group and its absence in streptaxids is assumed to be secondary. For example, Schileyko (2000: 771) asserts that 'rarely hooks secondarily disappear'. However, in the case of *Diaphera* and *Sinoennea*, which on molecular phylogenetic evidence diverged at a basal stage in the streptaxoid clade (Fig. 3), it seems reasonable to hypothesize that the absence of penial armature is a plesiomorphic condition. Of the 60 currently recognized streptaxoid genera, some internal anatomy has been described for 37 genera and, of these, 28 possess penial armature.

Table 3. List of streptaxoid subfamilies and genera compiled primarily from Schileyko (2000)

Taxa	Known anatomically	Penial hooks or spines	Penial sheath	Distribution
Streptaxinae				
Scolodonta	No			Argentina
Martinella	No			Ecuador, south Brazil
Rectartemon	Yes	+	+	Brazil, Venezuela, Caribbean Islands
Streptaxis	No			Brazil, Colombia, Venezuela
Hypselartemon	No			Brazil, Colombia
Sairostoma	No			North-east Brazil
Streptartemon	Yes	+	+	South America (Brazil, Bolivia, Colombia, Venezuela, Guyana)
Seychellaxis	Yes	+	+	Seychelles
Indoartemon	No			Sri Lanka, South-East Asia, Hainan
Stemmatopsis	No			North Vietnam
Perrottetia	Yes	+	+	South India, South-East Asia, Mascarenes
Acanthennea	Yes	+	+	Silhouette and Mahé Islands, Seychelles
Glabrennea	Yes	+	+	Seychelles
Stereostele	Yes	+	+	Seychelles
Silhouettia	Yes	+	+	Silhouette Island, Seychelles
Augustula	Yes	–	?	Seychelles
Careoradula	Yes	–	–	Seychelles
Discartemon	Yes	–	+	South-East Asia
Glyptoconus	No			Busuangga Island, Philippines
Micrartemon	No			Philippines
Platycochlium	No			Kalimantan, Borneo
Tonkinia	No			North Vietnam
Gibbinae				
Edentulina	Yes	+	+	East Africa, Comores, Seychelles
Pseudelma	–			Mayotte, Comores
Gonospira	Yes	+	+	Mauritius, Réunion, Rodrigues
Microstrophia	No			Mauritius and Réunion
Gonidomus	Yes	+	+	Mauritius extinct
Plicadomus	No			Mauritius
Gibbus	Yes	+	+	Mauritius extinct
Gibbulinella	Yes	+	+	Canary Islands
Imperturbatia	Yes	+	+	Seychelles
Priodiscus	Yes	+	+	Seychelles
Gonaxis	Yes	+	+	Equatorial and South Africa.
Oophana	Yes	+	+	South-East Asia
Haploptychius	Yes	+	+	Andamans, south India, South-East Asia, southern and central China, North Sulawesi
Enneinae				
Ennea	Yes	+	?	Afrotropical
Maurennea	Yes	+	?	Mauritius, Comoros?
Indoennea	No			India, Malaya, Sumatra
Sinoennea	Yes	–	–	India, IndoChina, China, Malaysian Peninsula, Sumatra, Japan, South Korea
Diaphera	Yes	–	–	Philippines, Kalimantan, South-East Asia
Bruggennea	No			Kalimantan
Elma	No			Taiwan, Vietnam
Streptostele	Yes	+	+	Afrotropical, Gulf of Guinea islands, Seychelles, Comoros, Mascarenes
Varicostele	Yes	?	?	Central Africa, Congo Basin

Table 3. *Continued*

Taxa	Known anatomically	Penial hooks or spines	Penial sheath	Distribution
Ptychotrematinae				
Gulella	Yes	+	?	Afrotropical, Arabia, Madagascar, Comoros, Seychelles, Mauritius
Mirellia	No			East Africa
Huttonella	Yes	+	–	Tropical cosmopolitan 'weed' unknown origin but type locality India
Parennea	No			Afrotropical
Ptychotrema	Yes	+	?	Afrotropical
Sinistrexcisa	Yes	+	?	South-west Cameroon, Equatorial Guinea
Marconiinae				
Stenomarconia	Yes	+	+	Tanzania, Kenya
Marconia	Yes	+	+	Afrotropical, Comores
Macrogonaxis	No			East Africa, Seychelles
Odontartemoninae				
Somalitayloria	Yes	?	?	Somalia
Artemonopsis	No			Ivory Coast
Tayloria	Yes	?	?	East Africa
Pseudogonaxis	No			Congo Basin
Gigantaxis	No			East Africa
Afristreptaxis	Yes	?	+	Afrotropical and South Africa
Ondontartemon	Yes	+	–	West Africa

Global distributions, availability of anatomical data and presence/absence of penial hooks and sheath are shown (+, character present; –, character absent; ? character not described in the literature).
We include Myanmar and all Asian countries to the south and west as being South-East Asia and confine IndoChina to Laos, Vietnam, and Cambodia, but source references may have used these terms with different meanings.

Penial armature is not mentioned in the anatomical descriptions of four genera (Enneinae: *Varicostele*; Odontartemoninae: *Somalitayloria* Verdcourt, 1962, *Tayloria* Bourguignat, 1889, *Afristeptaxis* Thiele, 1932). There are only five streptaxoid genera (Table 3) for which penial armature is recorded as being absent (Streptaxinae: *Careoradula*, *Discartemon* Pfeiffer, 1856, *Augustula*; Enneinae: *Sinoennea*, *Diaphera*). *Careoradula*, *Discartemon*, and *Diaphera* lack any penial hard structures; *Sinoennea* and *Augustula* possess chitinized penial papillae.

Discartemon possesses a discoidal shell and a penial sheath. The enigmatic *Careoradula*, which is the only land snail recorded as lacking a radula (Gerlach & Bruggen, 1999), resembles *Imperturbatia constans* (Martens & Wiegmann, 1898) in possessing a depressed helicoid shell and in the absence of penial hooks, penial sheath and gametolytic sac. However, in *Imperturbatia violascens* (Martens & Wiegmann, 1898) the penis possesses spinules and both a penial sheath and gametolytic sac are present (Gerlach & Bruggen, 1999). Despite the similarity in shells it appears that the two species currently included in *Imperturbatia* Martens, 1898 might belong in different groups. The combination of these shared characters in *Diaphera*, *Careoradula*, and *I. constans* is quite remarkable. Schileyko's (2000: 794) figure of *I. constans*, which shows a penial sheath occupying half the length of the penis; large penial hooks, and a voluminous gametolytic sac is based on a misidentification. Justin Gerlach (unpubl. data) points out that the '*I. constans*' reported on by Schileyko was from Silhouette Island, Seychelles, where *Imperturbatia* does not occur and that it would be a *Silhouette* Gerlach & Bruggen, 1999 species. Whereas *Diaphera* and *Sinoennea* share high spired shell forms, *Sinoennea* possesses a distinct gametolytic sac that is absent in *Diaphera*, *Careoradula*, and *I. constans*. The systematic significance of the presence or absence of a distinct gametolytic sac is not clear. In addition, because the gametolytic sac may not be distinct in virgin individuals of some species when the gametolytic sac has not digested allospermatophores, the absence of a clearly defined gametolytic sac could be related to the state of reproductive development in examined specimens rather than being a species character. Although the presence or absence of a penial sheath is apparently of no value for identifying cur-

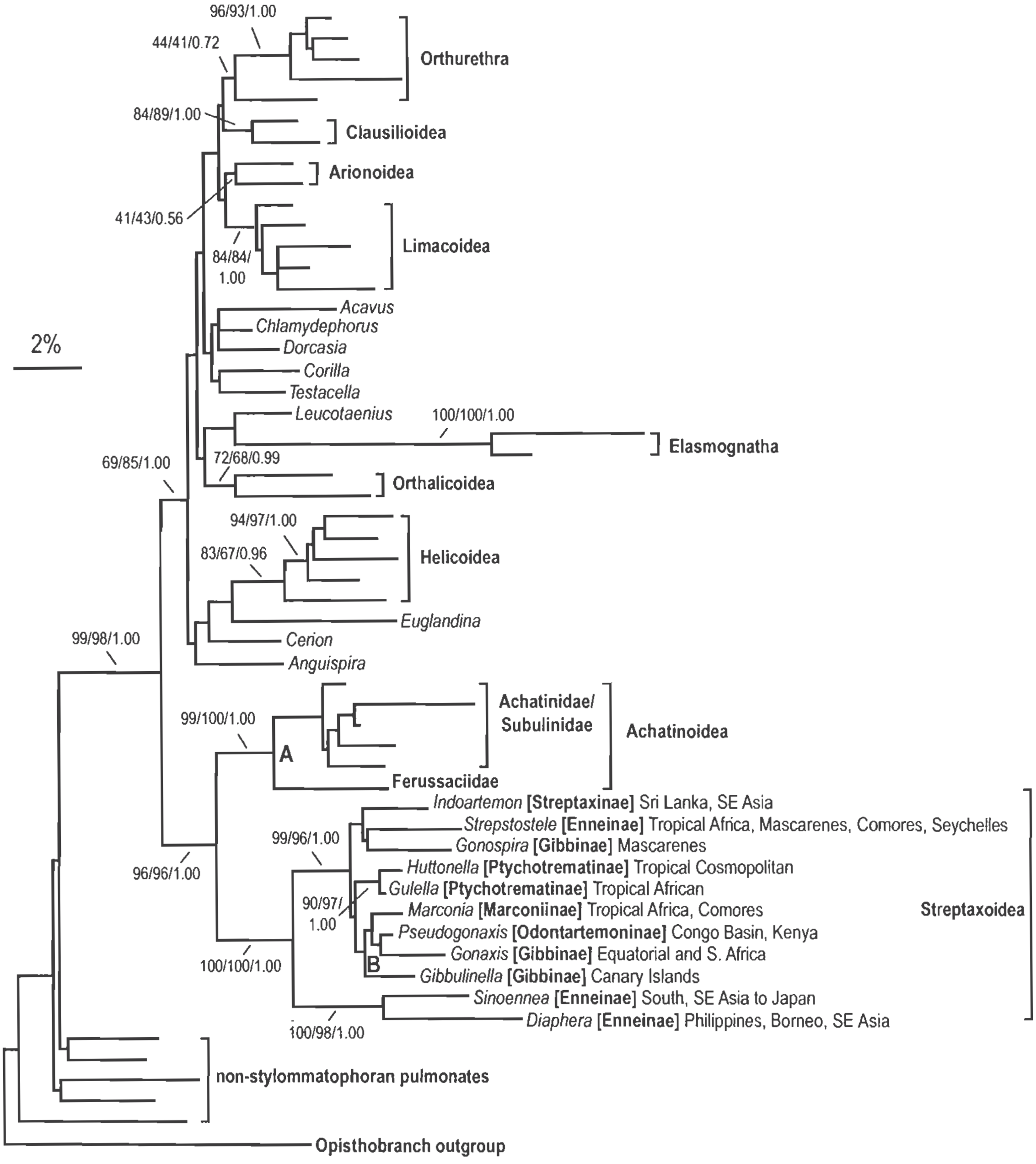


Figure 3. Neighbor-joining (NJ) phylogeny of the Streptaxoidea. The phylogeny includes representatives of the major stylommatophoran land snail groups and is rooted on the Opisthobranch *Aplysia*. The tree is based on 823 unambiguously aligned nucleotide sites with distances corrected for multiple hits using a GTR + Γ model (alpha = 0.197409). Bootstrap values [1000 NJ bootstraps and 1000 maximum likelihood (ML) bootstraps expressed as a percentage] and Bayesian posterior probabilities indicating support for individual branches are shown on the tree (NJ bootstraps/ML bootstraps/ Bayesian inference posterior probabilities). The scale bar corresponds to a genetic distance of 2%. The geographical distribution of streptaxid genera and their current subfamily attributions are shown. A, first fossil record of achatinoid 140 Mya. B, minimum age 80 Mya based on fossil *Gibbulinella* from Portugal.

rently recognized subfamily groups within the Streptaxoidea, these subfamilies are unlikely to be natural groups. Thus the significance of *Discartemon* possibly belonging to a basal group in the Streptaxoidea and possessing a penial sheath is not clear.

Morphological characters have not provided a robust basis for recognizing higher level relationships in the Streptaxoidea and it seems likely that the extent of homoplasy and plesiomorphy in streptaxoid morphological characters will only be resolved when

they are mapped on a molecular phylogenetic tree. Although described as a well-defined family (Bruggen, 1967), there is no identified apomorphy by which the group can be recognized. It is inherent in the molecular trees presented by Wade *et al.* (2001, 2006) that supposed streptaxoid affinity with other carnivorous stylommatophorans (Thiele, 1931; Zilch, 1960) is the result of homoplasies associated with specialized carnivory (Naggs, Raheem & Budha, 2008). Indeed, prior to our demonstration of the molecular relationship of *Diaphera* and *Sinoennea* being closer to streptaxoids than to achatinoids, inclusion of these genera within the Streptaxoidea was questionable.

Molecular phylogenetic trees are powerful tools for investigating evolutionary relationships and the relative chronologies of cladogenesis. In combination with the fossil record they provide a framework for developing testable hypotheses relating to calibrated chronologies and geographical distribution of taxa through time. Wade *et al.* (2001, 2006) reported molecular phylogenetic trees comprised of a large number of taxa in the major land snail group, the Stylommatophora. These support taxonomic relationships that had not been suspected on the basis of comparative morphology. Most notably, this includes a basal divergence within the Stylommatophora between a clade that includes the Achatinidae, Subulinidae, Ferussaciidae, Streptaxidae *sensu lato* (= Streptaxoidea = Streptaxidae + Diapheridae) and a clade that includes all other stylommatophoran groups. These two groups are currently referred to as the achatinoid and non-achatinoid clades. It appears likely that, in addition to the hierarchical position of the achatinoid group not being previously recognized within the Stylommatophora, that the degree of higher level diversity within the achatinoid group has also not been identified.

This investigation of *Diaphera* is an opportunity to present new molecular information on nine streptaxoid genera in addition to the two presented in Wade *et al.* (2006). Our molecular phylogenetic tree (Fig. 3) includes 11 streptaxoid species (Table 1) with at least one representative species from each of the six currently recognized subfamilies in the Streptaxidae (Table 3) (Schileyko, 2000; Bouchet & Rocroi, 2005). Current attribution of genera to subfamily categories and the subfamilies, which are also largely based on shell characters, is likely to require substantial revision and there is no merit in simply raising the status of current subfamily categories to family level in order to demonstrate the presence of higher level taxa. An indication of the extent to which current subfamily groups may be based on homoplasy is clear from the paraphyletic distribution of Enneinae *sensu* Schileyko in the tree (Fig. 3), which is represented in both the Streptaxidae *sensu stricto* and in the Diapheridae. The basal divergence of the Streptaxidae *sensu stricto* from the Diapheridae is strongly supported. There is little support for relationships within the Streptaxidae in the new restricted sense. However, there is strong support for *Gulella* and *Huttonella* as sister groups; a point of particular interest because of the tropical cosmopolitan distribution of *Huttonella* and doubts about its affinities and geographical origin (Naggs, 1989).

Here we use molecular information to clarify a high level systematic issue that the currently available morphological information cannot resolve. Although we have representatives of genera from all currently recognized subfamily groups, we are mindful of the limited geographical representation, most notably the absence of any South American taxa. The extent to which we are able to establish that taxonomic relationships correspond with geographical distribution is therefore limited (Fig. 3). In a group that has a fossil record extending deep into the Mesozoic (Zilch, 1960) this is a key issue. Because the group radiated through a period that corresponded with the major tectonic events associated with the break-up of Gondwana and possibly Pangaea, the extent of dispersal and vicariant distributions is central to understanding relationships and current distributions.

Supposed Palaeozoic stylommatophoran fossils (Solem & Yochelson, 1979) are of uncertain status (Naggs, 1997) and we have little idea of when stylommatophorans first appeared or when divergence of the achatinoid/streptaxoid and non-achatinoid clades may have taken place. There is both molecular and fossil evidence to support a long history for the streptaxoid clade but the occurrence of streptaxids on Atlantic and Indian oceanic islands of volcanic origin (Table 3) and the tropical cosmopolitan distribution of *Huttonella bicolor* is clear evidence of long distance dispersal in the group. The extent to which streptaxoids exhibit distributions based on Mesozoic vicariant events is unclear, unlike, for example, in the non-achatinoid acavoid groups, for which the extant species exhibit a classical Gondwanan distribution and occur only on continental tectonic plates or plate fragments. The earliest fossil record of what appears to be a subulinid member of the achatinoid/streptaxoid group was described from the Upper Jurassic/Early Cretaceous (about 140 Mya) of northwest Germany as *Hydrobia cypridae* Huckriede, 1967 (Huckriede, 1967; Naggs & Raheem, 2005). The first appearance of streptaxids was of *Gibbulinella* Wenz, 1920 recorded from the Late Cretaceous (about 80 Mya) of Portugal (Zilch, 1960). *Gibbulinella*, now restricted to the Canary Islands, is a possible survivor of the Continental European 'tropical' land snail taxa that become locally extinct in the Late European Eocene/Early Oligocene cooling (Preece, 1982).

However, the placement of *Gibbulinella* in the topology of our molecular tree (Fig. 3) indicates that a number of streptaxid clades had already diverged by the Late Cretaceous.

Solem (1978) gave a conservative estimate of 20 500 for the number of validly described stylommatophoran species. The approximately 18 000 non-achatinoid stylommatophorans have been split into 105 families (an average of some 170 species per family), whereas the approximately 2500 described achatinoid/streptaxoid species have been placed in five families, or six if the Glessulidae are recognized as a distinct family (Godwin-Austen, 1920; Schileyko, 1999), of which the about 1000 species in the Streptaxoidea are included in a single family and six subfamilies (Schileyko, 2000; Bouchet & Rocroi, 2005). That a taxon is species diverse is no justification in itself for classification into subgroups but, as an ancient group with few morphological characters that have proven to be of systematic value, higher level diversity within the streptaxoids may currently be underestimated. Although the molecular tree presented here gives strong support to the recognition of the Streptaxidae and Diapheridae it has not given strong support for groups with the Streptaxidae *sensu stricto*. A priority in studies of the achatinoid/streptaxoid clade is both to investigate the anatomy and molecular status of more species and to seek to establish categories at and above generic level.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to all of the collectors listed in Table 1, and to R. G. Moolenbeek (ZMA, Amsterdam), R. Janssen (SMF, Frankfurt), and P. Bouchet (MNHN, Paris) for kindly permitting C. S. and S. P. to study the type specimens and relevant reference material. We thank C. Hudelot (Institute of Genetics, University of Nottingham) for assistance with the molecular work, J. Gerlach (Nature Protection Trust of Seychelles) for correspondence relating to his anatomical work on Seychelles streptaxids, and B. Rowson (Biodiversity and Systematic Biology, National Museum of Wales) for informative discussions on streptaxid relationships and helpful comments on an earlier draft of this paper. We are also grateful to T. Asami, P. Tongkerd, A. Wiwegweaw, S. Natsupakpong, and N. Pattaramonon for providing us with literature. We extend our gratitude to D. Raheem and to E. Platts for critically reviewing the manuscript and thank G. M. Barker and an anonymous referee for their constructive comments on an earlier version of this manuscript. This project was funded by a grant for the TRF-MRG4980201, and the Development of New Faculty Staff, Chulalongkorn University, awarded to C. S.; a grant from the Thailand Commission on Higher Education (CHE-RG Limestone Biodiversity) and BRT Program (BRT 248005) to S. P., a grant awarded to C. M. W. from the Leverhulme Trust (F/00114U) and the Darwin Initiative Project: Developing land snail expertise in South and South-East Asia grant. no. 15/018).

REFERENCES

Albers JC. 1850. *Die Heliceen, nach natürlicher Verwandtschaft systematisch geordnet*. Berlin: Verlag von Th. Chr. Fr. Enslin.

Beddome WH. 1891. Descriptions of some new land shells from the Indian region. *Proceedings of the Zoological Society of London* **1891:** 313–315.

Benthem Jutting WSS van. 1962. Coquilles terrestres nouvelles de quelques collines calcaires du Cambodge et du sud Vietnam. *Journal de Conchyliologie* **52:** 3–15.

Berry AJ. 1963. The anatomy of two Malayan limestone hill Streptaxidae, *Sinoennea kanchingensis* Tomlin and *Oophana diaphanopepla* van Benthem Jutting, with special reference to the genital system. *Proceedings of the Malacological Society of London* **35:** 139–150.

Berry AJ. 1965. The genital systems of *Discartemon stenostomus* van Benthem Jutting and *Huttonella bicolor* (Hutton) (Pulmonata: Streptaxidae) from Malaya. *Proceedings of the Malacological Society of London* **36:** 221–228.

Blanford WT. 1899. On some species of shells of the genera Streptaxis and Ennea from India, Ceylon and Burma. *Proceedings of the Zoological Society of London* **1899:** 764–770.

Blanford WT, Godwin-Austen HH. 1908. Mollusca: Testacellidae And Zonitidae. In: Bingham CT, ed. *The Fauna of British India including Ceylon and Burma*. London: Taylor and Francis, 1–311.

Bouchet P, Rocroi J-P. 2005. Classification and nomemclature of gastropod families. *Malacologia* **47:** 1–397.

Bruggen AC van. 1967. An introduction to the pulmonate family Streptaxide. *Journal of Conchology* **26:** 181–188.

Bruggen AC van. 1972. On a new streptaxid (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) from Sangihe island, Malay Archipelago, with notes on the distribution of streptaxids in Southeast Asia. *Proceedings of the Koninklÿke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, series C* **75:** 391–401.

Bruggen AC van. 1974. Streptaxidae (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) from Palawan, Philippine Islands. *Proceedings of the Koninklÿke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, series C* **77:** 272–282.

Bruggen AC van. 1975. New data on *Cylindrella cumingiana* Pfeiffer, 1845, type species of the genus *Diaphera* Albers, 1850 (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata: Streptaxidae). *Proceedings of the Koninklÿke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Amsterdam series C* **78:** 167–171.

Dance SP. 1970. Non-marine mollusks of Borneo, I. Streptaxacea: Streptaxidae. *Journal of Conchology* **27:** 149–162.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39:** 783–791.

Fischer-Piette E, Bedoucha J. 1964. Mollusques terrestres de Madagascar, Famille Streptaxidae. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, Zoologie, 2nd serie* **36:** 368–376.

Fischer-Piette E, Blanc F, Salvat F. 1975. Complément aux Mollusques Pulmonés de Madagascar. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, Zoologie, 3rd serie* **198:** 209–278.

Gerlach J, Bruggen AC van. 1999. Streptaxidae Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) of the Seychelles Islands, western Indian Ocean. *Zoologische Verhandelingen* **328:** 1–60.

Godwin-Austen HH. 1882. *Land and Freshwater Mollusca of India, including South Arabia, Baluchistan, Afghanistan, Kashmir, Nepal, Burmah, Pegu, Tenasserim, Malay Peninsula, Ceylon and other islands of the Indian Ocean*, Vol. 1, part 2. London: Taylor and Francis, 19–65.

Godwin-Austen HH. 1920. *Land and Freshwater Mollusca of India, including South Arabia, Baluchistan, Afghanistan, Kashmir, Nepal, Burmah, Pegu, Tenasserim, Malay Peninsula, Ceylon and other islands of the Indian Ocean*, Vol. 3. London: Taylor and Francis, 1–65.

Gray JE. 1860. On the arrangement of the land pulmoniferous Mollusca into families. *Annals and Magazine of Natural History, ser. 3* **6:** 267–269.

Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52:** 696–704.

Herbert DG. 2002. *Gulella salpinx* sp. n., a new critical endangered holoendemic species from the limestone deposits of the Marble Delta, KwaZuluNatal, South Africa (Mollusca: Gastropoda: Streptaxidae). *African Invertebrates* **43:** 125–138.

Huckriede R von. 1967. Molluskenfaunen mit limnischen und brackischen elememten aus Jura, Serpurit und wealden NW-Deutschlands und ihre paläogeographische bedeutung. *Beihefte zum Geologischen Jahrbuch* **67:** 1–263, plates 1–25.

Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17:** 754–755.

Kobelt W. 1904. Die Raublungenschnecken (Agnatha). 1. Abt. Rhytidae & Enneidae. In: Martini FW, Chemnitz JH, eds. *Systematisches Conchylien Cabinet*, I. **12b (1):** 33–326, plates 7–41.

Kobelt W. 1910. Katalog der lebenden schalentragenden Mollusken der Abteilung Agnatha. *Jahrbücher des Nassauischen Vereins für Naturkunde in Wiesbaden* **63:** 138–196.

Martens E, Wiegmann F. 1898. Land und Süsswasser mollusken der Seychellen. *Mitteilugen aus dem Zoologischen, Sammlung des Museums Naturkunde, Berlin* **1:** 1–94.

Möllendorff O von. 1887. Von den Philippine. II. *Jahrbücher der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft* **14:** 253–283.

Möllendorff O von. 1888. Von den Philippinen, V. *Nachrichtsblatt der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft* **20:** 65–90.

Möllendorff O von. 1890. Die landschnecken faun der Insel Cebu. *Bericht der Senckenbergischen Naturfoschenden Gesellschaft* **1890:** 189–292.

Naggs F. 1989. *Gulella bicolor* (Hutton) and its implications for the taxonomy of streptaxids. *Journal of Conchology* **33:** 165–168.

Naggs F. 1994. The reproductive anatomy of *Paropeas achatinaceum* and a new concept of *Paropeas* (Pulmonata: Achatinoidea: Subulinidae). *Journal of Molluscan Studies* **60:** 175–191.

Naggs F. 1997. William Benson and the early study of land snails in British India and Ceylon. *Archives of Natural History* **24:** 37–88.

Naggs F, Raheem D. 2005. Sri Lankan snail diversity: faunal origins and future prospects. *Records of the Western Australian Museum* **Suppl. 68:** 11–29.

Naggs F, Raheem D, Budha P. 2008. The carnivorous slug *Testacella* in Cambridgeshire. *Nature in Cambridgeshire* **50:** 48–51.

Pfeiffer L. 1845. *Cylindrella* II. In: Philippi RA, ed. *Abbildungen und Beschreibungen neuer oder wenig gekannter Conchylien, herausgegeben.* Druck und Verlag von Throdor Fischer, 2: 47–52.

Preece RC. 1982. The land Mollusca of the British Lower Tertiary. *Malacologia* **22:** 731–735.

Quadras JF, Möllendorff O von. 1894. Diagnoses specierum novarum ex insulis Philippinis. *Nachrichtblatt der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft* **26:** 81–104.

Quadras JF, Möllendorff O von. 1895. Diagnoses specierum novarum ex insulis Philippinis. *Nachrichtblatt der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft* **27:** 73–88, 105–121.

Quadras JF, Möllendorff O von. 1896. Diagnoses specierum novarum ex insulis Philippinis. *Nachrichtblatt der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft* **28:** 1–15, 81–93.

Richardson L. 1988. Streptaxacea: Catalog of species, Part I, Streptaxidae. *Tryonia* **16:** 1–326.

Schileyko AA. 1999. Treatise on recent terrestrial pulmonate molluscs: Draparnaudiidae, Caryodidae, Macrocyclidae, Acavidae, Clavatridae, Dorcasiidae, Sculptariidae, Corillidae, Plectopylidae, Megalobulimidae, Strophocheilidae, Cerionidae, Achatinidae, Subulinidae, Glessulidae, Micractaeonidae, Ferrussaciidae. *Ruthenica*, **Suppl. 2, Part 4:** 437–564.

Schileyko AA. 2000. Treatise on recent terrestrial pulmonate molluscs: Rhytididae, Chlamydephoridae, Systrophiidae, Haplotrematidae, Streptaxidae, Spiraxidae, Oleacinidae, Testacellidae. *Ruthenica*, **Suppl. 2, Part 6:** 731–880.

Schileyko AA. 2002. Treatise on recent terrestrial pulmonate molluscs: Helicarionidae, Gymnarionidae, Rhysotinidae, Ariophantidae. *Ruthenica*, **Suppl. 2, Part 9:** 1167–1307.

Smith SW, Overbeek R, Woese CR, Gilbert W, Gillevet PM. 1994. The genetic data environment, an expandable GUI for multiple sequence analysis. *Computer Applications in the Biosciences* **10:** 671–675.

Solem A. 1978. Classification of the land Mollusca. In: Fretter V, Peake J, eds. *Pulmonates*, Vol. 2A. London: Academic Press, 49–97.

Solem A, Yochelson EL. 1979. North American Paleozoic

land snails, with a summary of other Paleozoic non-marine snails. *Geological Survey Professional Paper* **1072:** 1–42.

Staden R. 1993. Staden package update. *Genome News* **13:** 12–13.

Stoliczka F. 1871. Notes on the terrestrial Mollusca from the neighborhood of Moulmein, with descriptions of new species. *Journal of the Asiatic Society of Bengal* **40:** 143–177.

Swofford DL. 2003. *PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods).* Version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Thiele J. 1931. *Handbuch der systematischen Weichtierkunde Thiel 1.* Amsterdam: Gustav Fischer, Jena.

Tryon GW. 1885. *Manual of conchology, Series 2*, Vol. 1. Philadelphia, PA: The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 1–364.

Vermeulen JJ. 1990. Notes on the non marine mollusks of the island of Borneo 1. The genus *Diaphera* (Gastropoda: Pulmonata: Streptaxidae). *Basteria* **54:** 159–165.

Wade CM, Mordan PB, Clarke BC. 2001. A phylogeny of the land snails (Gastropoda: Pulmonata). *Proceedings. Biological Sciences* **268:** 413–422.

Wade CM, Mordan PB, Naggs F. 2006. Evolutionary relationships among the Pulmonata land snails and slugs (Pulmonata, Stylommatophora). *Biological Journal of the Linnean Society* **87:** 593–610.

Winter AJ de, Gomez BJ, Prieto CE. 1999. *Sinistrexcisa*, a new genus of land snail from central West Africa with four new species (Gastropoda: Pulmonata: Streptaxidae). *Journal of Molluscan Studies* **65:** 209–221.

Zilch A. 1960. Gastropoda, Euthyneura. In: Schindewolf OH, ed. *Handbuch der Paläozoologie*, Vol. 6. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 401–834.

Zilch A. 1961. Die Typen und Typoide des Natur-Museums Senckenberg 24: Mollusca, Streptaxidae. *Archiv für Molluskenkunde* **90:** 79–120.

ผลงานตีพิมพ์ฉบับที่ 3

TAXONOMIC RE-EVALUATION OF *CHLORITIS BIFOVEATA* (BENSON 1856) AND *C. DIPLOCHONE* MÖLLENDORFF 1898 (PULMONATA: CAMAENIDAE)

CHIRASAK SUTCHARIT & SOMSAK PANHA

Animal Systematics Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Abstract *Morphological comparison of the two congeneric allopatric camaenid land snails,* Chloritis bifoveata *(Benson 1856) and* C. diplochone *Möllendorff 1898, was evaluated. Both species show strong similarities in some unique characters such as the extraordinary biconcave shell shape. However, the species differ in shell size with* C. bifoveata *the smaller of the two, and also in length of the penis and vagina, again shorter in* C. bifoveata. *The penis and vagina are of almost equal length and size in* C. bifoveata *are almost equal but in* C. diplochone *the penis is longer and more slender than the vagina. The distributions of the species are also very different with* C. bifoveata *occurring in southern Myanmar, Thailand and northern Malaysia and* C. diplochone *in eastern Thailand to the Indochina region.*

Key words Chloritis, *Camaenidae, land snail, Gastropoda, Thailand*

INTRODUCTION

Chloritis Beck 1837, the largest genus of the Camaenidae, consists of eight subgenera (Zilch, 1960) with over 150 nominal species (Richardson, 1985). Identification of the known species has proved to be difficult (Pilsbry, 1891; Godwin-Austen, 1920) due to the diversification and high similarity of shell morphology amongst species. Therefore, taxonomic clarification based only on shell characters is insufficient. Although several authors have highlighted this problem and suggested that the genital anatomy should be elucidated to solve the problem (e.g. Pilsbry, 1891, 1894; Godwin-Austen, 1920), an anatomical review has not been published despite the reproductive anatomy of a few species being known (e.g. Pilsbry, 1894; Moss & Webb, 1896; Rensch, 1933, 1937).

From the 20 or so *Chloritis* species known from Thailand, Laos and Cambodia, *C. bifoveata* (Benson 1856) and *C. diplochone* Möllendorff 1898, with their peculiar biconcave shell shape have been largely overlooked and there are no intensive studies (Gude, 1903, 1906; Panha, 1996). According to the current available information, the distribution of *C. bifoveata* is confined to the Malay Peninsula (Henley & Theobald, 1876; Hemmen & Hemmen, 2001), whilst *C. diplochone* is distributed in Indochina (Möllendorff, 1898; Panha & Thanamitramanee, 1997). Although, Möllendorff 1898 stated that *C. diplochone* has a similar shell morphology to *C. bifoveata*, with only the shell size being different, more than a hundred years later there is still no reported informative characters to discriminate between these two potentially allopatric species. Recently, we have collected snails of both species from various localities in Thailand. These specimens provided an opportunity for anatomical examination to look for new characters including their reproductive anatomy.

The aim of the present study is to conduct a morphological evaluation of *C. diplochone* and *C. bifoveata* including genitalia, radula, jaw and shell micro-sculptures.

MATERIALS AND METHODS

Both shell and live material were collected from eastern and southern Thailand and peninsular Malaysia. Snails were drowned in water and then fixed in 70% v/v ethanol for anatomical examination. Specimens were identified using Benson (1856) and Möllendorff (1898), and later compared with type specimens. For anatomical purposes, three specimens were dissected and the drawing of one specimen was selected as representative of the species. The adults were measured for shell height (h) and shell width (d). The radular formula and teeth shape, embryonic shells and periostracal sculptures were examined under a SEM (JEOL, JSM-5410).

In the description of genitalia, proximal refers to the region closest to the genital orifice and

Contact author : somsakp@sc.chula.ac.th

distal to the region furthest away from the genital orifice. The anatomical abbreviations used are defined by Pilsbry (1894), Sutcharit and Panha (2006), and Sutcharit *et al.* (2007).

Institutional abbreviations CUMZ, Chulalongkorn University, Museum of Zoology, Bangkok, Thailand; SMF, Forschungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Frankfurt, a.m.

SYSTEMATIC DESCRIPTION

Family CAMAENIDAE Albers 1850
Genus *Chloritis* Beck 1837

Type species Helix ungulina Linnaeus 1758; subsequent designation by Martens in Albers (1860).

Diagnosis Shell low discoidal, flattened to concave, small to large and thick to thin, with five or more whorls; umbilicus narrow to wide. Surface smooth or with pits, nodules or granulation arranged along growth lines. Periostracum transparent to moderately thick, brownish and fibrous or with hairs in oblique rows. Aperture rounded, oblique or securiform. Peristome whitish to brownish; lip expanded and slightly reflected. Genitalia without dart apparatus; penial verge present; penis connected to epiphallus, with short to long flagellum. Radula with triangular and tricuspid teeth. Jaw brownish corneous with strong vertical ridges.

Distribution A widely distributed genus ranging from southern China to Japan, Indochina, Sundaic islands, northern part of Australia, New Guinea and New Zealand (Solem, 1959; Zilch, 1960; Richardson, 1985; Schileyko, 2003).

Remarks The genus *Chloritis* comprises 8 subgenera (Zilch, 1960; Vaught, 1989), of which subgenus *Trichochloritis* is distributed in Indochina, Sundalands and the Philippines (Pilsbry, 1894; Schileyko, 2007). *Trichochloritis* as originally nominated included some 40 nominal species (Pilsbry, 1891, 1894). However, the subgeneric position of the species considered here were mainly based on shell characters and geographical distribution (*sensu* Pilsbry, 1891, 1894; Zilch, 1960). The distinguishing characters of the subgenus are a wide umbilicus and the presence of a truncated ridge around the umbilicus (Pilsbry, 1891, 1894; Schileyko, 2007). However, Schileyko (2007) raised *Trichochloritis* to generic level, a change that may have to be re-considered when the anatomy of the type species, "*Helix breviseta* Pfeiffer, 1862", is available for examination and comparison.

Chloritis bifoveata (Benson 1856)
Figs 1A, B, 2A–F, 3A-D; Table 1.

Helix bifoveata Benson 1856: 251; Type locality: Therabuin, Tenasserim, Burma. Henley & Theobald, 1876: 7, pl. 14, fig. 8.
Helix (Chloritis) bifoveata Benson – Pilsbry, 1891: 245, 246; pl. 50, figure between figure 36 and 42.
Chloritis bifoveata (Benson) – Pilsbry, 1891: 320 (figure legend). Richardson, 1985: 87. Hemmen & Hemmen, 2001: 46, fig. 17. Maassen, 2001: 120.
Chloritis (Trichochloritis) bifoveata (Benson) – Pilsbry, 1894: 124. Gude, 1906: 116. Gude, 1914: 167.

Material examined Wat Khao Kok, Kanchnadit, Suratthani: CUMZ 3531; Wat Sathitkhirirom, Khiriratnikhom, Suratthani: CUMZ 4658, 4677; Tam Ka-min, Nasarn, Suratthani: CUMZ 4682; Tam Pannara, Nakornsrithammarat: CUMZ 3533; Khao Poo Chaow, Trang: CUMZ 3510; Khao Huay Haeng, Huay Yod, Trang: CUMZ 3527, 3528; Botanic Garden, Trang: CUMZ 3605, 3607, 3611; Khao Chong, Trang: CUMZ 3501, 4666; Ton Nga Chang Waterfall Wildlife Sanctuary, Songkhla: CUMZ 3786, 4680; Tao Thong Waterfall, Tubpud, Pangnga: CUMZ 3529, 3788, 4672; Tam Nampud, Tubpud, Pangnga: CUMZ 3530, 3532, 3787, 4181; Wat Khiriwong (Tam Koop), Tubpud, Pangnga: CUMZ 3525; 3645; 3789, 4671; Khao Oak Talu, Patthalung: CUMZ 3540, 3601, 3612, 3646; Khao Poo–Khao Ya National Park, Patthalung: CUMZ 3608, 3792; Koh Bu Loanpai, Krabi: 3603; Sra Morakot, Krabi: CUMZ 4662, 4667, 4673, 4676, 4678; Wat Tam Sue, Krabi: CUMZ 3526, 3790, 3791, 4657, 4664, 4665, 4668, 4670, 4674, 4675; Tam Srikesorn, Ratthaphum, Songkhla: CUMZ 4663; Kuan Karong, Satun: CUMZ 4659; La Ngu, Satun: CUMZ 4661; Tarutao National Park, Satun: CUMZ 4660; Bukit Chuping, Peris, Malaysia: CUMZ 3636, 4185; Langawi Island, Peris, Malaysia: CUMZ 3635, 3637.

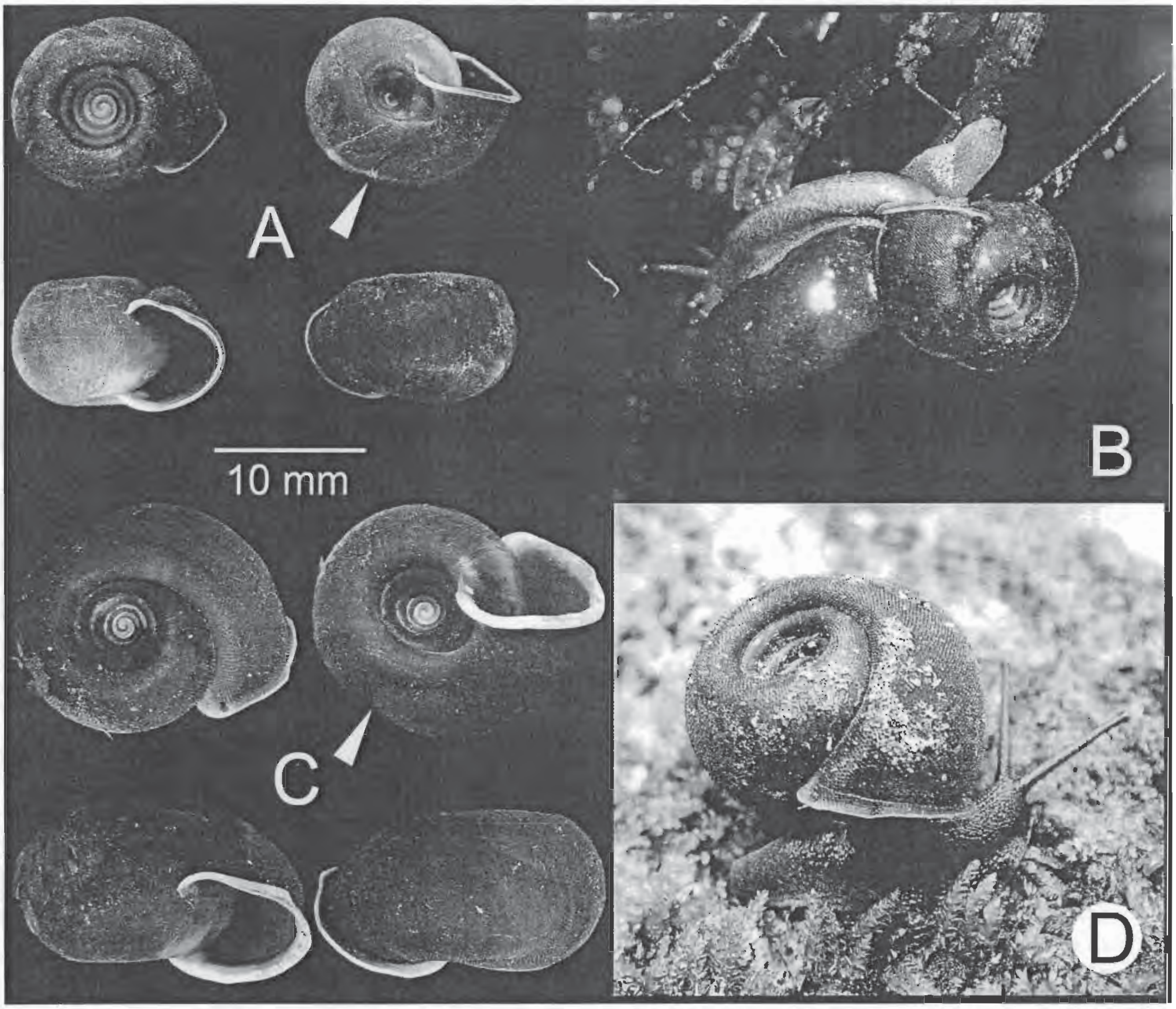


Figure 1 Shells and live snails characteristics. *Chloritis bifoveata* from Songkhla (CUMZ 3786) (A), and from Krabi (CUMZ 3789) with shell width approximately 15 mm (B). *Chloritis diplochone* from Plieu Waterfall (CUMZ 3647) (C), and from Makok Waterfall (CUMZ 3785) with shell width approximately 20 mm (D). White arrows indicate the shell constriction.

Description Shell rather small, thin, dextral, brownish to dark brown in colour, biconcave in shape (dorsoventrally concave) (Fig. 1A, B). Embryonic shell smooth; following whorls with corneous to brownish periostracum, short hairs arranged in an oblique row along the growth line, and transversely micro ridged (Fig. 2A–C). Whorls 5 to 6 well-rounded, increasing regularly; spire concave, resembling an umbilicus. Descent of last whorl beginning about ¼ whorl from aperture, and constriction occurring at about ½ whorl from aperture i.e. opposite aperture. Aperture subvertical, narrowly sickle- or crescent-shaped. Peristome brownish; lip expanded a little and slightly thickened. Umbilicus wide, but narrower than the concave upper side and shouldered.

Radula and jaw Teeth arranged in almost straight rows. Each row with 73 (35–1–37) teeth. Central tooth triangular tricuspid with pointed mesocone and very small ectocones. Lateral teeth tricuspid, mesocone with sharp cusp; ectocone and endocone small (Fig. 2D). Latero-marginal teeth moderately long and oblique tricuspid-shaped; endocone placed near tip of the tooth; ectocone moderately large and located in the middle level of the tooth (Fig. 2E). Outermost teeth short;

Table 1 Shell measurements and whorls count of *Chloritis bifoveata* (Benson 1856) and *Chloritis diplochone* Möllendorff 1898. The number in parentheses are CUMZ catalogue numbers.

Species, Locality and CUMZ nos.	Number	Ranges, Mean ± SD in mm of:			Whorl Ranges
		Shell Height	Shell Width	h/d Ratio	
Chloritis bifoveata					
Botanic Garden Trang (3605, 3607, 3609, 3611)	15	8.7–9.8 9.13 ± 0.35	13.9–16.5 15.37 ± 0.69	0.57–0.62 0.59 ± 0.02	5 1/8–5 7/8
Bukit Chuping, Perlis, Malaysia (3636, 4185)	9	8.5–9.5 9.05 ± 0.41	13.7–16.6 15.24 ± 0.77	0.56–0.62 0.59 ± 0.02	5–5 6/8
Tam Nam Pud, Pangnga (3530, 3532, 3787)	15	8.1–9.8 9.02 ± 0.45	13.3–15.7 14.64 ± 0.72	0.58–0.69 0.62 ± 0.03	5–5 6/8
Wat Tam Keep, Pangnga (3525, 3789)	29	7.8–9.9 8.09 ± 0.53	13.2–16.1 14.62 ± 0.80	0.57–0.65 0.61 ± 0.02	5 1/8–5 6/8
Wat Khao Huay Haeng, Krabi (3527, 3528)	18	7.5–8.9 8.00 ± 0.40	12.1–15.1 13.85 ± 0.80	0.54–0.63 0.58 ± 0.02	5 3/8–5 6/8
Wat Tam Sue, Krabi (3526, 3790, 3791, 4155)	54	7.7–10.1 9.11 ± 0.51	12.7–16.6 14.93 ± 0.83	0.58–0.66 0.61 ± 0.02	5 4/8–6 1/8
Ton Nga Chang W.S., Songkhla (3786)	7	8.0–8.7 8.32 ± 0.25	13.2–14.7 13.98 ± 0.54	0.59–0.61 0.59 ± 0.01	5 4/8–6
Chloritis diplochone					
Makok W.F., Chanthaburi (2620, 3614, 3647, 3785)	7	9.3–10.9 10.11 ± 0.57	17.0–19.4 18.13 ± 0.85	0.53–0.60 0.56 ± 0.02	5 6/8–6 4/8
Trong Nong W.F., Chanthaburi (3602, 3606)	9	8.3–9.9 9.36 ± 0.45	15.9–18.3 17.37 ± 0.95	0.52–0.59 0.54 ± 0.02	5 2/8–6 4/8

mesocone, endocone and ectocone similar in size with pointed cusps (Fig. 2F).

Jaw thickened, corneous-brownish, crescent-shaped, anteriorly convex with cutting margin. Vertical ribs strong and prominent and variable in number (Fig. 3C).

Genitalia Atrium (at) very short. Penis (p) moderately short but broad; epiphallus (e) longer than penis; flagellum (fl) short. Penial retractor muscle (pr) thin and relatively long. Vas deferens (vd) a small tube, connected between free oviduct and end of epiphallus. Internal wall of penis ribbed with series of swollen and smooth longitudinal pilasters (pp), and line introverted to penial chamber to encircle the irregular-shaped penial verge (pv) (Fig. 3A).

Vagina (v) stout, short and about half of penis length. Gametolytic duct (gd) proximally enlarged but suddenly tapering to a small tube; distally connected to swollen gametolytic sac (gs). Free oviduct (fo) small; oviduct (ov) enlarged towards alveoli; prostate gland situated under oviduct. Albumen gland (ag) thin with a long tongue shape. Hermaphroditic gland (hg) with somewhat numerous lobules. Hermaphroditic duct (hd) a small, twisted tube connected close to head of talon (ta). Internal wall of vagina with several longitudinal vaginal pilasters (vp) with swollen and smooth pilaster surface (Fig. 3B).

Living snail The living animal has blackish-grey reticulated skin; dorsally with lighter stripe starting from between posterior tentacles and along dorsal part of body length. Foot pale brown to greyish, posterior tail rather wide with scattered light mottle. Posterior tentacles are drumstick-shaped and distally light brown; anterior tentacles and mouth part are greyish (Fig. 1B). Headwart small and curved, located between posterior tentacles (Fig. 3D). Mantle edge and mantle cavity are blackish.

Distribution *Chloritis bifoveata* was originally reported from the village of Therabuin, Tenasserim or Burma. No subsequent specimens and localities were added for more than 150 years until Hemmen and Hemmen (2001) reported specimens from southern Thailand. The recent collections are known in several localities in southern peninsular Thailand, recorded south of the type locality and ranging from Suratthani, Nakornsrithammarat,

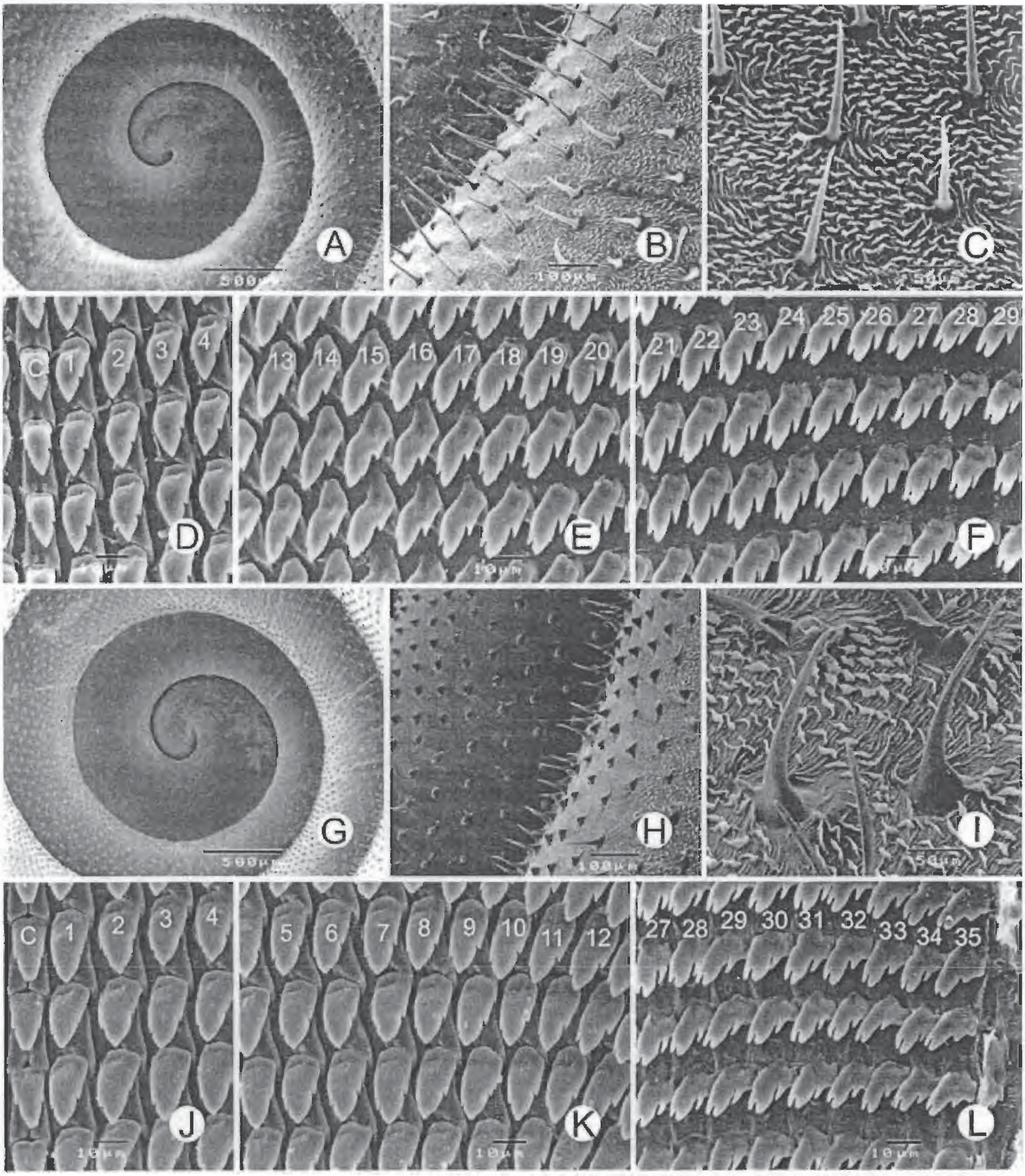


Figure 2 SEM images of protoconch, periostracal structure and radula. *Chloritis bifoveata* from Patthalung (CUMZ 3646) (A–F), and *Chloritis diplochone* from Chanthaburi (CUMZ 3647) (G–L). (A, G) protoconch sculpture. Periostracal structure: (B, H) periostraca with rows of periostracal hairs; (C, I) hairs and micro-sculptures on periostraca. Radula morphology: (D, J) central teeth with the first to the fourth lateral teeth; (E, K) lateral teeth with the transitional tricuspid marginal teeth; (F, L) marginal teeth. Central tooth indicated by 'C'. Numbers indicate the tooth order from lateral to marginal end.

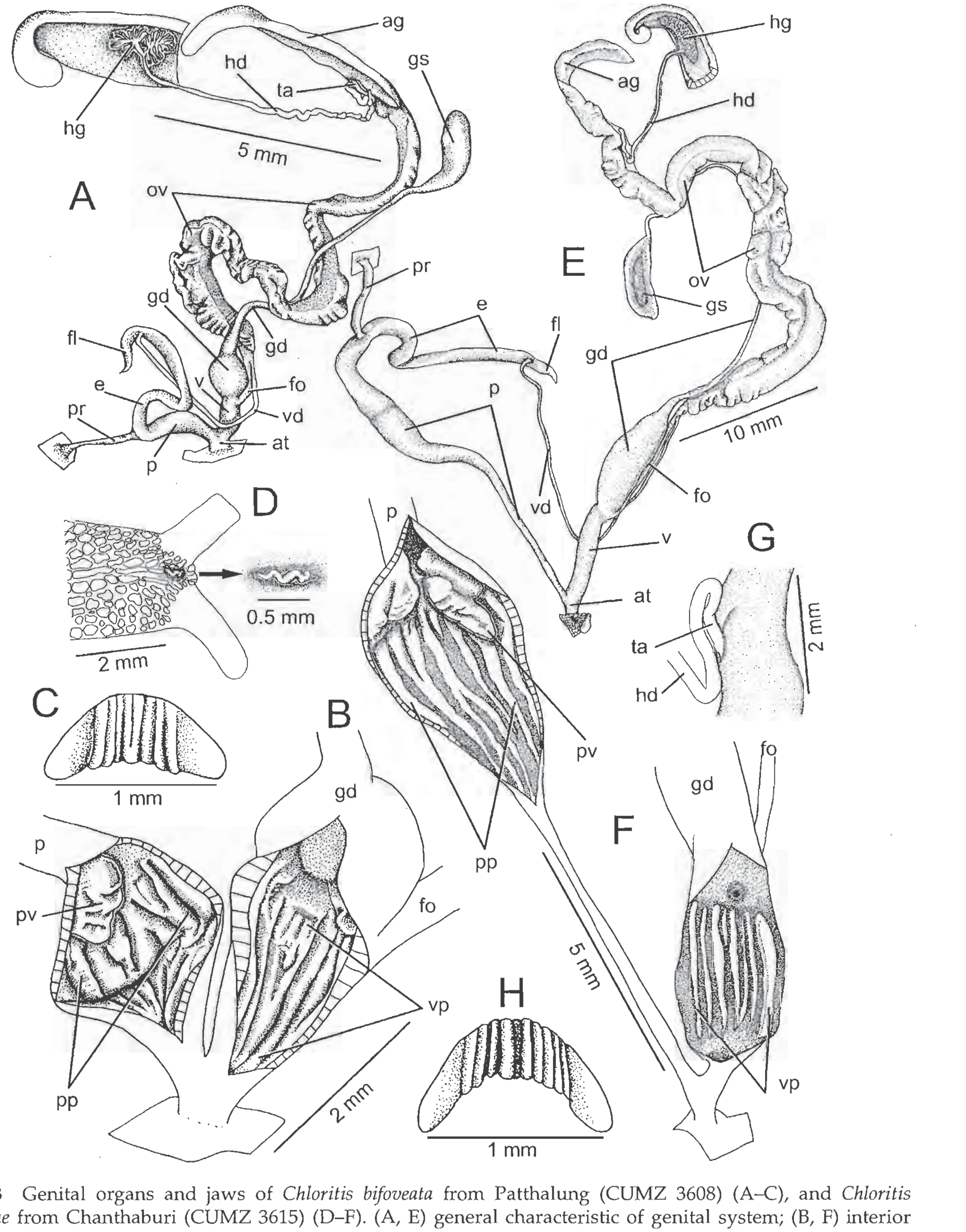


Figure 3 Genital organs and jaws of *Chloritis bifoveata* from Patthalung (CUMZ 3608) (A–C), and *Chloritis diplochone* from Chanthaburi (CUMZ 3615) (D–F). (A, E) general characteristic of genital system; (B, F) interior structures of penis, atrium and vagina chamber; (C, H) jaws; (D) dorsal view of head portion showing headwart. Abbreviations: ag, albumen gland; at, atrium; e, epiphallus; fl, flagellum; fo, free oviduct; gd, gametolytic duct; gs, gametolytic sac; hd, hermaphroditic duct; hg, hermaphroditic gland; ov, oviduct; p, penis; pp, penial pilaster; pr, penial retractor muscle; pv, penial verge; v, vagina; vd, vas deferens; vp, vaginal pilaster.

Trang, Krabi, Patthalung and Songkla Provinces. In Malaysia the snail is recorded from Langawi Island, and several limestone hills in Perlis.

Chloritis diplochone Möllendorff 1898
Figs 1C, D, 2G–L, 3E–H; Table 1.

Chloritis diplochone Möllendorff 1898: 72; Type locality: Boloven. Richardson, 1985: 94.
Chloritis (Trichochloritis) diplochone Möllendorff – Gude, 1906: 116. Zilch, 1966: 301, pl. 7, fig. 8 (Lectotype SMF 8594). Panha, 1996: 36. Panha & Thanamitramanee, 1997: 2, fig. a.

Material examined Lectotype SMF 8594, Paralectotype SMF 8595 (1 shell). Trong Nong Waterfall, Plieu National Park, Chanthaburi: CUMZ 3602, 3606, 3613. Wat Khao Chakan, Srakeo: CUMZ 3609. Khao Soi Dao, Chanthaburi: CUMZ 3610. Makok Waterfall, Chanthaburi: CUMZ 3614, 3615, 3647, 3648, 3785, 3993, 4679, 4681.

Description Shell morphology is similar to the previous species. The major differences are larger shell size, whitish apertural lip and slightly longer periostracal hairs (Figs 1C, D, 2G–I).

Radula and jaw Each row contained about 69 (34–1–34) teeth. Central tooth tricuspid, dulled mesocone and very small ectocones (Fig. 2J, K). Latero-marginal (Fig. 2K), outermost teeth (Fig. 2L) and jaw (Fig. 3H) are similar to previous species.

Genitalia Penis longer and more distinct in penial sculptures than *C. bifoveata*. Atrium (at) very short. Penis (p) extremely long, somewhat slender; proximally very thin; distally a little enlarged. Internal wall of penis ribbed by series of thin longitudinal pilasters (pp). In the distal part pilasters line the introverted penial chamber and encircle penial verge. Penial verge (pv) small and cone shaped (Fig. 3E, F).

Female genital organ similar to the previous species. Only slightly distinct in that the internal wall of vagina possesses several thin longitudinal vaginal pilasters (vp) with smooth pilaster surface (Fig. 3G, F).

Living animal The living snail is blackish grey. Others characters are similar to the previous species.

Distribution *Chloritis diplochone* was known from Boloven Plateau in southern Laos (Möllendorff, 1898) and a hundred years later from eastern Thailand (Panha & Thanamitramanee, 1997). The recent collections were recorded from several localities in Chanthaburi and Srakeo Provinces.

DISCUSSION

Both species described here exhibit a unique biconcave shell with brownish and hairy periostracum, but where the periostracum has disappeared only a hair-base or nodule scars remain. Although, *C. bifoveata* and *C. diplochone* have a similar shell shape and periostracal structures, distinct differences have been observed. *Chloritis diplochone* has a larger shell size (Table 1), and longer penis and epiphallus, whilst *C. bifoveata* has a smaller shell size (Table 1), with a penis of similar length to the vagina, and the proximal part of the gametolytic duct swollen with a rounded shape (see also description and figures). These characteristics provide sufficient evidence for the two entities to be considered separate species. They are allopatric with each having fairly clearly delimited ranges which do not overlap. *Chloritis bifoveata* has been found in southern Thailand and northern peninsular Malaysia, while *C. diplochone* is known only from eastern Thailand and possibly Laos (Möllendorff, 1898).

Only two species of the subgenus *Trichochloritis* out of a total of ten *Chloritis* s.l. species have had their genitalia and radula examined (Wiegmann, 1893; Moss & Webb, 1896; Pilsbry, 1905; Rensch, 1933, 1937; Schileyko, 2007). The absence of a pouch-like enlargement of the penis found in other species, distinguishes both *C. bifoveata* and *C. diplochone*, from for example *C. crassula* (Philippi 1845) (Wiegmann, 1893). The long epiphallus, short flagellum and penial verge provide good characters to distinguish *C. brevidens* (Sowerby 1841) which lacks these (Schileyko, 2007). The camaenid radula with a triangular unicuspid central tooth, tricuspid lateral and marginal teeth and ribbed jaw is found in the two species described here and across the genus (see also Pilsbry, 1894; Moss & Webb, 1896; Pilsbry, 1905; Rensch, 1933, 1937). However, supplementary genital anatomy and radular morphology from the type species and other congener species

is needed to clarify and improve the systematics of the *Chloritis (Trichochloritis)*.

In our survey, snails were found around heavy, decayed logs or tree stumps in moist evergreen forests where they appeared to feed on various fungal species. This may be a temporary condition, but in our long experience of collecting the snails have never been found in other habitats. The snails may possibly live or aestivate in soil, waiting for fungi to fructify on decomposing fallen trees. In tropical evergreen forests like those of Thailand the log decomposition occurs throughout the year. So what appear as temporary habitats may have more permanence. More surveys are needed to clarify this point.

Acknowledgements

We thank the staff of Plieu, Khao Nan, Khao Poo-Khao Ya and Klong Phanom National Parks, and Khao Soi Dao and Ton Nga Chang Wildlife Sanctuaries for their help, so that our fieldwork was possible. We are grateful to R. Janssen (SMF, Frankfurt) and F. Naggs (NHM, London) for their kind permission to study the type specimens and others. We also would like to express our gratitude to Z. Yasin, A. Tan and B. Ng (USM, Malaysia), and P. Tongkerd and N. Tandavanitj for their help in field collecting trips; N. Kitana and S. Natsupakpong for providing some important literature. We also would like to express our gratitude to R. Butcher from the PCU (Publication Counseling Unit), Faculty of Science, Chulalongkorn University for his critical correction of English. This project was funded by Grants for Development of New Faculty Staff, Chulalongkorn University; the RES A1 B1-7; the PTT-TRF/BIOTEC BRTR149024; the CHE-RES-RG; the Darwin Initiative Project (no. 14–653).

References

Albers JC 1860 *Die Heliceen nach natürlicher Verwandtschaft systematisch geordnet* 2. Ausgabe, herausgegeben von Eduard von Martens, Leipzig. 359 pp.

Benson WH 1856 Descriptions of one Indian and nine new Burmese Helices; and notes on two Burmese Cyclostomacea. *Annals and Magazine of Natural History Series 2* **18**: 249–254.

Godwin-Austen HH 1920 Notes on the genus *Chloritis* Beck, with the description of the animal of a new genus. *Burmochloritis Records of the Indian Museum* **29**: 9–11.

Gude GK 1903 A classified list of the helicoild land shells of Asia. *Journal of Malacology* **10**: 5–16.

Gude GK 1906 Further remarks on the genus *Chloritis*, with descriptions of eleven new species. *Proceedings of the Malacological Society of London* **7**: 105–118.

Gude GK 1914 Mollusca II Trochomorphidae-Janellidae *In* Shipley AE & Marshall GAK (eds) *The Fauna of British India, Including Ceylon and Burma.* Taylor and Francis, London. 520 pp.

Hemmen J & Hemmen C 2001 Aktualisierte liste der terrestrischen Gastropoden Thailands. *Schriften zur Malakozoologie aus dem Haus der Natur-Cismar* **18**: 35–70.

Henley S & Theobald W 1876 *Conchologia Indica: Land and freshwater of British India.* Savill, Edward and Co., London. 65 pp., 160 pls.

Maassen WJM 2001 A preliminary checklist of the non-marine molluscs of west Malaysia, A hand list. *De Kreukel Supplement*: 1–155.

Möllendorff O von 1898 Die binnenmollusken Annams. *Nachrichtenbatt der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft* **30**: 65–85.

Moss W & Webb WM 1896 On the anatomy of *Chloritis (Sulcobasis) stirophora* E.A. Smith and *C. rehsei* von Martens. *Journal of Malacology* **5**: 33–36.

Panha S 1996 A checklist and classification of the terrestrial pulmonate snails of Thailand. *Walkerana* **8**: 31–40.

Panha S & Thanamitramanee P 1997 Land snails of Phliu National Park, Thailand. *Papustyla* **11**: 1–3.

Pilsbry HA 1891 *Manual of Conchology, Structural and Systematic with Illustrations of the Species Series 2 Volume 6*. Academy of Natural Sciences, Philadelphia. 324 pp., 69 pls.

Pilsbry HA 1894 *Manual of Conchology, Structural and Systematic with Illustrations of the Species Series 2 Volume 9*. Academy of Natural Sciences, Philadelphia. 336 pp., 71 pls.

Pilsbry HA 1905. Anatomical and systematic notes on *Dorcasia, Trigonephrus*, n. gen., *Corilla, Thersites* and *Chloritis. Proceedings of the Malacological Society of London* **6**: 286–291.

Rensch I 1933 Zur landschneckenfauna von Sumba. *Sitzungsberichte der Gesellschaft naturforschender Freunde* **1933**: 492–508.

Rensch I 1937 Systematische und tiergeographische untersuchung über die landschneckenfauna des Bismarck Archipels, II. *Archiv für Naturgeschichte* **6**: 526–644.

Richardson L 1985 Camaenidae: catalog of species. *Tryonia* **12**: 1–479.

Schileyko AA 2003 Treatise on recent terrestrial pulmonate mollusks. Part 11, Trigonochlamydidae, Papillodesmidae, Vitrinidae, Limacidae, Bielziidae, Agriolimacidae, Boetgerillidae and Camaenidae. *Ruthenica Supplement* **2**: 1467–1626.

SCHILEYKO AA 2007 Treatise on recent terrestrial pulmonate mollusks. Part 15, Oopeltidae, Anadenidae, Arionidae, Philomycidae, Succineidae and Athoracophoridae. *Ruthenica Supplement* **2**: 2049–2208.

SOLEM A 1959 Zoogeography of the land and freshwater Mollusca of the New Hebrides. *Fieldiana Zoology* **43**: 241–359.

SUTCHARIT C, NAGGS F & PANHA S 2007 Systematic review of the land snail genus *Neocepolis* Pilsbry, 1891 (Pulmonata: Camaenidae) from north Vietnam. *Journal of Natural History* **41**: 619–631.

SUTCHARIT C & PANHA S 2006 Taxonomic review of the tree snail *Amphidromus* Albers, 1850 Pulmonata: Camaenidae) in Thailand and adjacent areas: subgenus *Amphidromus*. *Journal of Molluscan Studies* **72**: 1–30.

VAUGHT KC 1989. *A classification of the living Mollusca*. American Malacologists Inc., Florida, USA. 189 pp.

ZILCH A 1966 Die typen und typoide des Natur-Museums Senckenberg 35: Mollusca, Camaenidae 5. *Archiv für Molluskenkunde* **95**: 293–319.

ZILCH A 1960 Gastropoda, Euthyneura *In* SCHINDEWOLF OH (ed.) *Handbuch der Paläozoologie*. Gebrüder Borntraeger, Berlin. 600 pp.

ผลงานตีพิมพ์ฉบับที่ 4

An anatomical note on *Moellendorffia eastlakeana* (Möllendorff, 1882) a camaenid land snail from Vietnam (Gastropoda: Pulmonata: Camaenidae)

Somsak Panha
Chirasak Sutcharit
Animal Systematic Research Unit
Department of Biology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Bangkok, 10330, THAILAND
somsakp@sc.chula.ac.th

Dang Ngoc Can
Department of Zoology
Institute of Ecology and Biological Resources
18 Hoang Quoc Viet Road
Cau Giay, Hanoi, VIETNAM

ABSTRACT

Newly collected specimens of *Moellendorffia eastlakeana* (Möllendorff, 1882) expand the known range of this species into Vietnam. Using these new Vietnamese and existing museum samples we have re-described the species including new information on radula and genital anatomy. Comparison with the type material of *M. callitricha* (Bavay and Dautzenberg, 1899) from Vietnam suggested *M. callitricha* is a junior synonym of *M. eastlakeana*.

Additional keywords: Gastropoda, pulmonate, *Traumatophora*, *Chloritis*, *Trichelix*

INTRODUCTION

The land snail genus *Moellendorffia* Ancey, 1887, has a wide distribution in southeastern China, Hong Kong and Vietnam. The detached peristome, descending aperture with denticles, and hirsute shell with external furrows, confer a very distinctive morphology on the shells (Pilsbry, 1890, 1895, 1902, 1905; Yen, 1939; Azuma, 1982).

Currently, seven species are recognized within this genus, namely: *M. trisinuata* (von Martens, 1867), *M. eastlakeana* (Möllendorff, 1882), *M. hensaniensis* (Gredler, 1885), *M. loxotata* (Mabille, 1887), *M. messageri* (Bavay and Dautzenberg, 1899), *M. spurca* (Bavay and Dautzenberg, 1899), and *M. depressispira* (Bavay and Dautzenberg, 1908) (Pilsbry, 1905; Zilch, 1966; Richardson, 1985).

Originally, *Moellendorffia* was placed by Pilsbry (1890) in a section of *Helix (Stegodera)* Martens, 1876, then reclassified by Pilsbry (1894) as a subgenus of *Helicodonta* Férussac, 1819, and finally (Pilsbry, 1905) as a distinct southeastern Chinese and Indo-Chinese genus related to *Stegodera* and allied to *Chloritis* Beck, 1837. Likewise, *Trichelix* Ancey, 1887, was originally placed by Pilsbry (1905) along with *Moellendorffiella* Pilsbry, 1905, as subgenera within *Moellendorffia*, and *Traumatophora* Ancey, 1887, as a subgenus of *Stegodera*. Subsequently, Schileyko (2003) recognized *Trichelix* as a genus distinct from *Moellendorffia* and Zilch (1959) separated *Traumatophora* as a genus distinct from *Stegodera* on the basis of the possession of a dextral shell with apertural teeth.

The early descriptive work on *Mollendorffia* was restricted to shell morphology (e.g., Pfeiffer, 1862; Mabille, 1887; Bavay and Dautzenberg, 1899; 1908, Pilsbry, 1902; 1905). Subsequently, Habe (1957), Azuma (1982), and Schileyko (2003) provided some additional anatomical information for *M. trisinuata* and *Trichelix eucharista* (Pilsbry, 1902) (= *M. (Trichelix) eucharista*). In this article, we examine specimens of *M. eastlakeana* collected from a forest reserve in northern Vietnam and compare them to museum material originally collected from other locations.

MATERIALS AND METHODS

We examined three specimens of *M. eastlakeana* collected in May 1999 from the Huu Lien Nature Reserve, Lang Son Province, northeastern border of Vietnam, which are now deposited in the Chulalongkorn University, Museum of Zoology (CUMZ). Type and other materials were critically examined in the Senckenberg Museum, Frankfurt (SMF) and Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (MNHN). Terminology for soft anatomy follows that of Habe (1957) and Schileyko (2003). The terms "proximal" and "distal" refer to a position relative to the genital orifice. Methodology for whorl counts and shell measurements follow Kerney and Cameron (1979).

Abbreviations: **at**, atrium; **e**, epiphallus; **fl**, flagellum; **fo**, free oviduct; **gd**, gametolytic duct; **gs**, gametolytic

sac; **hw,** head wart; **ov,** oviduct; **p,** penis; **pp,** penial pilaster; **pr,** penial retractor muscle; **pv,** penial verge; **v,** vagina; **vd,** vas deferens; **vp,** vaginal pilaster.

SYSTEMATICS

Family Camaenidae

Genus *Moellendorffia* Ancey, 1887

Type species: *Helix trisinuata* von Martens, 1867, Hong-Kong, China; by subsequent designation of Pilsbry (1905: 64).

Diagnosis: Shell medium size (11.5×19.5 mm), depressed, rather thin, umbilicate and corneous to brownish. Spire low to slightly convex; embryonic shell nearly smooth; subsequent whorls granulated and with short to long periostracal hairs. Last whorl rounded to shoulder and suddenly descending anteriorly. Aperture trigonal or squarish, entirely free from preceding whorl; usually with barriers inside and externally marked with furrows. Peristome expanded and continuous. Penis and epiphallus long, flagellum short and vagina long. Penial wall with longitudinal pilasters. Radula with triangular-shaped teeth.

Moellendorffia eastlakeana (Möllendorff, 1882)

Helix eastlakeana Möllendorff, 1882: 185 (Tai-mo-shan, Kwangtung, China (= Hong Kong): Lectotype SMF 8328 by Yen, 1939); Möllendorff, 1885: 391, pl. 10, fig. 18. Ancey, 1887: 64

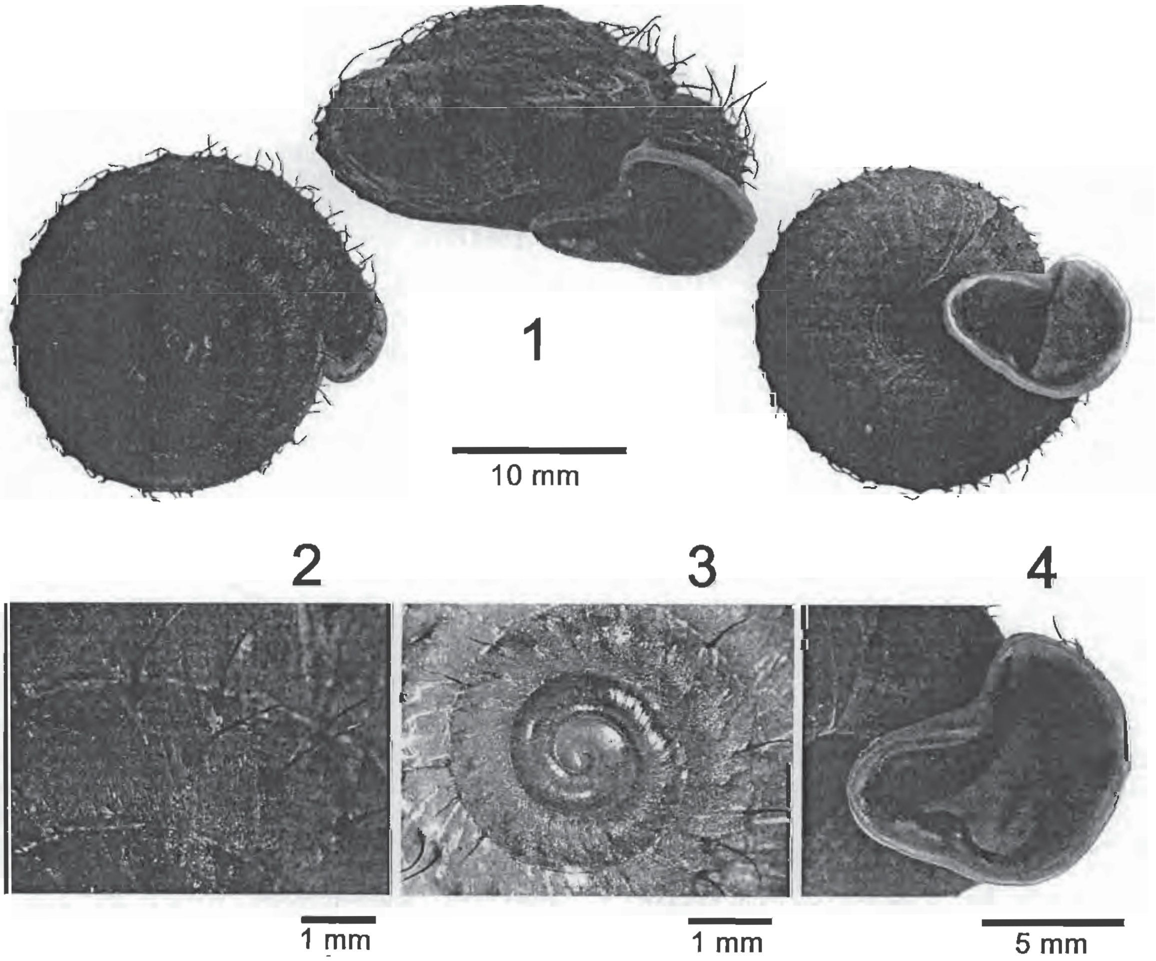
Helix (Moellendorffia) eastlakeana.—Pilsbry, 1890: 12, 13, pl. 1, figs 21, 22; Pilsbry, 1895: 290.

Stegodera eastlakeana.—Pilsbry, 1890: 310 (figure legend), pl. 1, figs 21, 22.

Helix (Moellendorffia) callitricha Bavay and Dautzenberg, 1899: 35, pl. 1, figs 6, 6b (That-Khé near Lang Son, Vietnam).

Moellendorffia eastlakeana.—Pilsbry, 1905: 65; Yen, 1939: 125, 228, pl. 13, fig. 3 (Lectotype SMF 8328); Richardson, 1985: 184.

Moellendorffia callitricha.—Pilsbry, 1905: 66; Richardson, 1985: 183.



Figures 1–4. Shell characteristics of *Moellendorffia eastlakeana*, CUMZ 2547. **1.** Shell morphology. **2.** Shell surface structure and showing the bristles on the periostracum. **3.** Protoconch sculpture **4.** Apertural lamellae.

Moellendorffia (Moellendorffia) eastlakeana.—Zilch, 1966: 210, pl. 6, fig. 52 (Lectotype SMF 8328).

Material Examined: Tai-mo-shan, Hong Kong: Lectotype SMF 8328, Paralectotype SMF 8329 (2 shells); Huu Lien Nature Reserve, Lang Son Province, Vietnam: CUMZ 2547 (1 specimen), CUMZ 2549 (2 shells); That-Khé, Tonkin, Vietnam (1 shell), MNHN Holotype of "*callitricha*"; That-Khé, Tonkin, Vietnam (2 shells), Denis collection (NMHN); That-Khé, Tonkin, Vietnam (1 shell), Staadt collection (NMHN); Tonkin, Vietnam (1 shell), Messager collection (NMHN); Tonkin, Vietnam (2 shells), Messager collection (NMHN)

Measurements: From 10 specimens analyzed; shell height ranged from 12.4 to 14.7 mm (mean 13.5±1.0 mm); shell width ranged from 20.8 to 23.9 mm (mean 22.0±1.2); and whorl count ranged from 6.0 to 6.1 whorls.

Shell: Shell (13.5 mm height, 22.0 mm width) slightly thin, translucent, depressed globose and deeply umbilicate. Spire flat to convex. Shell brownish to light brown; upper surface with long hairs (Figures 1, 2); lower surface with short hairs, few hairs around umbilicus. Shell surface rough, rows of tubercles running obliquely and descending, relatively smooth around umbilicus. Embryonic shell large and with very fine growth lines (Figure 3). Whorls 5-6, slightly convex and increasing regularly; suture depressed. Last whorl rounded and little convex below periphery. Aperture ear-shaped; lip margin light brown and continuously expanded; externally with furrows. Peristome free from preceding whorl and abruptly descending. Aperture brownish inside with well-developed, whitish, and semi-circular palatal and basal lamellae located closed to apertural lip. Two external furrows align with the internal apertural denticles. Parietal callus thickened, elevated, emarginated and obtusely projecting inward (Figure 4).

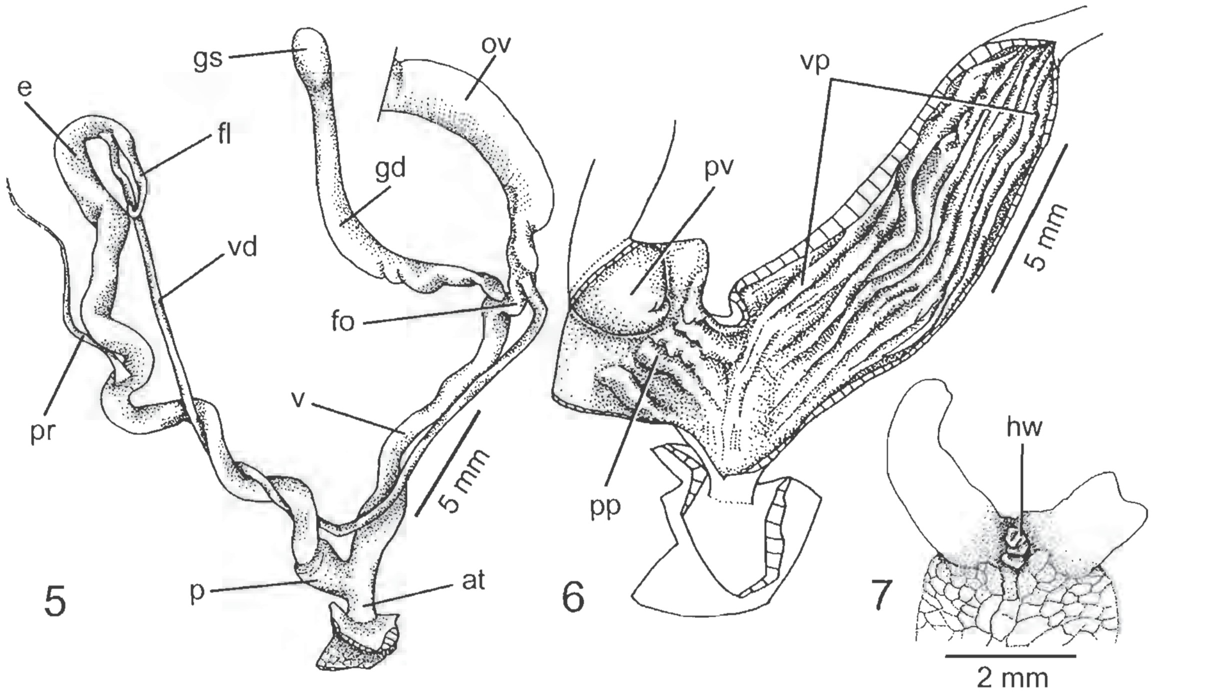
Genitalia: Atrium (**at**) short; penis (**p**) long; proximally with short penial verge and folded at penial verge based; distally long and somewhat slender. Epiphallus (**e**) shorter than penis. Flagellum (**fl**) short, small and without appendix. From free oviduct, vas deferens (**vd**) follows vagina and penis and connects distally on epiphallus. Penial retractor muscle (**pr**) thin and very long (Figure 5).

Internal wall of penis ribbed by series of swollen longitudinal pilasters (**pp**) (Figure 6). Smooth pilasters line introverted penial chamber and encircle penial verge tip. Penial verge (**pv**) short, conic and smooth (Figure 6).

Vagina (**v**) of similar length to penis, cylindrical and held in position by connective tissue attached to foot floor. Slightly swollen proximally; more slender distally. Gametolytic duct (**gd**) as wide as gametolytic sac (**gs**) for most of its length but narrows before gemetolytic sac. Free oviduct (**fo**) short; oviduct (**ov**) small (Figure 5).

Internal wall of vagina possess several longitudinal vaginal pilasters (**vp**) with smooth pilaster surfaces (Figure 6).

Animal: Live animal covered with blackish reticulated skin and dorsally with whitish stripe in middle of the



Figures 5–7. Reproductive system of *Moellendorffia eastlakeana*, CUMZ 2547. **5.** General view of the genital system. **6.** Interior structure of the atrium, penis and vaginal chamber. **7.** Dorsal view showing head wart.

body. A small curve-shaped head wart (**hw**) is located between the posterior tentacles (Figure 7). Foot narrow and long; mantle edge grayish; tentacles gray, and lower tentacles paler. Mantle cavity with blackish pigmentation. Live snails possess short to long periostracal hairs, which mostly break off after death.

Radula: Teeth arranged in anteriorly pointed V-shaped rows, each row contains about 70 (34-(15-17)-1-(15-17)-35) teeth. Central tooth triangular with minute ectocones. Teeth become taller laterally. Lateral teeth tricuspid; endocones and ectocones small and located half way along tooth length (Figure 8). From tooth 16 to 17 outward lateral teeth, the marginal ectocone originates from the tooth base (Figure 9). Marginal teeth rather small, tricuspid and aligned obliquely; endocone becomes taller than mesocone; ectocone located basally (Figure 10), sometimes divided into two or three cusps in outermost teeth.

Distribution: *Moellendorffia eastlakeana* was previously known only from the type locality: Tai-mo-shan, Hong Kong (Möllendorff, 1882, 1885; Pilsbry, 1890; Yen, 1939; Zilch, 1966). Our material was collected from Huu Lien Nature Reserve, Lang Son Province, northeastern border of Vietnam.

Remarks: On examination of the holotype of *M. callitricha* and other topotypic material identified as this species, the only detectable difference was a slightly elevated spire relative to that of the lectotype of *M. eastlakeana* and other material recognized as *M. eastlakeana*. On this basis we consider *M. callitricha* to be a junior synonym of *M. eastlakeana*.

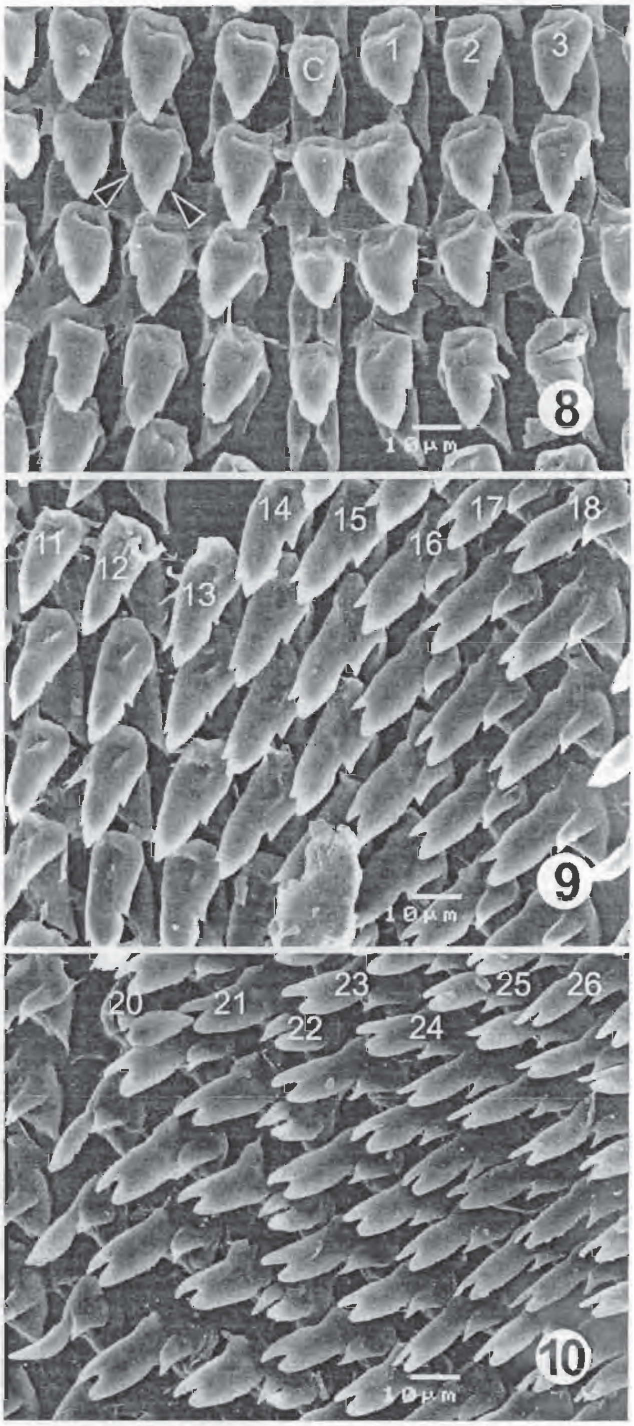
The locality characteristic of our sampling is monsoonal karst landform with high humidity. The snails occurred among the tropical moist deciduous forest. There was rain before the time of our visit in May, 1999. The snails were active, crawling on moist rotten logs.

Moellendorffia (M.) eastlakeana is distinctly different in shell morphology from *M. (M.) messageri* (Bavay and Dautzenberg, 1899), which occurs in the same area. The latter species has a much smaller shell (about 8 mm height; 14 mm width), flattened spire and shouldered last whorl.

DISCUSSION

The newly collected material from Vietnam presents valuable additional information for the taxonomic revision of *Moellendorffia* and it allies. The presence of shell apertural lamellae and shell external furrows appear as common shell characters among *Moellendorffia*, *Trichelix*, and *Moellendorffiella*.

In consideration to the generic relationship, the presence of lamellae and external furrows could be common characters among *Moellendorffia*, *Trichelix*, and *Moellendorffiella*. The long epiphallus, short flagellum, and triangular shape of the radula central tooth in both



Figures 8–10. Scanning electron micrographs of *Moellendorffia eastlakeana* radula, CUMZ 2547. **8.** Central teeth with the first to the third lateral teeth (black arrows indicate endocone and ectocone). **9.** Lateral teeth with the tricuspid marginal teeth transition. **10.** Marginal teeth. Central tooth is indicated by "C" and the other numbers indicate the order of lateral and marginal teeth.

Trichelix and *Moellendorffia* (Habe, 1957; Schileyko, 2003) may support their having a close relationship. The parietal callus free from a preceding whorl, with aperture lamellae, ear shaped aperture, and long hairs are possibly the distinctive characters of *Moellendorffia* sensu stricto. The position of two furrows (upper and lower periphery), parietal callus thickened at the edge, and tuberculated penial wall are probably the unique characteristics of *Trichelix*. Unfortunately, the anatomy of species of *Moellendorffiella* is still lacking for comparison, but the differences between shells of *Moellendorffiella* and *Moellendorffia* are the shouldered last whorl, flattened spire, parietal callus shortly attached to penultimate whorl, and rounded aperture (Pilsbry, 1890, 1905). These differences support the distinct generic position of *Moellendorffia, Trichelix,* and *Moellendorffiella* as proposed by Schileyko (2003). However, with so few samples and, especially, so few different species and informative morphological characters, the exact phylogenetic relationships remain equivocal. To better resolve the exact phylogeny, we suggest that the anatomical examination from more localities within each species range and from different species required is still insufficient, however a molecular based phylogenic approach is required in conjunction with morphology traits.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank F. Naggs (NHM, London), R. Janssen (SMF, Frankfurt), and P. Bouchet and V. Héros (MNHN, Paris) for permitting S.P. and C.S. to investigate type materials, and F.N. for critical comments on the manuscript. We are especially grateful to S. Natsupakpong, P. Tongkerd, N. Pattaramanon, and S. Pholkoksung for providing important literature and assistance in the field. This project was funded by the Thailand Research Fund (TRF), the Thai-French Project TRF-CNRS (BRT 245005), the RES-A1B1-7, the SP2-TKK2555-PERFECTA, and the Darwin Initiative Project (DEFRA).

LITERATURE CITED

Ancey, C.F. 1887. Description of new genera or subgenera of Helicidae. The Conchologists Exchange 1: 64.

Azuma, M. 1982. Colored illustrations of the land snails of Japan. Hoikusha, Japan, i–xvi, 1–343 pp, pls 1–63.

Bavay, A. and P. Dautzenberg. 1899. Descriptions d'espèces nouvelles de l'Indo-Chine, II. Journal de Conchyliologie 47: 28–55, pls 1–3.

Bavay, A. and P. Dautzenberg. 1908. Molluscorum terrestrium Tonkinorum diagnoses. Journal de Conchyliologie 56: 229–251.

Habe, T. 1957. Anatomy of *Moellendorffia (Trihelix) eucharistus* (Pilsbry). The Nautilus 71: 8–9, pl. 1.

Kerney, M.P. and R.A.D. Cameron. 1979. A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe. Collins, London, 288 pp.

Mabille, M.J. 1887. Sur quelques mollusques du Tonkin. Bulletins de la Société Malacologique de France 4: 80–164, pls 1–4.

Möllendorff. O. von. 1882. Diagnoses specierum novarum chinae meridionalis. Jahrbücher der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft 9: 179–188.

Möllendorff. O. von. 1885. Materialien zur fauna von China (Die Auriculaceen, Nachträge und Berichtigungen). Jahrbücher der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft 12: 349–398, Tafel 9–11.

Pfeiffer, L. 1862. Descriptions of thirty six new land shells from the collections of H. Cumming, Esq. Proceedings of the Zoological Society of London 1862: 268–278, pl. 36.

Pilsbry, H.A. 1890–1891. Manual of Conchology, Series 2, Volume 6. The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, Philadelphia, 1–324, pls 1–69.

Pilsbry, H.A. 1893–1895. Manual of Conchology, Series 2, Volume 9. The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, Philadelphia, iii–xlvii, 1–366, pls 1–71.

Pilsbry, H.A. 1902. New land Mollusca from Japan and the Loo Choo islands. Proceeding of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 53: 344–353.

Pilsbry, H.A. 1905. Notes on *Moellendorffia* and *Stegodera*. The Nautilus 19: 63–67, pl. 2.

Richardson, L. 1985. Camaenidae: Catalog of species. Tryonia 12: 1–479.

Schileyko, A.A. 2003. Treatise on recent terrestrial pulmonate mollusks. Trigonochlamydidae, Papillodesmidae, Vitrinidae, Limacidae, Bielziidae, Agriolimacidae, Boetgerillidae, Camaenidae. Ruthenica, Supplement 2. Part 11: 1467–1626.

Yen, T.-C. 1939. Die chinesischen land- und Süßwasser-Gastropoden des Natur-Museums Senckenberg. Abhandlungen der Senckenbergisch-Naturforschenden Gesellschaft 444: 1–234, Tafel 1–16.

Zilch, A. 1959–1960. Gastropoda, Euthyneura. In: Handbuch der Paläozoologie (O. H. Schindewolf, ed.), 6: 1–834. Gebrüder Borntraeger, Berlin.

Zilch, A. 1966. Die typen und typoide des Natur-Museum Senckenberge, 34: Mollusca: Camaenidae (4). Archiv für Molluskenkunde 95: 197–223.

THE RAFFLES BULLETIN OF ZOOLOGY 2010 **58**(2): 251–258
Date of Publication: 31 Aug.2010
© National University of Singapore

A FIRST RECORD OF THE FAMILY CERASTIDAE IN THAILAND, WITH A DESCRIPTION OF A NEW SPECIES (PULMONATA: ORTHURETHRA: CERASTIDAE)

Chirasak Sutcharit
Animal Systematics Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

Fred Naggs
Department of Zoology, The Natural History Museum, Cromwell Road, London, SW7 5BD, UK

Somsak Panha
Animal Systematics Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand
Email: somsak.pan@chula.ac.th (Corresponding author)

ABSTRACT. – This first assessment of the status of the poorly known family Cerastidae in Thailand was made by comparing Thai material with types and additional specimens from natural history museums in Europe. *Rhachistia sulphurea* (Tomlin & Peile, 1930) and *Amimopina subangulatus* (Pfeiffer, 1862) were identified and a new species of *Rhachistia* from Thailand was recognised. We re-describe *A. subangulatus* and describe the new species *Rhachistia conformalis* Sutcharit & Panha, new species, which has a small, thin, elongately conic, dextral, yellowish-white to creamy ground coloured shell. Shell ornamentation consists of two rows of blackish spots and two spiral bands on the lower periphery. Radular teeth are typical of cerastids. The penial appendix is very long, being about twice that of the vaginal length, proximally thin, distally enlarged and of a cylindrical shape. The penis is short, small, proximally cylindrical and distally forming a swollen globular structure. The vagina is large, long and cylindrical in shape with blackish pigmentation along almost its entire length. The bud-like shaped gametolytic sac is very short.

KEY WORDS. – Cerastidae, systematics, taxonomy, anatomy, Orthurethra, Pulmonata, Southeast Asia, Thailand.

INTRODUCTION

The Cerastidae is a family of common orthurethran land snails and consists of approximately 15 genera, which are principally represented in tropical Africa, East, South and Southeast Asia and Australia (Zilch, 1959; Mordan, 1984, 1998; Nordsieck, 1986; Solem, 1988; Vaught, 1989; Schileyko, 1998; Smith & Stanisic, 1998). Phylogenetic and biogeographic work on the Cerastidae has focussed on their disjunct southern hemisphere distribution (Mordan, 1984, 1991, 1992, 1998) and current knowledge of the taxonomy and biogeography of this family is primarily based on African, Indian and Australian taxa (e.g., Gude, 1914; Pilsbry, 1919; Connolly, 1925; Solem, 1959b, 1964a, 1988; Verdcourt, 1961; Mordan, 1986; Smith & Stanisic, 1998; Naggs & Raheem, 2000). To date the only information on Southeast Asian endemic cerastids is the presence of two poorly known species (Pfeiffer, 1862; Tomlin & Peile, 1930). In this study, a new cerastid species from peninsular Thailand is described. *Amimopina subangulatus* (Pfeiffer, 1862), also from Thailand, is re-described following its rediscovery after many years. In providing a taxonomic revision of the Cerastidae in Thailand we fill an important distributional gap, which facilitates future phylogenetic and biogeographic work on this family.

MATERIALS AND METHODS

Snails were sampled throughout central, eastern and southern peninsular Thailand. Living snails were drowned in water and then fixed in 70% (v/v) ethanol for anatomical examination. The genitalia of 3–5 specimens of each species were examined. Radula morphology was examined under a scanning electron microscope. Dissections were carried out under a low power binocular microscope. In descriptions of the genitalia, we used 'proximal' to refer to the region closest to the genital orifice and 'distal' to refer to the region furthest away from the genital orifice.

Anatomical terms largely follow those of Solem (1964a), Mordan (1986, 1992) and Tillier & Mordan (1995), the exception being that we follow our use of gametolytic sac (Sutcharit & Panha, 2006, 2008; Sutcharit, Naggs & Panha, 2007) rather than the inappropriate term spermatheca adopted by these authors: a, anus; ag, albumin gland; ar, appendicular retractor muscle; at, atrium; au, auricle; e, epiphallus; fo, free oviduct; gs, gametolytic sac; hd, hermaphrodite duct; hg, hermaphroditic gland; i, intestine; k, kidney; mc, mantle collar; p, penis; pa, penial appendix; pf, penial flagellum; pn, pneumostome; pr, penial retractor muscle; pv, pulmonary vein; r, rectum; rnu, renal ureter; rtf, rectal fold; so, spermoviduct; v, vagina; vd, vas deferens; ve, ventricle.

The material examined in this study are deposited in the following institutions: The Natural History Museum, London (BMNH), Chulalongkorn University Museum of Zoology, Bangkok, Thailand (CUMZ), National Museum of Well, Cardiff (NMW), Forschungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Frankfurt, a.m. (SMF), and the Zoological Reference Collection, Raffles Museum of Biodiversity Research, National University of Singapore, Singapore (ZRC).

All descriptions of new species are attributable only to first and third authors, Sutcharit and Panha, respectively.

SYSTEMATIC DESCRIPTIONS

Cerastidae Wenz, 1930

Rhachistia Connolly, 1925

Type species. – *Bulimulus rhodotaenia* Martens, 1869; by original designation Connolly, 1925; 163.

Remarks. – *Rhachistia* usually has comparatively small shells, thin to slightly solid and ovate to elongate conic. The surface is smooth, fairly glossy and cream with a series of dark spots and/or bands. The aperture is ovate, peristome simple; umbilicus narrow (Connolly, 1925; Solem, 1959b; Schileyko, 1998). Radula teeth are spatulate with monocuspid central teeth and bicuspid lateral teeth. The genitalia are typical of cerastids, with a very short gametolytic sac, a short to long penial appendix, short penis and a brownish spongy tissue lining the atrium and vagina (Solem, 1973; Smith & Stanisic, 1998).

Rhachistia sulphurea (Tomlin & Peile, 1930)
(Fig. 1A, B)

Errorachis sulphurea Tomlin & Peile, 1930: 153–154, Pl. 17a (type locality: Pran, Siam).
Rhachistia sulphurea — Schileyko, 1998: 169; Hemmen & Hemmen, 2001: 41

Material examined. – The figured specimen in Tomlin & Peile (1930, pl. 17) is designated herein as the lectotype NMW 1955.158.01155 (Fig. 1A), and the paralectotype BMNH 1939.6.6.17 (Fig. 1B).

Remarks. – A bright creamy shell with a yellowish subsutural band clearly distinguishes this species from other known species in this region. Tomlin & Peile (1930) provided a full description of the shell and radula but the genital anatomy is unknown. Our land snail surveys in many locations throughout peninsular Thailand since 1994 have failed to find any specimens that resemble *R. sulphurea*. If the distribution was restricted to the type locality, Pran, Siam, then it is possible that this species is extinct. Pranburi (= Pran sensu Tomlin & Piele, 1930) lies in an area of western Thailand that has been subjected to extensive deforestation since 1930, with most trees having been felled.

Rhachistia conformalis Sutcharit & Panha, new species
(Figs. 1C, D, H; 2A, B; 3A–D)

Type material. – Holotype CUMZ 3796 (Fig. 1C), 1 Sep.2007, coll. S. Panha. Measurements: shell height 19.6 mm, shell width 10.7 mm and with 6½ whorls. Paratype BMNH 20090361 (2 shells); SMF 334685 (2 shells); ZRC MOL.3008 (2 shells); CUMZ 3795 (7 shells), 3797 (1 shell; Fig. 1D), 4086 (5 shells), 4090 (14 shells), 4095 (4 shells), 4287 (7 shells).

Type locality. – Ban Karang, Kaeng Kracharn National Park, Phetchaburi, Peninsular Thailand (12°52'20.04"N 99° 18'20.73"E).

Other material examined. – Pa-La-Oo Waterfall, Kaeng Kracharn National Park, Phetchaburi: CUMZ 4080 (1 shell); Tam Khiriwong, Donsak, Suratthani: CUMZ 4093 (3 shells); Wat Tam Por-ngam, Donsak, Suratthani: CUMZ 4275 (3 shells); Km. 3 (road no. 4100) to Khiriratnikhom, Suratthani: CUMZ 4652 (14 shells); Wat Sathitkhirirom, Khiriratnikhom, Suratthani: CUMZ: 4653 (2 shells); Khao Phanomwang, Kanchanadit, Suratthani CUMZ 3794 (2 shells), 4300 (5 in ethanol), 4654 (6 shells), 4915 (1 in ethanol), 4916 (2 shells); Tam Lod, Khao Nan National Park, Nakhonsrithammarat: CUMZ 4288 (4 shells), 4655 (2 in ethanol).

Etymology. – The specific name is from the Latin '*conformalis*' meaning "like" or "similar". This name refers to the new species possessing a shell superficially similar to those of the sympatric species *Amphidromus glaucolarynx* (Dohrn, 1861) and *Amphidromus semitessellatus* (Morlet, 1884).

Diagnosis. – Comparison of this new species with the type species of *Rhachistia* demonstrates that it shares the generic characters cited above. This new species differs from *R. pulcher* (Gray, 1825) and *R. adumbratus* (Pfeiffer, 1855) from Sri Lanka (see Gude, 1914; Naggs & Raheem, 2000) by having a slightly thinner shell, a creamy ground colour ornamented with two rows of blackish spots on the upper periphery and two spiral bands on the lower periphery, whereas, *R. pulcher* has scattered blackish spots and pale spiral bands, and *R. adumbratus* has only blackish spiral bands on the whitish ground colour with a reddish subsutural band, pink columella area and a spiral band on the periphery.

Description. – Shell elongate conical, small, dextral, thin and fragile; apex acute with dark spot on tip. Whorls convex; suture depressed. Last whorl large, convex, yellowish-white to creamy ground colour with very fine growth lines. In the

final whorl the upper periphery exhibits two rows of blackish spots, one just below the suture, the other runs approximately in middle of the last whorl; below the periphery are two brownish bands; one just below periphery, the other close to the umbilicus. Spire conical, having similar colour pattern to last whorl but slightly paler. Aperture ovate; lip simple and sharp. Parietal callus translucent. Umbilicus narrow; columella short, straight with triangular dilation.

Genitalia. – Atrium (at) rather large, long and without blackish pigments on male side (Fig. 2A). Penial appendix (pa) very long, about twice that of vaginal length, proximally thin, distally slightly enlarged and cylindrical. Penis (p) short, small, proximally cylindrical and distally forms swollen globular structure. Epiphallus (e) larger than vas deferens; penial flagellum (pf) very thin and short. Retractor muscle thin and split into two bundles: penial retractor muscle (pr) inserted on distal globular end of penis, and atrial retractor muscle (ar) inserted on proximal end of penial appendix. Vas deferens (vd) thin tube connected to head of epiphallus.

Vagina (v) large, long, cylindrical with blackish pigmentation along almost entire length (Fig. 2A). Gametolytic sac (gs) very short, bud-like. Free oviduct (fo) short; spermoviduct (so) enlarged and swollen. Albumin gland (ag) slightly enlarged, short and ligulate. Hermaphroditic duct (hd) slender and convoluted. Hermaphroditic gland (hg) forms multiple clumped alveoli embedded in digestive gland.

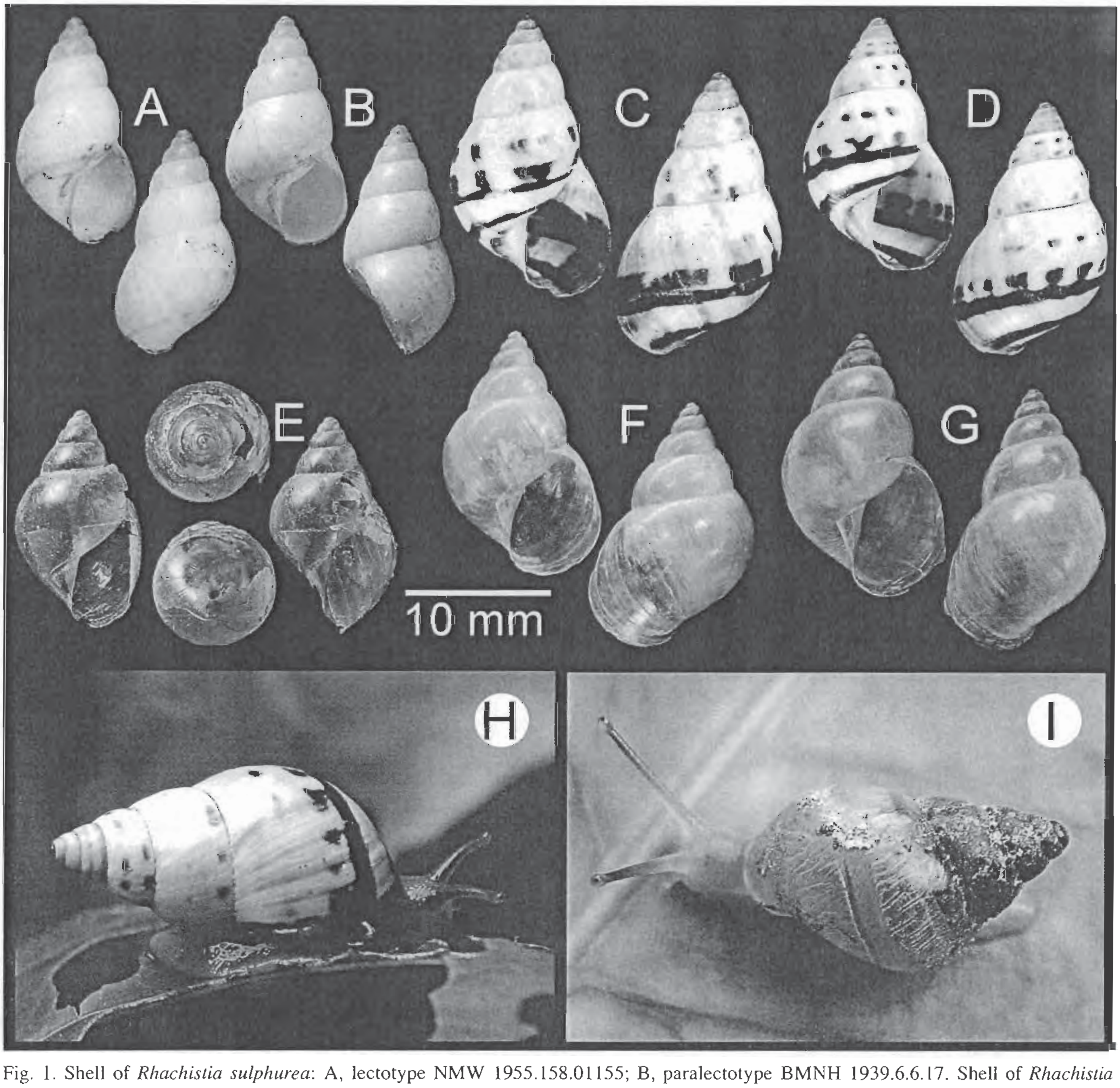


Fig. 1. Shell of *Rhachistia sulphurea*: A, lectotype NMW 1955.158.01155; B, paralectotype BMNH 1939.6.6.17. Shell of *Rhachistia conformalis* Sutcharit & Panha, new species: C, holotype CUMZ 3796; D, paratype CUMZ 3797. Shell of *Amimopina subangulatus*: E, lectotype BMNH 1986166; F, G, specimens from Jed Sao Noi Waterfall, Saraburi (CUMZ 3798, 3799). *Rhachistia conformalis* Sutcharit & Panha, new species: H, at type locality (shell height about 17 mm) CUMZ 3797. *Amimopina subangulatus*: I, at Jed Sao Noi Waterfall, Saraburi (shell height about 15 mm) CUMZ 3650.

Pallial system. – Typical orthurethran form. Auricle (au) and ventricle (ve) located left of kidney (on right in figure). Pulmonary vein (pv) and blood vessel very distinct and well developed at anterior end near mantle collar (mc). Kidney (k) elongate, broadened at base and approximately half of lung cavity length.

Renal ureter (rnu) very thin and attached to kidney; renal fold (rtf) with very thin and transparent ridge located between kidney and rectum (r). Anus (a) adjacent to mantle collar (mc) (Fig. 2B).

Radula. – Teeth arranged in V-shaped rows. Each row contains about 88 (43-1-44) teeth. Central tooth monocuspid; broadly spatulate. Latero-marginal teeth (teeth number 1 to 15) bicuspid, endocone similar to central tooth; ectocone located at base of tooth and with two pointed cusps. Outermost teeth (teeth number 16 to 43 or 44) polycuspid; endocone spatulate with slightly outward oblique cusp; ectocones located laterally and progressively divided up into six pointed cusps.

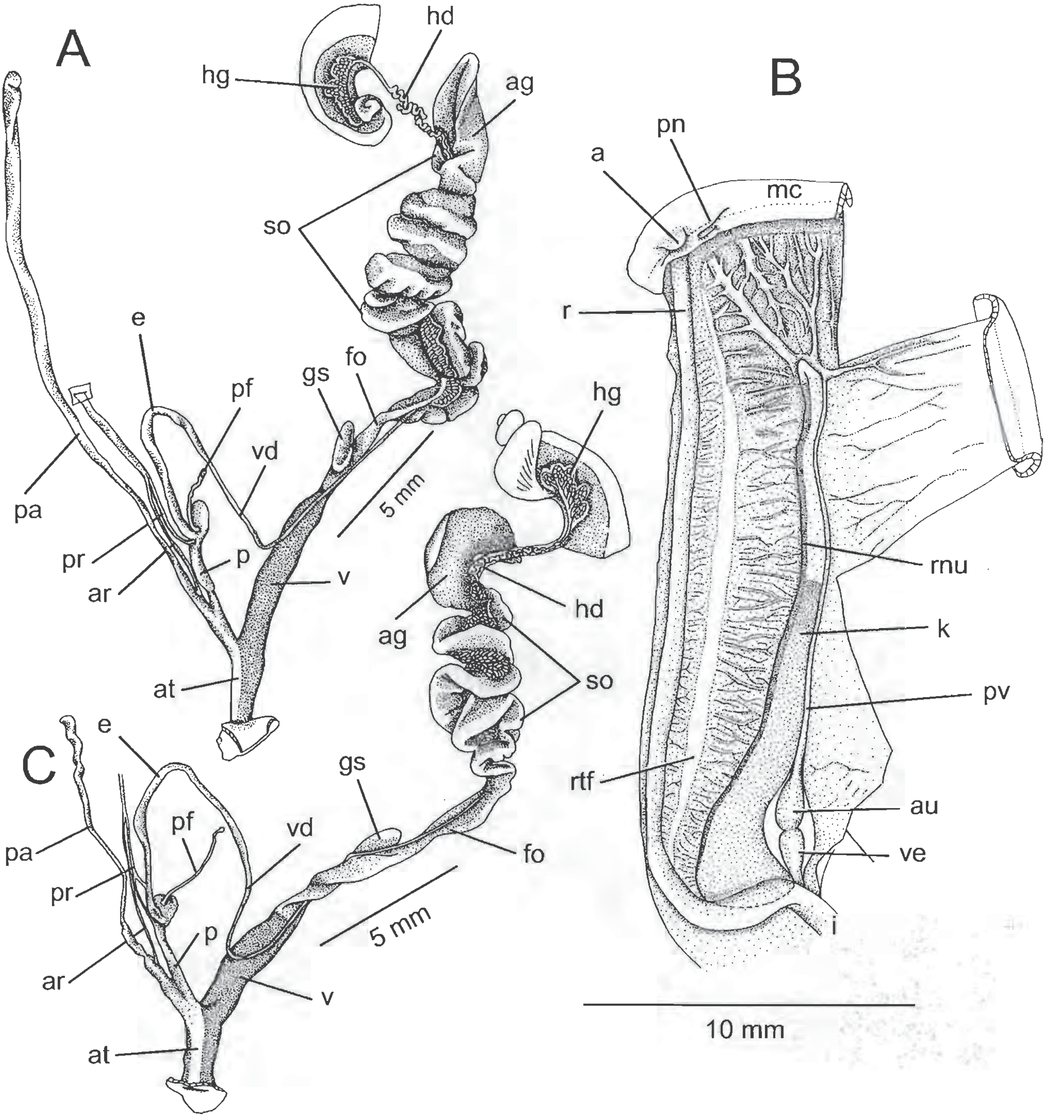


Fig. 2. Anatomy of *Rhachistia conformalis* Sutcharit & Panha, new species (Paratype CUMZ 3797): A, reproductive system; B, pallial system; C, genitalia of *Amimopina subangulatus* from Jed Saw Noi Waterfall, Saraburi (CUMZ 3798).

Distribution. – Peninsular Thailand, ranging from Phetchaburi (the type locality) to Suratthani and Nakhonsrithammarat Provinces.

Remarks. – Superficially similar but obviously distinct from the sympatric *Amphidromus semitessellatus* (Morlet, 1884) in having a smaller dextral shell, with simple lip. Although *A. glaucolarynx* (Dohrn, 1861) has dimorphic shell coiling, it differs by having a thinner and smaller shell, a simple lip and a creamy shell colour. The shapes of the radula teeth and genital morphology of *Amphidromus* and *Rhachistia* are also very distinct (Sutcharit, 2004).

Apart from our new species and *R. sulphurea* there are no unequivocal records of *Rhachistia* from the region. The shell of *R. sulphurea* can generally be distinguished from *R. conformalis* Sutcharit & Panha, new species, in that the former is thick-walled with a uniform sulphur to yellowish colour, as well as having a reddish subsutural band on the last whorl and a pink columella (Tomlin & Peile, 1930).

Rhachistia conformalis Sutcharit & Panha, new species, was found on tree trunks, branches, twigs and leaves of non-specific plants. The snails usually live higher than 2 m above ground, up to canopy height.

Amimopina Solem, 1964

Type species. – *Bulimus macleayi* Brazier, 1876; by original designation Solem, 1964a: 118.

Remarks. – *Amimopina* possesses an ovate conical, small, thin and translucent shell; uniformly corneous or light brownish with thin growth lines on the surface; aperture ovate with a simple peristome (Solem, 1964a; Schileyko, 1998). Radula teeth are monocuspid and spatulate. The genitalia are typical of cerastids with a short gametolytic sac (Solem, 1964a; 1973).

Negligible information is available on *Amimopina* systematics and distribution; the evidence for Schileyko's (1998) assertion that *Amimopina* includes two or three species is not clear. Solem (1964a, b; 1973) provided reliable reports of *Amimopina* from Australia and New Guinea but, primarily owing to the low abundance of these fragile shells and their exhibiting very few taxonomically informative characters, species limits have not been established. Our results and those of Solem (1959a) suggest a close relationship between *Rhachistia* and *Amimopina*. The genera are very similar in possessing a conical shell, a simple peristome and spatulate radula, as well as exhibiting a blackish pigment lining in the vagina and bud-shaped gametolytic sac. Only small differences in the thickness and translucence of the shell, in the very fine growth lines and the monochrome corneous to light brown colour separate them.

Amimopina subangulatus (Pfeiffer, 1862)
(Figs. 1E–G, I; 2C; 3E–H)

Bulimus subangulatus Pfeiffer, 1862: 274, 275 (type locality: Laos Mountains, Cambodia); Martens, 1867: 82; Pfeiffer, 1868: 148; Pfeiffer, 1877: 181.

Amimopina subangulatus—Mordan, 1992: 3, 4.

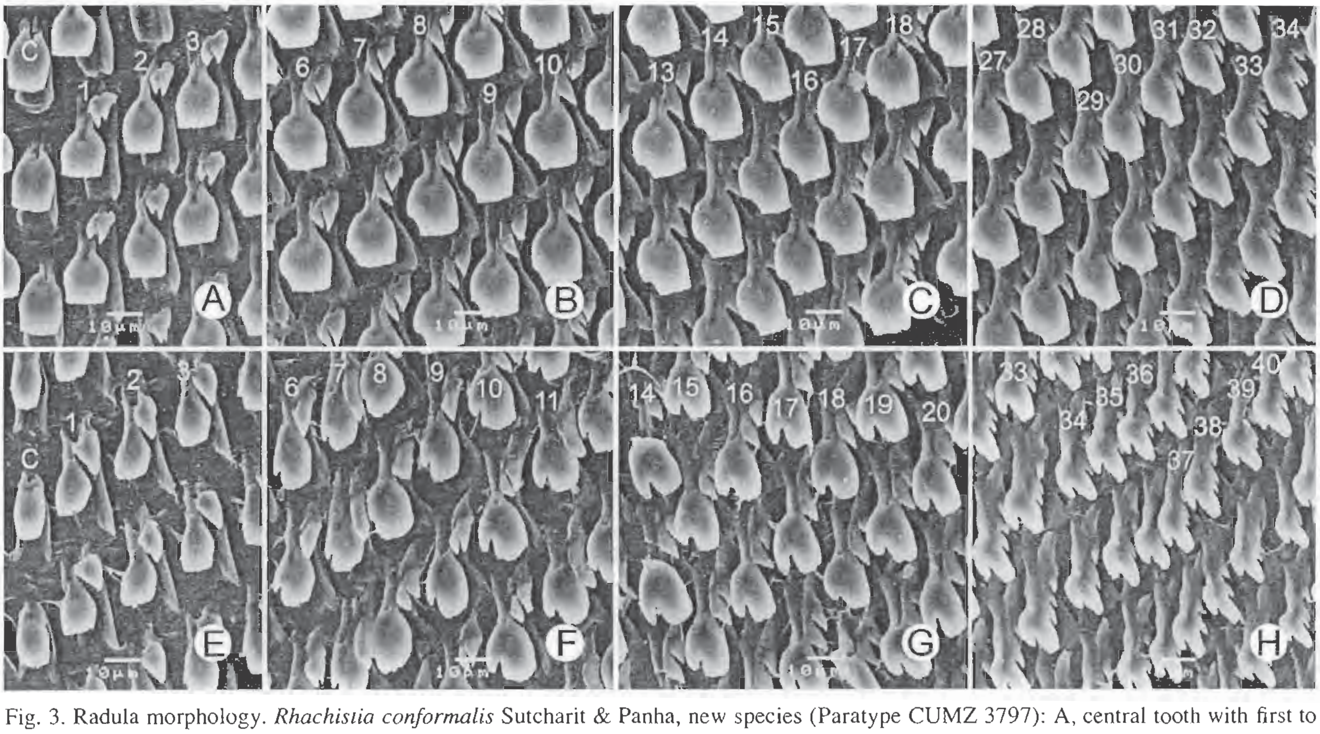


Fig. 3. Radula morphology. *Rhachistia conformalis* Sutcharit & Panha, new species (Paratype CUMZ 3797): A, central tooth with first to third lateral teeth; B, C, lateral teeth with bicuspid marginal teeth transition; D, outermost marginal teeth. *Amimopina subangulatus* (CUMZ 3798): E, central tooth with first to third lateral teeth; F, G, lateral teeth with bicuspid marginal teeth transition; H, outermost marginal teeth. The numbers indicate the order of the teeth and the letter 'C' in the images indicates the central tooth.

Material examined. – Lectotype BMNH 1986166 (Fig. 1E). Pu Kae Botanic Garden, Saraburi: CUMZ 4290 (3 shells). Jed Sao Noi Waterfall, Muaklek, Saraburi: CUMZ 3798 (2 shells; Fig. 1F), 3799 (2 shells; Fig. 1G), 4650 (8 shells). Muaklek Waterfall, Muaklek, Saraburi: CUMZ 4651 (2 in ethanol).

Shell. – Shell rather small, dextral, pellucid, very thin and fragile, ovate conical, and narrowly perforate. Spire short conical; apex acute with dark spot on the tip; 5–6 whorls, slightly convex with depressed suture. Last whorl large, and round. Shell surface with very fine growth lines to nearly smooth. Last two whorls corneous to brownish; somewhat dark brown on first 2–3 whorls. Aperture ovate; lip simple; columella dilated and triangular. Parietal callus transparent.

Genitalia. – Atrium (at) rather large, long, with no black pigment on male side (Fig. 2C). Penial appendix (pa) relatively short, proximally with constriction and enlarging distally. Penis (p) small, distally forms round knotty shape; penial flagellum (pf) very thin and long. Epiphallus (e) slightly larger than vas deferens. Retractor muscle thin and split into three bundles: penial retractor muscle (pr) inserted on proximal end of penial appendix, and atrial retractor muscle (ar) inserted on globular end of penis and epiphallus. Vas deferens (vd) thin tube connected to head of epiphallus (Fig. 2C).

Female reproductive organ is similar to that described for *Rhachistia conformalis* Sutcharit & Panha, new species, except the spread and cover of prominent black pigments extends to approximately half the vaginal length.

Radula. – Teeth arranged in V-shaped rows, each row contains about 99 (48-1-50) teeth. Central tooth monocuspid with notable narrow extension (Fig. 3E). Lateral teeth bicuspid, endocone spatulate, ectocone triangular and located at tooth base (Fig. 3E, F). Marginal teeth tricuspid with small entocone; mesocone rather large with blunt cusp; ectocone with two to four cusps located laterally (Fig. 3G, H).

Distribution. – *Amimopina subangulatus* was described from the Laos Mountains, Cambodia (Pfeiffer, 1862), and so far no one has subsequently reported this species. Including data from the present study, the distribution of this species is confined to the type locality in Cambodia (Pfeiffer, 1862) and to Saraburi Province, central Thailand.

Remarks. – Originally, "*Bulimus subangulatus* Pfeiffer, 1862" was described from only two shells (Pfeiffer, 1862). In this study, we compared the recently collected specimens from Thailand to the lectotype (BMNH 1986166) and found no significant shell morphological differences. No other representatives of this species have been recorded since the types were described almost 150 years ago.

The shell shapes of *A. subangulatus* and *R. conformalis* Sutcharit & Panha, new species, are very similar; the principal differences between these two species are the translucent corneous shell, which is slightly darker in the earlier whorls of *A. subangulatus*, whilst *R. conformalis* has a creamy shell, decorated with two rows of black spots and spiral bands. *Amimopina subangulatus* has a short penial appendix, longer caecum and blackish pigments distributed approximately to half of the vaginal length, while it is spread over nearly the entire vaginal length in *R. conformalis* Sutcharit & Panha new species. The arrangements of excretory, respiratory and circulation systems are similar to the previously mentioned species and to *A. macleayi* (see Solem, 1964a; Smith & Stanisic, 1998).

DISCUSSION

Orthurethran land snails have long been considered to be a basal group within the Stylommatophora. Pilsbry (1900) was influential in establishing groups above family level within the Stylommatophora and introducing the group Orthurethra on the basis of what he considered to be a primitive renal system; the Orthurethra was subsequently described as a primitive and ancient group probably extant since the Palaeozoic (Hyatt & Pilsbry, 1910). Such views were supported by the determination of some Palaeozoic fossil snails as representing orthurethran taxa (Solem 1979; Solem & Yochelson, 1979). A Palaeozoic origin for orthurethrans allowed for the possibility of their having a Pangaean distribution in the early Mesozoic and a subsequent division into Laurasian and Gondwanan groups. Most orthurethran groups currently exhibit a northern distribution but the presence of cerastids in Africa, south-western Arabia, central and southern India, Sri Lanka, New Guinea and Australia provided a reasonable basis for Mordan (1984) to hypothesise that the cerastids have a Gondwanan origin. Tillier (1989) also recognised a basal division of the Orthurethra into Laurasian and Gondwanan clades that he hypothesised as having a vicariant origin. Further support for recognition of Palaeozoic orthurethrans was given by Nordsieck (1985, 1986) and most recently by Stworzewicz et al. (2009). However, molecular phylogenetic trees (Wade et al., 2006) have robustly demonstrated that the Orthurethra are a derived group within the Stylommatophora and on that basis cannot be a basal Stylommatophoran Palaeozoic ancestor for the Stylommatophoran clade. Wade et al. (2006) expressed the view that the extent of homoplasy in pulmonate shell characters did not allow a clear basis for attributing Palaeozoic fossils to the Stylommatophora and suggested that the Palaeozoic snails reported on by Solem and Yochelson (1979) may represent an early colonisation of the land by gastropods that died out, possibly as victims of the Permian/Triassic extinction event [which, incidentally, is quite different to the interpretation attributed to Wade et al. (2006) by Storzewicz et al. (2009: 943) that 'most probably no land snails survived the end Permian mass extinction']. Having demonstrated that, on the evidence of their molecular phylogenetic tree, the Orthurethra is an advanced group, Wade et al. (2006) were nevertheless faced with the difficulty of attributing a time frame for their trees. Such a time frame for the origin and diversification of the Stylommatophora is still far from clear but, on available evidence, they concluded that the Orthurethra probably originated too late to owe its current distribution to Mesozoic plate tectonic events. Their

conclusion was that the Orthurethra is probably of Laurasian origin and that the Cerastidae attained its current southern distribution by dispersal. Thus, our recording of cerastids in Thailand is of considerable interest in this debate. As part of the continental land mass of Asia, the presence of cerastids in Thailand could be attributed to their being representatives of the hypothesised original Laurasian cerastids. This interpretation would be supported if their inclusion in a molecular phylogenetic tree showed them to be basal to New Guinea and Australian cerastid taxa, whereas if they are shown to be a derived group it would support the hypothesis that cerastids are of Gondwanan origin.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the staff of Kaeng Kracharn and Khao Nan National Parks for making the field work possible. We are also grateful to R. Janssen (SMF, Frankfurt), R. G. Moolenbeek (ZMA, Amsterdam), and H. Wood and J. Gallichan (NMW, Cardiff) for kindly permitting the authors to examine specimens and for providing access to literature resources. We are especially grateful to T. Asami, P. Tongkerd, A. Wiwegweaw, and the Animal Systematics Research Unit members for assistance in field collecting and providing key references. We also thank H. Taylor (NHM, London) for photographs of the type specimens. This project was supported by the TRF-MRG4980201, the BRT-R 252108, the CHE-RES-RG Limestone Biodiversity Project, the Darwin Initiative (project 15/018), the Natural History Museum, London, the RES-A1B1-7, and the SP2-TKK2555-PERFECTA and The Rachadapiseksompoj Fund, Chulalongkorn University.

LITERATURE CITED

Brazier, J., 1876. Descriptions of thirty-five new species of land shells from New Guinea, Australia, and islands in the Torres Straits, collected during the Chevert Expedition. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, **1**: 98–113.

Connolly, M., 1925. The non-marine Mollusca of Portuguese East Africa. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, **12**: 105–220.

Dohrn, H., 1861. Descriptions of new shells from the collection of H. Cuming, Esq. *Proceedings of the Zoological Society of London*, **1861**: 205–207.

Gray, J. E., 1825. A list and description of some species of shells not taken notice of by Lamarck. *The Annals of Philosophy (New Series)*, **9**: 407–415.

Gude, G. K., 1914. Mollusca II (Trochomorphidae-Janellidae). In: Shipley, A. E. & G. A. K. Marshall (eds.), *The Fauna of British India, Including Ceylon and Burma*. Taylor and Francis, London. Pp. 1–520.

Hemmen, J. & C. Hemmen, 2001. Aktualisierte liste der terrestrischen Gastropoden Thailands. *Schriften zur Malakozoologie aus dem Haus der Natur-Cismar*, **18**: 35–70.

Hyatt, A. & H. A. Pilsbry, 1911. *Manual of Conchology, Structure and Systematic, with Illustrations of the Species*, 2nd Ser., Vol. 21. Academy of Natural Science Philadelphia, PA. Pp. 1–368.

Martens, E. von, 1867. *Die Preussusche Expedition nach Ost-Asien*. Verlag der Königlichen Geheimen Ober-Hofbuchdruckerei. 477 pp.

Martens, E. von, 1869. Land- u. Süsswassermollusken. In: Peters, W. C. H., J. Cabanis, F. Hilgendorf, E. von. Martens & C. Semper (eds.), *Baron Carl Claus von der Decken's Reisen in Ost-Afrika, in den Jahren 1859-1865, Erste Abtheilung: Säugethiere, Vögel, Amphibien, Crustaceen, Mollusken und Echinodermen, Volume 3*. Leipzig und Heidelberg, Germany. Pp. 55–66, Pls. 1–3.

Mordan, P. B., 1984. Taxonomy and biogeography of southern Arabian Enidae *sensu lato* (Pulmonata: Pupilliacea). In: Solem, A. & A. C. van Bruggen (eds.), *World Wide Snails: Biogeographic Studies on Non-marine Mollusca*. Leiden. Pp. 124–133.

Mordan, P. B., 1986. A taxonomic revision of the southern Arabian Enidae *sensu lato* (Mollusca: Pulmonata). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology Series*, **50**: 207–271.

Mordan, P. B., 1991. The phylogeny of the Cerastinae (Pulmonata: Pupilloidea): Its ecological and biogeographical significance. *Proceedings of the 10th Malacological Congress, (Tübingen 1989)*, **1991**: 561–563.

Mordan, P. B., 1992. The morphology and phylogeny of the Cerastinae (Pulmonata: Pupilloidea). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology Series*, **58**: 1–20.

Mordan, P. B., 1998. The anatomy and phylogeny of the African land snail *Limicena* Connolly, 1925 (Pulmonata: Cerastidae). *Zoologische Mededeelingen*, Leiden, **72**: 59–72.

Morlet, L., 1884. Description d' especes nouvelles de coquilles recueillies, par M. Pavie au Cambode. *Journal de Conchyliologie*, **32**: 386-403.

Naggs, F. & D. Rhaheem, 2000. *Land Snail Ddiversity in Sri Lanka*. Department of Zoology, The Natural History Museum, London. Pp. i–xiv, Pls. 1–246.

Nordsieck, H., 1985. The system of the Stylommatophora (Gastropoda), with special regard to the systematic position of the Clausiliidae, I. Importance of the excretory and genital systems. *Archiv für Molluskenkunde*, **116**: 1–24.

Nordsieck, H., 1986. The system of the Stylommatophora (Gastropoda) with special regard to the systematic position of the Clausiliidae, II. Importance to the shell and distribution. *Archiv für Molluskenkunde*, **117**: 93–116.

Pfeiffer, L., 1855. Descriptions of fifty-seven new species of Helicea from Mr. Cuming's collection. *Proceedings of the Zoological Society of London*, **1855**: 286–298.

Pfeiffer, L., 1862. Description of thirsty-six new land shells from the collection of H. Cuming, Esq. *Proceedings of the Zoological Society of London*, **1862**: 268–278.

Pfeiffer, L., 1868. *Monographiae Heliceorum Viventium Supplementum*. Vol. **6**. Lipsiae: F.A. Brockhaus. 598 pp.

Pfeiffer, L., 1877. *Monographiae Heliceorum Viventium Supplementum*. Vol. **8**. Lipsiae: F.A. Brockhaus. 729 pp.

Pilsbry, H. A., 1900. On the Zoological position of *Partula* and *Achatinella*. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, **52**: 561–567.

Pilsbry, H. A., 1919. A review of the land mollusks of the Belgian Congo chiefly based on the collections of the American Museum Congo expedition, 1909–1915. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **40**: 1–370.

Schileyko, A. A., 1998. Treatise on recent terrestrial pulmonate molluscs, Part 2: Gastrocoptidae, Hypselostomatidae,

Vertiginidae, Truncatellinidae, Pachnodidae, Enidae, Sagdidae. *Ruthenica, Supplement*, **2**: 129–261.

Smith, B. J. & J. Stanisic, 1998. Pulmonata. In: Beesley, P. L., G. J. B. Ross, & A. Wells (eds.), *Mollusca: The Southern Synthesis*. Fauna of Australia Vol. 5. CSIRIO Publishing, Melbourne. Pp. 1037–1125.

Solem, A., 1959a. On the family position of some Palau, New Guinea, and Queensland land snails. *Archiv für Molluskenkunde*, **88**: 151–158.

Solem, A., 1959b. Systematics of the land and fresh-water Mollusca of the New Hebrides. *Fieldiana: Zoology*, **43**: 1–238.

Solem, A., 1964a. *Amimopina*, an Australian Enid land snail. *The Veliger*, **6**: 115–119.

Solem, A., 1964b. New records of new Caledonian non-marine mollusks and an analysis of the introduced mollusks. *Pacific Science*, **18**: 130–137.

Solem, A., 1973. Convergence in pulmonate radulae. *The Veliger*, **15**: 165–171.

Solem, A., 1979. A theory of land snail biogeographic patterns through time. In: Van der Spoel S., A. C. Van Bruggen & J. Lever (eds.), *Pathways in Malacology: 6th European Malacological Congress, Amsterdam, 1977*. Dr W. Junk b.v. Publishers, The Hague. Pp. 225–249.

Solem, A., 1988. Non-camaenid land snails of the Kimberley and Northern Territory, Australia. I. Systematics, affinities and ranges. *Invertebrate Taxonomy*, **2**: 455–604.

Solem, A. & E. Yochelson, 1979. North American palaeozoic non-marine snails. *United States Geological Survey, Professional Paper*, **1072**: 1–42.

Storzewicz, E., J. Szulc, & B. M. Pokryszko, 2009. Late paleozoic continental gastropods from Poland: systematic, evolutionary and paleoecological approach. *Journal of Paleontology*, **83**: 938–945.

Sutcharit, C. & S. Panha, 2006. Taxonomic review of the tree snail *Amphidromus* Albers, 1850 (Pulmonata: Camaenidae) in Thailand and adjacent areas: Subgenus *Amphidromus*. *Journal of Molluscan Studies*, **72**: 1–30.

Sutcharit, C. & S. Panha, 2008. Taxonomic revaluation of *Sarika diadema* (Dall, 1897) and *S. asamurai* (Panha, 1997), two endemic land snails from Thailand (Pulmonata: Ariophantidae: Macrochlamydinae). *Raffles Bulletin of Zoology*, **56**: 95–100.

Sutcharit, C., 2004. *Taxonomic revision and phylogenetic analysis of the tree snail genus* Amphidromus *Albers and implication for biogeography of Thai species*. Ph.D. Thesis, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand. Pp. 168.

Sutcharit, C., F. Naggs, & S. Panha, 2007. Systematic review of the land snail genus *Neocepolis* Pilsbry, 1891 (Pulmonata: Camaenidae) from North Vietnam. *Journal of Natural History*, **41**: 619–631.

Tillier, S. & P. B. Mordan, 1995. Anatomy and systematics of the New Caledonian land snail genus *Draparnaudia* Montrouzier, 1859 (Pulmonata: Orthurethra). *Zoological Journal of the Linnaean Society*, **113**: 47–91.

Tillier, S., 1989. Comparative morphology, phylogeny and classification of land slugs and snails (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora). *Malacologia*, **30**: 1–303.

Tomlin, J. R. le B. & A. J. Peile, 1930. *Eorrhachis* a new genus of bulimoild snails. *Proceedings of the Malacological Society of London*, **19**: 153–154.

Vaught, K. C., 1989. *A classification of the living Mollusca*. American Malacologists, Inc., Florida, USA. Pp. 1–189.

Verdcourt, B., 1961. Notes on east African Enidae. *Journal of Conchology*, **25**: 9–14.

Wade, C. M., P. B. Mordan, & F. Naggs, 2006. Evolutionary relationships among the pulmonate land snails and slugs (Pulmonata, Stylommatophora). *Biological Journal of the Linnean Society*, **87**: 593–610.

Zilch, A., 1959. Gastropoda, Euthyneura. In: Schindewolf, O. H. (ed.), *Handbuch der Paläozoologie, Volume 6*. Gebrüder Borntraeger, Berlin. Pp. 1–400.

ผลงานตีพิมพ์ฉบับที่ 6

J E B	2-099	B	Dispatch: 17.8.10	Journal: JEB	CE: Durga Devi
Journal Name	Manuscript No.		Author Received:	No. of pages: 8	PE: Sathiyaseelan

doi:10.1111/j.1420-9101.2010.02099.x

Enantiomorphs differ in shape in opposite directions between populations

Y. NAKADERA*, C. SUTCHARIT†, T. UBUKATA‡, K. SEKI*, H. UTSUNO*, S. PANHA† & T. ASAMI*

*Department of Biology, Shinshu University, Matsumoto, Japan
†Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok Thailand
‡Institute of Geosciences, Shizuoka University, Shizuoka, Japan

Keywords:

Amphidromus;
chirality;
epigenetics;
gastropod;
geometric morphometry;
maternal effect;
pleiotropy;
pulmonate.

Abstract

Development is left–right reversed between dextral and sinistral morphs of snails. In sympatry, they share the same gene pool, including polygenes for shell shape. Nevertheless, their shell shapes are not the mirror images of each other. This triggered a debate between hypotheses that argue either for a developmental constraint or for pleiotropic effects of the polarity gene. We found that dextrals can be wider or narrower than sinistrals depending on the population, contrary to the prediction of invariable deviation under a developmental constraint. If zygotic pleiotropy is solely responsible, the mean shape of each morph should change, depending on the frequency of the polarity genotype. Our simulations of this mean shape change under zygotic pleiotropy, however, show that the direction of interchiral difference remains the same regardless of genotype frequency. Our results suggest the presence of genetic variation among populations that changes the maternal or zygotic pleiotropic effect of the polarity gene.

Introduction

The left–right polarity (direction) of visceral asymmetry represents the polarity of primary asymmetry that appears in early development in many metazoans, independent of the polarity of secondary asymmetry in external structure such as the eyes of flounders (Okumura *et al.*, 2008). The left–right reversal of primary asymmetry by mutation or physical manipulation leads to the reversal throughout subsequent development (Freeman & Lundelius, 1982; Wood, 1991; Yokokawa *et al.*, 1993; Kuroda *et al.*, 2009). Thus, unless additional factors are involved, individuals that are reversed in primary asymmetry (enantiomorphs) should develop as mirror images of each other. This null hypothesis, however, remains untested in most metazoans, despite the generality of left–right asymmetry (chirality) in internal structure.

Correspondence: Takahiro Asami, Department of Biology, Shinshu University, Matsumoto 390-8621, Japan.
Tel.: +81 0 263 37 2494; fax: +81 0 263 37 2494;
e-mail: asami99@shinshu-u.ac.jp

In pulmonate snails, several studies have found by statistical tests that shell shapes differ between clockwise-coiled (dextral) and counterclockwise-coiled (sinistral) enantiomorphs (Gould *et al.*, 1985; Johnson, 1987; Davison *et al.*, 2009; but see Schilthuizen *et al.*, 2007). The direction of spiral cleavage is determined by a maternal cytoplasmic substance (Freeman & Lundelius, 1982). Thus, the polarity of primary asymmetry exhibits maternal inheritance (Toyama, 1913) at a single nuclear locus in pulmonates (Sturtevant, 1923; Boycott *et al.*, 1930; Fig. 1). Regardless of the genetic determination of blastomere configuration by this maternal effect, physical reversal of the configuration in early spiral cleavage results in the reversal of whole-body asymmetry at least in a nematode (Wood, 1991) and a pulmonate (Kuroda *et al.*, 2009). Thus, the polarity of cell configuration is responsible by itself for the polarity of subsequent development and thus epigenetically determines whether visceral and coiling asymmetries develop dextrally or sinistrally in snails.

Because of this genetic system (Fig. 1), gene flow continues between enantiomorphs across generations where they coexist (Johnson *et al.*, 1990), even if the morphs cannot copulate because of polarity mismatch

© 2010 THE AUTHORS. J. EVOL. BIOL.
JOURNAL COMPILATION © 2010 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

COLOR

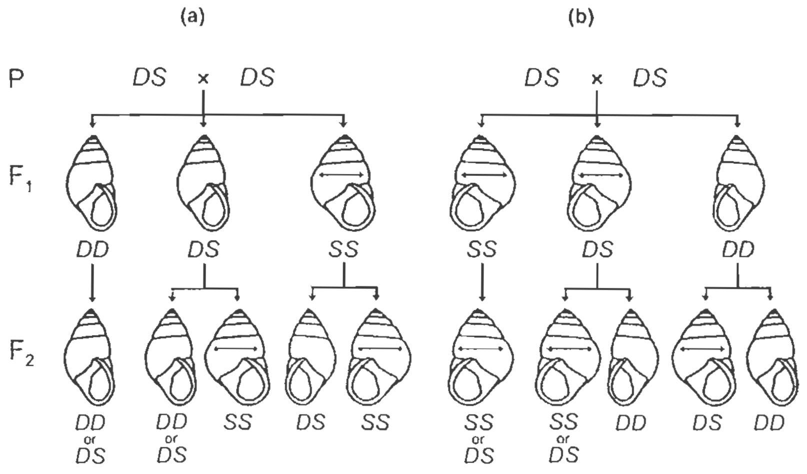


Fig. 1 Maternal inheritance of the left–right polarity and zygotic pleiotropy in shell width, where F_1 siblings mate randomly. (a) The *dextral* allele (*D*) is dominant in its maternal effect on progeny polarity and pleiotropic effect by zygotic expression during ontogeny. The recessive *sinistral* allele (*S*) widens the shell. (b) The *S* allele is dominant in both of these effects.

(Gittenberger, 1988; Asami *et al.*, 1998; Ueshima & Asami, 2003), for example, in the following process. In the system of Fig. 1a, all the progeny of the maternal parent carrying *D* develop dextrally and their genotypes can be *DD*, *DS* or *SS*. Only the recessive homozygotes *SS* produce sinistral progeny (blue). The phenotypically dextral *SS* mates with the dextral *DD* or *DS* with no physical difficulty because of their common phenotype. By this mating, *SS* produces only sinistral progeny, whereas the latter partner (*DD* or *DS*) produces only dextral progeny. Consequently, enantiomorphs in sympatry share the same gene pool (genomic background) across generations, even if their copulation is physically impossible. Accordingly, shape differences between coexisting enantiomorphs indicate that some factor, other than the nuclear genetic background, including polygenes for shell shape (Cook, 1965), differentially affects the morphogenesis of the morphs.

Gould *et al.* (1985) proposed that shape differences between the wild type and sinistral variants in two species of the West Indian land snail genus *Cerion* were caused by a developmental constraint (Gould, 1989), in that left–right reversal is incompatible with subsequent morphogenesis. However, Johnson (1987) showed zygotic pleiotropy, in which the *sinistral* gene (or linked genes) widens shell shape during ontogeny (Fig. 1b), in the Polynesian tree snail *Partula suturalis* Pfeiffer before its extinction in the wild (Murray *et al.*, 1998). Thus, sinistrals were wider but not shorter in the mean phenotype as a result of carrying the *sinistral* allele more frequently than dextrals, although the genotype and phenotype of polarity do not correspond to each other in maternal inheritance (Fig. 1). Davison *et al.* (2009) suggested that some maternal effect of the polarity gene may also be involved in interchiral shape differences in this species. In contrast to these studies, Schilthuizen *et al.* (2007) found no significant differences in shell shape between coexisting enantiomorphs in *Amphidromus inversus* (Müller), although this result was not interpretable with no replicate of population or locality.

Most species of gastropods are fixed for either one or the other enantiomorph, and most chirally dimorphic species of gastropods have gone extinct. At present, the Southeast Asian tree snail genus *Amphidromus* may be the only extant pulmonate group in which populations are frequently dimorphic for primary asymmetry in multiple species (Sutcharit & Panha, 2006; Sutcharit *et al.*, 2007). In *Amphidromus atricallosus* (Gould, 1843), enantiomorphs coexist in the same habitat and mate with each other freely (Sutcharit *et al.*, 2007). Interchiral copulation has been found more frequently than expected in random mating in *A. inversus* (Schilthuizen *et al.*, 2007). All hatchlings from single clutches exhibited the same coiling direction, as predicted in maternal inheritance (Sutcharit *et al.*, 2007; Schilthuizen *et al.*, 2007; Fig. 1). This suggests that the polarity of development in this group is also determined by a maternal effect of the polarity gene as well as in four other superfamilies of pulmonates (Sturtevant, 1923; Degner, 1952; Murray & Clarke, 1976; Asami *et al.*, 2008; Utsuno & Asami, 2010).

Here, we show that enantiomorphs differ in shape from each other in opposite directions among populations of *A. atricallosus*, in contrast to the previously known cases of interchiral differences in single directions. Crossing experiments are necessary to test whether zygotic pleiotropy could explain this result, but remain technically difficult in this group (Sutcharit *et al.*, 2007). Under zygotic pleiotropy, the mean shape of each morph should change depending on the genotype frequency. Thus, we tested whether the mean shapes could become different even in opposite directions under hypothetical zygotic pleiotropy, by simulating a population where the frequencies of polarity genotypes vary. We found that simple zygotic pleiotropy cannot explain the observed shape differences between morphs. Instead, our results

© 2010 THE AUTHORS. *J. EVOL. BIOL.* doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.02099.x
JOURNAL COMPILATION © 2010 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

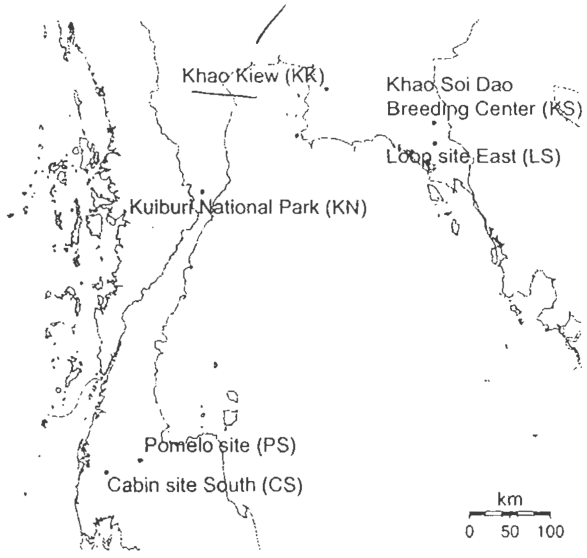


Fig. 2 Locations of shell collecting sites.

suggest that the pleiotropic effect of the polarity gene, whether it operates through maternal substances or zygotic expression, interacts with the genetic structure of populations.

Material and methods

Amphidromus snails exhibit determinate growth by forming a reflected apertural lip at maturity. We used intact adult shells of *A. atricallosus* collected from six areas of 2500–4000 m^2 in Thailand (Fig. 2 and Table 1). We took digital photographs of the shells, each of which we placed in a consistent predetermined orientation under a fixed camera. We reversed the images of sinistrals bilaterally to avoid possible measurement biases resulting from an a priori knowledge of polarity. Using these two-dimensional images, we avoided possible morphometric biases resulting from interactions among shell coiling direction, polarity of vernier caliper which is left–right asymmetric and handedness of a measuring person.

We used a landmark-based geometric morphometric method (Bookstein, 1991; Ubukata, 2003) because it could detect slight differences in shape separately from size by preserving complete information about the relative spatial arrangements of landmarks (Zelditch *et al.*, 2004; Ubukata *et al.*, 2008). We recorded the two-dimensional coordinates of seven landmarks (Fig. 3a). As a size variable, we used centroid size, which is the square root of the summed squared distances from the centroid to the landmarks (Zelditch *et al.*, 2004). As shape variables, we obtained relative warps (RWs) as follows. We removed nonshape properties (size, orientation and position) by generalized least squares Procrustes superimposition (Rohlf & Slice, 1990). Thin-plate spline deformation from the mean shape configuration to each specimen was decomposed into uniform and nonuniform components (partial warps). The principal components of partial warp scores, i.e. RWs were computed to coordinate the shape of each specimen (Rohlf, 1996). For these analyses, we used the program TpsRelw (Rohlf, 2007). We measured the effects of morph, population and centroid size on RW scores by two-way multivariate analysis of covariance (MANCOVA) with size as a covariate.

Table 1 Collection sites and number of specimens used for morphometric analyses. Probabilities show the results of Fisher's exact tests, that detected no significant changes in enantiomorph frequency between years in LS, KN, PS and CS, where intact adult shells were pooled for morphometric analyses. Probabilities indicate significance of differences in enantiomorph frequencies between years and from the ratio 1:1.

Locality name	Coordinates	Collecting area	Collecting year	No. empty adult shells		Prob yearly shift	Prob. deviat. from 1:1	No. intact specimens used for morphometry	
				Dextral	Sinistral			Dextral	Sinistral
KS: Khao Soi Dao Breeding Center, Chanthaburi	12°54′ 96.7″N 102°14′ 59.2″E	50 × 50 m	2004	39	44		0.661	25	25
LS: Loop site East, Makok Waterfall, Chanthaburi	12°35′ 12.8″N 102°15′ 20.9″E	10 × 300 m	2005	87	56	0.345	< 0.001	157	98
			2006	58	32				
			2007	68	56				
KK: Khao Kiew, Chonburi	13°12′ 45.9″N 101°4′ 11.6″E	50 × 50 m	2004	122	81		0.005	104	67
KN: Kuiburi National Park, Prachuap Khiri Khan	12°2′ 83.7″N 99°37′ 51.3″E	10 × 300 m	2005	32	34	0.524	0.695	43	45
			2006	52	44				
PS: Pomelo site, Ban Takun, Surat Thani	8°57′ 36.7″N 98°47′ 45.0″E	40 × 100 m	2003	38	68	1.0	0.001	24	15
			2006	10	18				
CS: Cabin site South, Khao Sok, Surat Thani	8°54′ 29.6″N 98°32′ 23.5″E	50 × 50 m	2005	19	24	0.212	0.110	39	56
			2006	21	31				
			2007	28	34				

© 2010 THE AUTHORS. J. EVOL. BIOL. doi:10.1111/j.1420-9101.2010.02099.x
JOURNAL COMPILATION © 2010 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

COLOR

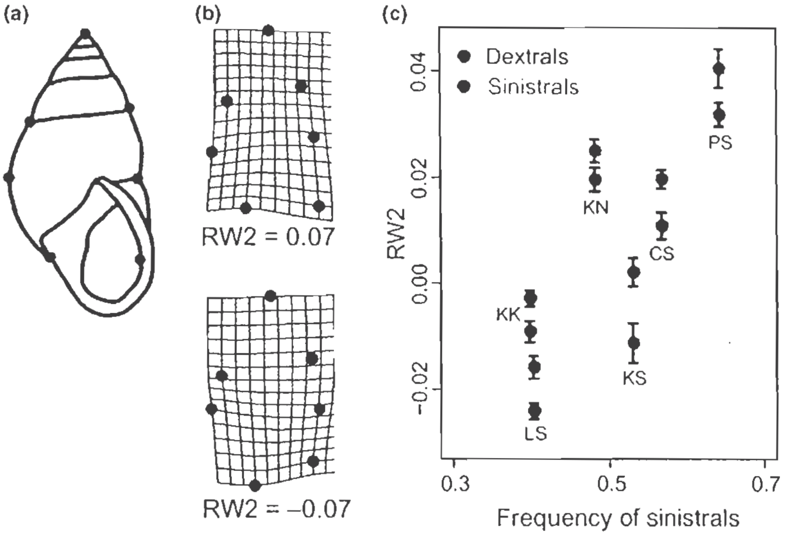


Fig. 3 Interchiral shape differences in *Amphidromus atricallosus* detected by geometric morphometrics. (a) Landmarks used for analyses. (b) Deformation grids corresponding to the shapes of 0.07 and −0.07 in a relative warp RW2, which chiefly represents the aperture width. (c) Variation in RW2 (mean ± SE) among six populations (Fig. 2), which differed in enantiomorph frequencies in empty adult shells.

Table 2 Stable frequencies of genotypes and phenotypes at Hardy–Weinberg equilibrium, where enantiomorphs mate randomly and *D* is dominant to *S* in polarity determination. The maternal genotype at a nuclear locus determines the left–right polarity of progeny. Hypothetically, the *sinistral* allele (*S*) widens the shell aperture three times as much as the *dextral* allele (*D*) through zygotic expression, where *S* is either recessive or dominant in this effect as Fig. 1 illustrates.

Parents	Offspring						
	Dextral			Sinistral			
Mating probability		*DD*	*DS*	*SS*	*DD*	*DS*	*SS*
DD × *DD*	p^4	p^4					
DD × *DS*	$4p^3q$	$2p^3q$	$2p^3q$				
DD × *SS*	$2p^2q^2$		p^2q^2			p^2q^2	
DS × *DS*	$4p^2q^2$	p^2q^2	$2p^2q^2$	p^2q^2			
DS × *SS*	$4pq^3$		pq^3	pq^3		pq^3	pq^3
SS × *SS*	q^4						q^4
Genotypic frequency		p^2	$pq\ (1 + p)$	pq^2		pq^2	q^3
Phenotypic frequency			$p^2 + 2pq$			q^2	
Mean width, where widths of *DD*, *DS*		$(1 + q + 2q^2)/(1 + q)$			$1 + 2q$		
and *SS* are 1, 1 and 3		Fig. 4a, black solid line			Fig. 4a, blue solid line		
Mean width, where widths of *DD*, *DS*		$(1 + 5q)/(1 + q)$			3		
and *SS* are 1, 3 and 3		Fig. 4a, black interrupted line			Fig. 4a, blue interrupted line		

We simulated the relation between mean shell aperture width (as an example of shell shape traits) and the frequencies of the *dextral* (*D*) and *sinistral* (*S*) alleles in hypothetical populations. If *D* is dominant to *S* in its maternal effect on progeny polarity, dextrals can be genotypically *DD*, *DS* or *SS* and sinistrals *DS* or *SS* (Fig. 1a). First, we derived formulas for genotype frequencies at Hardy–Weinberg equilibrium (Table 2). We made *S* widen the aperture three times as much as *D*, with the effect being either recessive or dominant (i.e. the aperture widths of *DD*, *DS* and *SS* were 1, 1 and 3, or 1, 3 and 3, respectively). We chose the values 3 and 1 for simplicity, with no reason to avoid more or less widening effect than three times. We then plotted the mean aperture width of each morph against the frequency of sinistrals in the population. In a second model, we assumed the dominance of *S* in polarity determination (Fig. 1b) and kept the other conditions as in the first model. In the third and fourth models, we examined whether the polarity–shape relationship changes where *D* instead of *S* widens the shape by providing the phenotypic values 3, 3 and 1 or 3, 1 and 1 to *DD*, *DS* and *SS*, whereas the other conditions remain the same as in the first and second models, respectively.

In the fifth model, we introduced the condition of complete disassortative mating into the first model,

considering a case in which interchiral mating was more frequent than expected in random mating in *A. inversus* (Schilthuizen *et al.*, 2007). We let snails continue to mate only with the opposite morph, with the initial frequency of *S* set at 0.05 or 0.9, and the genotype frequencies at Hardy–Weinberg equilibrium (Table 2). In this case, the population shifts to equilibrium with morphs at equal frequencies through negative frequency-dependent selection. We calculated and plotted the mean aperture width every generation until morph frequencies equalized in 100 generations. For the sixth model, we examined the case of incomplete disassortative mating. We reduced the frequency of mating with the same morph in every combination of genotypes by 50% compared with the frequency in random mating, with the initial conditions as in the third model. In this case, the rate of interchiral mating in the population converged to 0.67 as morph frequencies equalized (see Fig. S1). In the wild, however, the morph frequencies are significantly different from 0.5 in many populations (Sutcharit *et al.*, 2007), such that dextrals stay around 35% over several years in *A. inversus* (Schilthuizen *et al.*, 2007).

Results

Testing the developmental constraint hypothesis

Relative warps RW1–RW4 explained 86.5% of total variance of shell shape (see Table S1). RW1 and RW2 mainly reflected variation in widths of shell and aperture, respectively. Shapes differed between morphs and among populations (Table 3). The significant interaction effect between polarity and population indicated that the morph shapes differ from each other in opposite directions among populations. For instance, the aperture of dextrals was wider (larger in RW2; Fig. 3b) than that of sinistrals in KS and KK but narrower in the other populations (Fig. 3c). Morph shapes differed in opposite directions among populations also in RW1, RW3 and RW4 (see Fig. S2). These results conflict with the prediction of the developmental constraint hypothesis that the direction of the interchiral difference will be consistent from population to population. In both morphs, shell shape varied with size, exhibiting anisometry (Table 3). The significant interaction effects between size and population indicate that the pattern of anisometry also varies among populations.

Table 3 Results of two-way multivariate analysis of covariance with centroid size as a covariate, testing effects on relative warps, RW1, RW2, RW3 and RW4.

Factors	d.f.	Pillai trace	Approx. *F*	*P*
Left–right polarity	1	0.05	8.24	< 0.001
Population	5	1.43	65.74	< 0.001
Size	1	0.26	50.68	< 0.001
Polarity × population	5	0.13	4.07	< 0.001
Polarity × size	1	0.01	0.98	0.417
Population × size	5	0.13	3.92	< 0.001
Polarity × population × size	5	0.05	1.47	0.082

Testing the zygotic pleiotropy hypothesis

In our hypothetical populations, in which the *sinistral* (*S*) allele or the *dextral* allele (*D*) widens the shell aperture by zygotic pleiotropy, either sinistrals or dextrals exhibited a consistently wider aperture, regardless of genotype frequency and genetic dominance in widening effect or polarity determination (Fig. 4). The same was also the case when mating was completely or incompletely disassortative between morphs. Therefore, simple zygotic pleiotropy as previously suggested does not explain the reversal of the polarity–shape relationship among populations in this species.

Discussion

This study showed that the shell shapes of enantiomorphs are not mirror images of each other within populations of *A. atricallosus*, consistent with the findings for species of *Cerion* (Gould *et al.*, 1985) and *Partula* (Johnson, 1987). In contrast to these latter cases, however, in *A. atricallosus*, interchiral differences vary significantly in both degree and direction among populations, which rules out the possibility that developmental constraint (Gould, 1989) is responsible for the differences in shape between morphs in this species (Beldade *et al.*, 2002; Frankino *et al.*, 2005).

Our simulations showed that differences in genotypic frequencies or genetic dominance cannot explain differences in the shapes of enantiomorphs that are in opposite directions in different populations, as postulated under zygotic pleiotropy (Johnson, 1987). According to the simulation results, the reversal of polarity–shape relationship between any two populations is possible only where the *S* allele widens the shape in some populations and the *D* allele in other populations. This requires genetic divergence between populations in the interactions or linkage of the polarity gene with other zygotically expressed genes for shape development. Our results illuminate the importance of further studies to examine this possibility by explicit breeding experiments with suitable pulmonates or other animals that are variable in left–right polarity. Enantiomorph frequencies significantly shift between years in the same populations (Sutcharit *et al.*, 2007). Thus, the significance of zygotic pleiotropy for interchiral shape deviation could also be tested by examining whether the mean shape of morph temporally changes along with morph frequency.

The results of the simulations also indicate that morphs cannot be different in opposite directions under zygotic pleiotropy, even if the present populations greatly differed from one other in allele frequency as the morph

© 2010 THE AUTHORS *J. EVOL. BIOL.* doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.02099.x
JOURNAL COMPILATION © 2010 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

COLOR

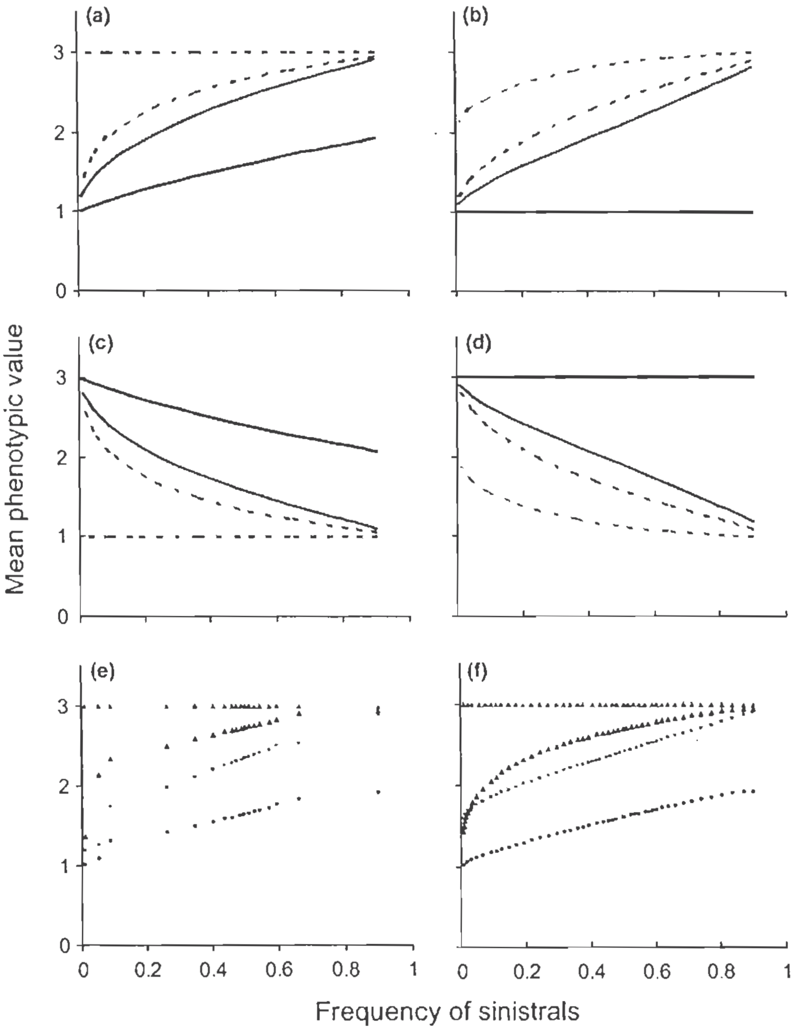


Fig. 4 Mean phenotypic values of dextrals (black) and sinistrals (blue) expected in populations where a zygotic pleiotropic effect of the polarity gene causes interchiral difference in aperture width. (a) The *dextral* allele (*D*) is dominant to the *sinistral* allele (*S*) in polarity determination at Hardy–Weinberg equilibrium. The genotypes *DD*, *DS* and *SS* are given the relative aperture width 1, 1 and 3 (solid lines) or 1, 3 and 3 (interrupted lines), respectively. (b) *D* is recessive to *S*, and *S* widens the aperture as in A. (c) *D* is dominant in polarity determination at Hardy–Weinberg equilibrium and widens the aperture. The phenotypic values of *DD*, *DS* and *SS* are 3, 3 and 1 (solid lines) or 3, 1 and 1 (interrupted lines), respectively. (d) *D* is recessive in polarity determination at Hardy–Weinberg equilibrium and widens the aperture as in C. (e) Changes in mean aperture widths while the enantiomorph frequencies converge to 0.5 under complete disassortative mating. *D* is dominant in polarity determination. The phenotypic values of *DD*, *DS* and *SS* were 1, 1 and 3, respectively. (f) Changes in mean aperture widths under incomplete disassortative mating, where the other conditions are the same as in E.

frequencies suggested. If negative frequency-dependent selection through disassortative mating maintains enantiomorphs, their phenotypic frequencies would generally stay shifting around 0.5. However, their ratios significantly deviated from 1 : 1 in three of the present six populations (after Bonferroni correction, Table 1) and also differed from one another among those populations (Fisher's exact test, $P < 0.001$), as well as in many other populations in multiple species (Schilthuizen *et al.*, 2007; Sutcharit *et al.*, 2007). Thus, the maintenance of chiral dimorphism in the present species cannot be ascribable solely to disassortative mating, and there has been little evidence for an equilibrium in chirally dimorphic populations.

Although coexisting enantiomorphs in pulmonates share a common genetic background, they necessarily differ in a maternal substance for polarity determination and maybe in additional maternal substances produced by genes linked with the polarity gene (Freeman & Lundelius, 1982; Okumura *et al.*, 2008). These substances may differentially affect the shape of enantiomorphs (Davison *et al.*, 2009). However, this is only possible if maternal products of the polarity or linked genes mediate a pleiotropic effect on shape. This maternal pleiotropy could be directly effective only before the maternal–zygotic transition in gene expression proceeds in the 8- to 16-cell stages (Van den Biggelaar, 1971; Edgar *et al.*, 1994; Schier, 2007). Afterwards, cell configuration in spiral cleavage, instead of maternal products, epigenetically determines the polarity of asymmetry in subsequent gene expressions (Hierck *et al.*, 2005; Grande & Patel, 2009) and development linked to visceral and coiling asymmetries (Wood, 1991; Kuroda *et al.*, 2009). Similarly, if maternal pleiotropy underlies the present interchiral shell shape differences, the cell configuration in early spiral cleavage needs to be linking them.

Accordingly, the present changes of polarity–shape relationship depending on population may reflect genetic differences in the epigenetic effect of early development on shape among populations. In support of this view, previous studies also suggested that the polarity of development affects embryonic viability in the land snails *Bradybaena similaris* (Rang) (Utsuno & Asami, 2010) and *Hemizaptyx stimpsoni* (Böttger) (Utsuno *et al.*, 2010). These polarity effects largely depended on the genetic background, which varied among parents and/or inbred lines, similarly to the present results.

Annual patterns of temperature and precipitation greatly vary among the localities where the present samples were collected (Figs S3 and S4). However, they show little correspondence to the present reversals of polarity–shape relationship between populations. Thus, the two major climatic factors, temperature and precipitation, are not likely to be principal factors interacting with the cause of interchiral difference, although unknown environmental effects cannot be ruled out without breeding experiments in common environment.

Snail enantiomorphs have been thought to differ in shell shape from each other in a consistent direction, regardless of rarely found reversed mutants or frequently coexisting enantiomorphs (Gould *et al.*, 1985; Johnson, 1987; Davison *et al.*, 2009). However, our study revealed that how they differ in shape significantly changes among populations. They do differ even in opposite directions depending on populations, which has not been even theoretically expected before this study. This finding is remarkable especially because the morphs have probably long been positively maintained within most populations in species of the subgenus *Amphidromus* that are generally dimorphic for the polarity of primary asymmetry (Sutcharit *et al.*, 2007), in contrast to the case of *P. suturalis* in which enantiomorphs coexisted only in boundary between dextral and sinistral populations (Johnson *et al.*, 1993). Our results suggest that genes for shape dimorphism have diverged between populations while this dimorphism has been maintained through the zygotic or maternal pleiotropic effect of the polarity gene within chirally dimorphic populations.

The present discovery of variability in polarity–shape relationship stems from the advantage of exploiting the external asymmetry in solid shells, which represents primary asymmetry, and the maternal inheritance of polarity at a single locus in pulmonates that are dimorphic for polarity in natural populations. Virtually, no equivalent studies have been pursued in other metazoans, although the genetics and development of primary asymmetry have frequently been studied by utilizing left–right-reversed mutants. Our study demonstrated the presence of genetic variation in zygotic or maternal pleiotropy in morphogenesis. Therefore, our results have important evolutionary implications for the exploration of possible structural changes associated with left–right-reversed development and of the responsible mechanisms for those deviations by calling attention to the function of genetic variability within model animals, which may have been overlooked in other metazoans because of their basic symmetry in external body plans.

Acknowledgments

We thank J. Murray, R. H. Cowie, J. R. Stone and K. Jordaens for critical and helpful comments, and R. Chanabun, B. Kongim, P. Prasankok, P. Tongkerd, A. Wiwegweaw, M. Honda, M. Toda, N. Asami and M. Asami for field assistance. This study was supported by Grants-in-Aid from the Japan Society for the Promotion of Science to T.A and research grants from the CHE-RG Limestone Biodiversity Project to S.P.

References

Asami, T., Cowie, R.H. & Ohbayashi, K. 1998. Evolution of mirror images by sexually asymmetric mating behavior in hermaphroditic snails. *Am. Nat.* **152**: 225–236.

Asami, T., Gittenberger, E. & Falkner, G. 2008. Whole-body enantiomorphy and maternal inheritance of chiral reversal in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Hered.* **99**: 552–557.

Beldade, P., Koops, K. & Brakefield, P.M. 2002. Developmental constraints versus flexibility in morphological evolution. *Nature* **416**: 844–847.

Bookstein, F.L. 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data*. Cambridge University Press, Cambridge.

Boycott, A.F., Diver, C., Garstang, S.L. & Turner, F.M. 1930. The inheritance of sinistrality in *Limnaea peregra* (Mollusca, Pulmonata). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **219**: 51–131. 3

Cook, L.M. 1965. Inheritance of shell size in the snail *Arianta arbustorum*. *Evolution* **19**: 86–94.

Davison, A., Constant, N., Tanna, H., Murray, J. & Clarke, B. 2009. Coil and shape in *Partula suturalis*: the rules of form revisited. *Heredity* **103**: 268–278.

Degner, E. 1952. Der erbgang der invergion bei *Laciniaria biplicata* MTG. *Mtteil. Hamburg. Zool. Mus. Inst.* **51**: 3–61. 4

Edgar, L.G., Wolf, N. & Wood, W.B. 1994. Early transcription in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* **120**: 443–451.

Frankino, W.A., Zwaan, B.J., Stern, D.L. & Brakefield, P.M. 2005. Natural selection and developmental constraints in the evolution of allometries. *Science* **307**: 718–720.

Freeman, G. & Lundelius, J.W. 1982. The developmental genetics of dextrality and sinistrality in the gastropod *Lymnaea peregra*. *W. Roux. Arch. Dev. Biol.* **191**: 69–83. 5

Gittenberger, E. 1988. Sympatric speciation in snails; a largely neglected model. *Evolution* **42**: 826–828.

Gould, A.A. 1843. Descriptions of land mollusks from the province of Tavoy, in British Burmah. *Proc. Boston Soc. Nat. His.* **1843**: 137–141.

Gould, S.J. 1989. A developmental constraint in *Cerion*, with comments on the definition and interpretation of constraint in evolution. *Evolution* **43**: 516–539.

Gould, S.J., Young, N.D. & Kasson, B. 1985. The consequences of being different: sinistral coiling in *Cerion*. *Evolution* **39**: 1364–1379.

Grande, C. & Patel, N.H. 2009. Nodal signalling is involved in left-right asymmetry in snails. *Nature* **457**: 1007–1011.

Hierck, B.P., Witte, B., Poelmann, R.E., Gittenberger-de Groot, A.C. & Gittenberger, E. 2005. Chirality in snails is determined by highly conserved asymmetry genes. *J. Molluscan. Stud.* **71**: 192–195.
Johnson, M.S. 1987. Adaptation and rules of form: chirality and shape in *Partula suturalis*. *Evolution* **41**: 672–675.
Johnson, M.S., Clarke, B. & Murray, J. 1990. The coil polymorphism in *Partula suturalis* does not favor sympatric speciation. *Evolution* **44**: 459–464.
Johnson, M.S., Murray, J. & Clarke, B. 1993. The ecological genetics and adaptive radiation of *Partula* on Moorea. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* **9**: 167–238.
Kuroda, R., Endo, B., Abe, M. & Shimizu, M. 2009. Chiral blastomere arrangement dictates zygotic left–right asymmetry pathway in snails. *Nature* **462**: 790–794.
Murray, J. & Clarke, B. 1976. Supergenes in polymorphic land snails. II. Partula suturalis. *Heredity* **37**: 271–282.
Murray, J., Murray, E., Johnson, M.S. & Clarke, B. 1998. The extinction of *Partula* on Moorea. *Pacific Sci.* **42**: 150–153.
Okumura, T., Utsuno, H., Kuroda, J., Gittenberger, E., Asami, T. & Matsuno, K. 2008. The development and evolution of left-right asymmetry in invertebrates: lessons from *Drosophila* and snails. *Dev. Dyn.* **237**: 3497–3515.
Rohlf, F.J. 1996. Morphometric spaces, shape components and the effects of linear transformations. In: *Advances in Morphometrics* (L.F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G.J.P. Naylor & D.E. Slice, eds), pp. 117–129. Plenum, New York.
Rohlf, F.J. 2007. *TPSRELW, ver. 1.45*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
Rohlf, F. & Slice, D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst. Zool.* **39**: 40–59.
Schier, A.F. 2007. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science* **316**: 406–407.
Schilthuizen, M., Craze, P., Cabanban, A., Davison, A., Stone, J., Gittenberger, E. & Scott, B. 2007. Sexual selection maintains whole-body chiral dimorphism in snails. *J. Evol. Biol.* **20**: 1941–1949.
Sturtevant, A.H. 1923. Inheritance of direction of coiling in *Limnaea*. *Science* **58**: 269–270.
Sutcharit, C. & Panha, S. 2006. Taxonomic review of the tree snails *Amphidromus* Albers, 1850 (Pulmonata: Camaenidae) in Thailand and adjacent areas: subgenus *Amphidromus*. *J. Moll. Stud.* **72**: 1–30.
Sutcharit, C., Asami, T. & Panha, S. 2007. Evolution of whole-body enantiomorphy in the tree snail genus *Amphidromus*. *J. Evol. Biol.* **20**: 661–672.
Toyama, K. 1913. Maternal inheritance and mendelism. *J. Genet.* **2**: 351–404.
Ubukata, T. 2003. A morphometric study on morphological plasticity of shell form in crevice-dwelling Pterioida (Bivalvia). *Biol. J. Linn. Soc.* **79**: 285–297.
Ubukata, T., Kitamura, A., Hiramoto, M. & Kase, T. 2008. A 5000-year fossil record of larval shell morphology of submarine cave microshells. *Evolution* **63**: 295–300.
Ueshima, R. & Asami, T. 2003. Single-gene speciation by left-right reversal. *Nature* **425**: 679.
Utsuno, H. & Asami, T. 2010. The maternal inheritance of racemism in the terrestrial snail *Bradybaena similaris*. *J. Hered.* **101**: 11–19.
Utsuno, H., Kasem, S., Fukuda, H. & Asami, T. 2010. Genetic basis of racemism and ease of interchiral mating in a clausiliid species of snails. *Molluscan. Res.* **30**: 37–47.
Van den Biggelaar, J.A.M. 1971. RNA synthesis during cleavage of the *Lymnaea* egg. *Exp. Cell Res.* **67**: 207–210.
Wood, W.B. 1991. Evidence from reversal of handedness in *C. elegans* embryos for early cell interactions determining cell fates. *Nature* **349**: 536–538.
Yokokawa, T., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Montgomery, C.A., Elder, F.F. & Overbeek, P.A. 1993. Reversal of left-right asymmetry: a situs inversus mutation. *Science* **260**: 679–682.
Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D. & Fink, W.L. 2004. *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. Elsevier Academic Press, San Diego.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1 Frequencies of interchiral mating in populations under random mating or incomplete disassortative mating between enantiomorphs.

Figure S2 Variation in RW1, RW3 and RW4 among six localities, which differed in enantiomorph frequency in empty adult shells.

Figure S3 Locations of shell collecting sites and stations for meteorological records.

Figure S4 Annual patterns of monthly mean temperature and precipitation.

Table S1 Fractions of shell shape variance explained by ten relative warps (RWs).

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

Received 24 June 2010; revised 31 July 2010; accepted 2 August 2010

ภาคผนวก 2
รายการตัวอย่างหอยเดื่อใหญ่ที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CUMZ	Species	Date	Locality	No. of Specimen
4501	Hemiplecta distincta	10.10.1998	Khao Look Chang, Pak Chong, Nakhonratchasrima	8
4502	Hemiplecta distincta		Huay Kla Kleng, Uthaithani	6
4503	Hemiplecta distincta	26.10.1983	Foret in Mukdaharn	7
4504	Hemiplecta distincta	10.12.1998	Phu Phan, Sakonnakhon	6
4505	Hemiplecta distincta	9.8.1997	Pu Kare Botanic Garden, Saraburi	4
4506	Hemiplecta distincta	5-6.7.1997	Supalai Pasak Resort Saraburi	1
4507	Hemiplecta distincta		Phu Phan, Sakonnakhon	5
4508	Hemiplecta distincta	6.6.1998	Wat Tharahat, Saraburi	1
4509	Hemiplecta distincta	29.10.1996	Plieu National Park, Chanthaburi	1
4510	Hemiplecta distincta	22.10.1995	Khao Nangram, Huay Kla Kleng, Uthaithani	3
4527	Hemiplecta distincta	11.12.1995	Ban Krang Camp, Kaengkracharn National Park, Phetchaburi	1
4528	Hemiplecta distincta	10-11.9.1995	Tam Pang Thong, Maehongsorn	2
4529	Hemiplecta distincta	14.10.1998	Na Wang, Nongbualumpoo	1
4530	Hemiplecta distincta	6.6.1998	Wat Tharahat, Saraburi	1
4531	Hemiplecta distincta	14.10.1994	Khao Ang Rue Nai Wildlife sanctuary, Chacheongsao	1
4532	Hemiplecta distincta	13.5.2008	Tam Pha Ban, Pahom, Chiengkhan, Loei	1
4533	Hemiplecta distincta		Pahom, Vang Vieng, LAOS	24
4534	Hemiplecta distincta	27.6.1998	Pu Kare Botanic Garden, Saraburi	
4535	Hemiplecta distincta	18.10.1998	Khao Look Chang, Pak Chong, Nakhonratchasrima	3
4536	Hemiplecta distincta	4.7.1998	Chanthaburi	1
4537	Hemiplecta distincta	10.1.1999	Pahom, Vang Vieng, LAOS	10
4538	Hemiplecta distincta	3.6.1995	Khao Nangram, Huay Kla Kleng, Uthaithani	3
4539	Hemiplecta distincta	20.4.1997	Plieu National Park, Chanthaburi	9
4540	Hemiplecta distincta	11.3.1997	Wang Takrai Waterfall, Nakhonnayok	2
4541	Hemiplecta distincta	25.11.1995	Khao Nangram, Huay Kla Kleng, Uthaithani	6
4542	Hemiplecta distincta	14.3.1999	Khao Cha Ang Oan, Borthong, Chonburi	4
4543	Hemiplecta distincta	6.9.2008	Khao Cha Mao Waterfall, Rayong	1

4544	Hemiplecta distincta	5.9.2008	Wat Ma Due, Khao Wong, Rayong	2
4545	Hemiplecta distincta	6.9.2008	Tam Suwankuha, Khao Chamao, Rayong	1
4546	Hemiplecta distincta	3.11.1995	Khao Ang Rue Nai Wildlife sanctuary, chacheongsao	7
4547	Hemiplecta distincta	30.12.2008	Sibha Chan National Park, Chanthaburi	6
4548	Hemiplecta distincta	7.3.2009	Jed Sao Noi Waterfall, Muaklek, Saraburi	3
4549	Hemiplecta distincta	7.3.2009	Wang Takrai Waterfall, Nakhonnayok	2
4550	Hemiplecta distincta	25.12.1961	Tam Chieng Dao, Chieng Dao, Chiengmai	
4551	Hemiplecta sp.	19.7.2008	1 km, entrance of Tam Maelana, Pangmapha, Maehongsorn	1
4552	Hemiplecta pluto	-.8.2007	Pahom, Vang Vieng, LAOS	1
4553	Hemiplecta esculenta		Tam Chieng Dao, Chieng Dao, Chiengmai	5
4554	Hemiplecta humphreysiana		Pulau Bersa, Johor, MALAYSIA	1
4555	Hemiplecta distincta		Bang Kruay, Pathumthani	3
4556	Hemiplecta pluto	27.7.1999	Pahom, Vang Vieng, LAOS	20
4557	Hemiplecta distincta	12.9.2002	Phu Kum Klao, Kalasin	8
4558	Hemiplecta distincta		Tam Chieng Dao, Chieng Dao, Chiengmai	5
4559	Hemiplecta distincta	20-26.10.2000	Koh Kud, Trat	9
4560	Hemiplecta distincta		Plieu National Park, Chanthaburi	1
4561	Hemiplecta humphreysiana		Natuna Island, INDONESIA	1
4562	Hemiplecta distincta		CAMBODIA	2
4563	Hemiplecta humphreysiana		Pulau Permanggil, Johor, MALAYSIA	2
4564	Hemiplecta esculenta	20.7.2008	Tam Chieng Dao, Chieng Dao, Chiengmai	25
4565	Hemiplecta esculenta	8.1.2008	Tam Chieng Dao, Chieng Dao, Chiengmai	9
4566	Hemiplecta distincta	12.5.2008	Tam Yai Nannao, Namnao National Park, Phetchaboon	1
4567	Hemiplecta distincta	11.5.2008	Tam Mahasombat, Lomsak, Phetchaboon	1
4568	Hemiplecta humphreysiana	11.3.2008	Pulau Bersa, Johor, MALAYSIA	33
4569	Hemiplecta cymatium	-.3.2009	Top of Peneng Hill, Penang, MALAYSIA	1
4570	Hemiplecta cymatium	-.3.2008	Penang Dam, Penang, MALAYSIA	1
4571	Hemiplecta humphreysiana	25.12.2009	Botanic Garden, SINGAPORE	1
4572	Hemiplecta humphreysiana	25.12.2009	Botanic Garden, SINGAPORE	7
4573	Hemiplecta humphreysiana	25.12.2009	Bukit Timah, SINGAPORE	1
4574	Hemiplecta esculenta		Tam Chieng Dao, Chieng Dao, Chiengmai	18
4575	Hemiplecta funerea		Nan	16
4576	Hemiplecta funerea		Nan	
4577	Hemiplecta distincta	19.9.2009	Phu Tara Resort, Nakhonnayok	1
4578	Hemiplecta distincta	14.9.2005	Sam Lan Waterfall, Saraburi	2

4579	Hemiplecta distincta	31.5.2009	Klong Lann National Park, Kampaengphet	2
4580	Hemiplecta esculenta	1.10.2009	Tam Tabtao, Chaiprakarn, Chiengmai	15
4601	Hemiplecta distincta	19-20.7.1997	Plieu National Park, Chanthaburi	1
4602	Hemiplecta distincta	10.7.1961	Chulalongkorn University, Bangkok	2
4603	Hemiplecta distincta	23.4.1995	Tha Mai, Chanthaburi	1
4604	Hemiplecta distincta	12-13.10.2000	Patam National Park, Ubonratchathani	3
4605	Hemiplecta distincta	-.2.1995	Wang Takrai Waterfall, Nakhonnayok	1
4606	Hemiplecta distincta	18.10.1998	Khao Look Chang, Pak Chong, Nakhonratchasrima	9
4607	Hemiplecta distincta	1-3.4.1998	Huay Kla Kleng, Uthaithani	6
4608	Hemiplecta distincta	15.7.1973	Thung Kamang, Phu Kiew, Chaiyaphum	5
4609	Hemiplecta distincta	2.5.1995	Khao Ang Rue Nai Wildlife sanctuary, chacheongsao	3
4610	Hemiplecta distincta		Huay Kla Kleng, Uthaithani	9
4611	Hemiplecta distincta	-.5.1998	Huay Kla Kleng, Uthaithani	3
4612	Hemiplecta distincta	18.1.1998	Khao Look Chang, Pak Chong, Nakhonratchasrima	9
4613	Hemiplecta distincta	11.4.1995	Khao Ang Rue Nai Wildlife sanctuary, chacheongsao	4
4614	Hemiplecta distincta	7.4.2002	Koh Kud, Trat	7
4615	Hemiplecta distincta		Plieu National Park, Chanthaburi	4
4616	Hemiplecta distincta		Patam National Park, Ubonratchathani	3
4617	Hemiplecta distincta	10.7.1998	Tub Lann National Park, Prachinburi	1
4618	Hemiplecta distincta	9.5.2008	Khao Ang Rue Nai Wildlife sanctuary, chacheongsao	1
4619	Hemiplecta distincta	1.5.2003	Pang Khone, Sakonakhon	4
4620	Hemiplecta distincta	7.4.2000	Khao Ang Rue Nai Wildlife sanctuary, chacheongsao	2
4621	Hemiplecta distincta	2.1.2000	Phu Sritar Waterfall, Kuchinarai, Kalasin	1
4622	Hemiplecta distincta	12.5.2008	Tam Yai Nannao, Namnao National Park, Phetchaboon	2
4623	Hemiplecta distincta	8.10.2006	Tam Nam Pud, Tubpud, Pangnga	1
4624	Hemiplecta distincta	20.5.2006	Tam Dao Khao Kaew, Muklek, Saraburi	1
4625	Hemiplecta distincta	25.11.2006	Tam Leum, Klonghad, Srakaew	1
4626	Hemiplecta distincta	20.6.1999	Khao Cha Ang Oan, Borthong, Chonburi	4
4627	Hemiplecta distincta	7.4.2000	Khao Ang Rue Nai Wildlife sanctuary, chacheongsao	1
4628	Hemiplecta distincta	24.11.2006	La-lu, Tarpraya, Srakaew	1

4629	Hemiplecta distincta	9.7.1998	Yod Dome Wildlife Sanctuary, Ubonratchathani	2
4630	Hemiplecta distincta	19.5.2000	Khao Ang Rue Nai Wildlife sanctuary, Chacheongsao	1
4631	Hemiplecta distincta	23.11.2006	Pang Srida National Park, Prachinburi	4
4632	Hemiplecta distincta	13.1.2008	Tam Wang Daeng, Nernmaprang, Phitsanuloke	1
4633	Hemiplecta distincta	17.10.2007	Tam Suwankuha, Khao Chamao, Rayong	3
4634	Hemiplecta distincta	12.5.2008	Huay Laos Waterfall, Phuluang, Loei	1
4635	Hemiplecta distincta	20.10.2007	Tam Praya Nakharat, Phuphaman, Khonkaen	1
4636	Hemiplecta distincta	18.1.2007	Tam Pha Bing, Wang Sapung, Loei	1
4637	Hemiplecta distincta	17.10.2007	Wat Suwankhusa, Nongbualumpoo	3
4638	Hemiplecta distincta	22.7.2008	Kaeng Jed Kware National Park, Wat Bot, Phitsanuloke	7
4639	Hemiplecta distincta	12.5.28	Tam Piya, Loei	3
4640	Hemiplecta distincta	8.7.2004	Wang Takrai Waterfall, Nakhonnayok	5
4641	Hemiplecta distincta	1.7.1998	Wang Chao Waterfall	4
4642	Hemiplecta humphreysiana	1.3.2008	Pulau Bersa, Johor, MALAYSIA	11
4643	Hemiplecta pluto	13.2.1999	Pahom, Vang Vieng, LAOS	21
4644	Hemiplecta pluto		Pahom, Vang Vieng, LAOS	4
4645	Hemiplecta pluto	10.1.1999	Pahom, Vang Vieng, LAOS	1
4646	Hemiplecta pluto	28.11.1998	Tam Muangkon, Bolikamsai, LAOS	2
4647	Hemiplecta humphreysiana	-.1.1997	Sirindhorn Waterfall, Halabala Wildlife Sanctuary, Narathivat	2
4648	Hemiplecta humphreysiana	13.1.1997	Halabala National Park, Narathivat	
4649	Hemiplecta pluto		Bor Klue, Nan	5

ภาคผนวก 3

รายการตัวอย่างหอยต้นไม้ปากม่วงที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CUMZ	Species	Locality	Dextral	Sinistral	Specimens
2238	A. glaucolarynx	Huay Kok, Kaeng Kra Jarn, Petchaburi		1	shell
2239	A. glaucolarynx	Tam Vore, Mae Sod, Tak	1		shell
2240	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	2	10	shell
2241	A. glaucolarynx	Kaeng Kracharn National Park, Petchaburi	3	3	shell
2242	A. glaucolarynx	Pala-u Waterfall, Petchaburi		1	shell
2243	A. glaucolarynx	Lod Cave, Paye District, Maehongsorn	2		shell
2244	A. glaucolarynx	Erawan Waterfall, Kanchanaburi	1	1	shell
2245	A. glaucolarynx	Erawan Waterfall, Kanchanaburi	2	4	shell
2246	A. glaucolarynx	Prakayang Cave, Kra Buri, Ranong	2		shell
2247	A. glaucolarynx	Pa Charoen Wterfall, Tak	1		shell
2248	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	14	12	shell
2249	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	5	8	shell
2250	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	1	1	shell
2251	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	16	8	shell
2252	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	10	8	shell
2253	A. glaucolarynx	Erawan Waterfall, Kanchanaburi		1	shell
2254	A. glaucolarynx	Thee Lor Zoo Waterfall, Umpang, Tak	1	3	shell
2255	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	2	2	shell
2256	A. glaucolarynx	Sai Yok Noi Waterfall, Sai yok, Kanchanaburi		1	shell
2257	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	1	3	shell
2258	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	17	17	shell
2259	A. glaucolarynx	Ban Krang, Kaeng Kra Jarn	6	4	shell

		National Park, Petchaburi			
2260	A. glaucolarynx	Prakayang Cave, Kra Buri, Ranong	18		shell
2261	A. glaucolarynx	Pong Pu Ron, Thong Phapoom, Kanchanaburi	2	3	shell
2262	A. glaucolarynx	Pong Pu Ron, Thong Phapoom, Kanchanaburi	4	2	shell
2263	A. glaucolarynx	Pong Pu Ron, Thong Phapoom, Kanchanaburi	5	1	shell
2264	A. glaucolarynx	Pong Pu Ron, Thong Phapoom, Kanchanaburi	6	4	shell
2265	A. glaucolarynx	Nam Naou National Park, Petchaboon		3	shell
2266	A. glaucolarynx	Kaeng Kracharn National Park, Petchaburi	1	2	shell
2267	A. glaucolarynx	Hin Tok Station, Chong Khao Kad, Sai Yok, Kanchanaburi	2	2	shell
2268	A. glaucolarynx	Kanchanaburi	4	4	shell
2269	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	7	7	shell
2270	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	10	10	shell
2272	A. glaucolarynx	Kanchanaburi		1	shell
2319	A. glaucolarynx	Ban Hui Hin Fon, Mae Sod, Tak	1	2	frozen
2328	A. glaucolarynx	Pong Pu Ron, Thong Phapoom, Kanchanaburi		1	frozen
2395	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	2	14	shell
2396	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	1		shell
2398	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi		6	shell
2399	A. glaucolarynx	Tam Sing Nang Non, Umphang, Tak		1	shell
2453	A. glaucolarynx	Ban Krang, Kaeng Kra Jarn National Park, Petchaburi	4	3	wet
2460	A. glaucolarynx	Pong Pu Ron, Thong Phapoom, Kanchanaburi		24	wet

2463	A. glaucolarynx	Huy Kayang, Thong Pha Phum, Kanchanaburi	8	6	wet
2467	A. glaucolarynx	Pong Pu Ron, Thong Phapoom, Kanchanaburi	4		wet
2469	A. glaucolarynx	Kaeng Kracharn National Park, Petchaburi	2		wet
2476	A. glaucolarynx	Pong Pu Ron, Thong Phapoom, Kanchanaburi	5	8	wet
2482	A. glaucolarynx	Prakayang Cave, Kra Buri, Ranong	1		wet
2485	A. glaucolarynx	Hyu Ya, Tak	1	1	wet
2497	A. glaucolarynx	Khao Dong Kamen, Thongphaphum, Kanchanaburi	1	5	wet
2498	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	1	4	wet
2499	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	7	8	wet
2500	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	20	29	wet
2502	A. glaucolarynx	Prakayang Cave, Kra Buri, Ranong	4		wet
2503	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	3	1	wet
2504	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	13	19	wet
2505	A. glaucolarynx	Chong Khao Kad, Thong Phaphum, Kanchanaburi	2		wet
2506	A. glaucolarynx	Kaeng Kracharn National Park, Petchaburi	1		wet
2507	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi		4	wet
2508	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	4	2	wet
2509	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	2	4	wet
2510	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	3	3	wet
2511	A. glaucolarynx	Tubsathorn, Kanchanaburi	20	24	shell

ภาคผนวก 4

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อหัวหน้าโครงการ

(ภาษาไทย) ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา

(ภาษาอังกฤษ) Professor Dr. Somsak Panha

2. สถานที่ติดต่อ

ที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย **โทรศัพท์** 02-2185273 **โทรสาร** 02-2185273 **E-mail** somsak_panha@yahoo.com

ที่บ้าน บ้านเลขที่ 82/166 ถนนประชาชื่น แขวงลาดยาว เขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900 **โทรศัพท์** 02-5857513

3. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร	ปริญญาตรี	การศึกษาชีววิทยา	2522
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	สัตววิทยา	2525
Kyoto University, Japan	ปริญญาเอก	Malacology	2531

4. ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (5 ปีย้อนหลัง)

2007

Stoev, P., Enghoff, H., Panha, S. and Fuangarworn, M. 2007. A second in the millipede suborder Sincallipodidea Shear, 2000 (Diplopoda: Callipodida). Zootaxa. 1450: 63-68.

Sutcharit, C. and Panha, S. 2007. Systematic review of the land snail genus Neocepolis Pilsbry, 1891 (Pulmonata: Camaenidae) from North Vietnam. Journal of Natural History. 41: 619-631.

Enghoff, H., Sutcharit, C. and Panha, S. 2007. The shocking pink dragon millipede, Desmoxytes purpurosea, a colourful new species from Thailand (Diplopoda: Polydesmida: Paradoxosomatidae). Zootaxa. 1563: 31-36.

Prasankok, P., Ota, H., Toda, M. and Panha, S. 2007. Allozyme variation in the camaenid tree snails, Amphidromus atricallosus (Gould, 1843) and A. inversus (Müller, 1774). Zoological Science. 24: 189-197.

Ngamprasertwong, T., Thirakhupt, K. and Panha, S. 2007. Two new species of land leeches from Thailand (Hirudiniformes: Haemadipsidae). The Natural History Journal of Chulalongkorn University. 7(2): 155-159.

2008

Deein, G., Pongsri, G., Ratanadaeng, P., Prateepasen, R. and Panha, S. 2008. Glochidium shell morphology of Solenaia khwaenoiensis Panha & Deein, 2003 (Bivalvia: Unionidae). The Natural History Journal of Chulalongkorn University. 8(1): 61-64.

Sutcharit, C. and Panha, S. 2008. Taxonomic revaluation of Sarika diadema (Dall, 1897) and S. asamurai (Panha, 1997), two endemic land snails from Thailand (Pulmonata: Ariophantidae: Macrochlamydinae). The Raffles Bulletin of Zoology. 56: 95-100.

Tumpeesuwan, S. and Panha, S. 2008. First record of the genus Schistoloma Kobelt, 1902. (Prosobranchia: Pupinidae) in Thailand. The Natural History Journal of Chulalongkorn University. 8(1): 65-67.

2009

Kongim, B., Sutcharit, C., Tongkerd, P. and Panha, S. 2009. Karyotype differentiation with an assessment of the taxonomic status of Pollicaria mouhoti (Pfeiffer, 1862) (Prosobranchia: Pupinidae). The Natural History Journal of Chulalongkorn University. 9: 201-208.

Pimvichai, P., Enghoff, H. and Panha, S. 2009. A revision of the Thyrophygus allevatus group. Part 1: the T. opinatus subgroup (Diplopoda, Spirostreptida). Zootaxa. 2016: 17-50.

Pimvichai, P., Enghoff, H. and Panha, S. 2009. A revision of the Thyrophygus allevatus group. Part 2: the T. bifurcus subgroup (Diplopoda, Spirostreptida, Harpagophoridae). Zootaxa. 2165: 1-15.

Prasankok, P., Srikoom, W. and Panha, S. 2009. Genetic variation amongst viviparid snails in the genus Mekongia (Prosobranchia: Viviparidae) in Thailand. Boichemical systematics and Ecology. 37: 452-458.

Prasarnkok, P., Sutcharit, C., Tongkerd, P. and Panha, S. 2009. Biochemical assessment of the taxonomic diversity of the operculate land snail, Cyclophorus fulguratus (Gastropoda: Cyclophoridae) from Thailand. Biochemical Systematics and Ecology. 36: 900-906.

2010

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.

Nakadera, Y. Sutcharit, C., Ubukata, T., Seki, K., Utsuno, H., Panha, S. and Asami. T. 2010. Enatiomorphs differ in shape in opposite directions between population. Journal of Evolutionary Biology. 23: 2377-2384.

Norhanis, M.R., Tan, S.H., Zufigar, Y., Panha, S., Sutcharit, C. and Tongkerd, P. 2010. An annotated checklist of micro-landsnails from limestone areas in Langakawi Islands, Kedah, Peninsular Malaysia. Malayan Nature Journal. 62: 307-313.

Panha, S., Sutcharit, C. and Can, D. N. 2010. An anatomical note on Moellendorffia eastlakeana (Möllendorff, 1882) a camaenid land snail from Vietnam (Pulmonata: Camaenidae). The Nautilus. 124: 20-24.

Sutcharit C. and Panha, S. 2010. Taxonomic re-evaluation of Chloritis bifoveata (Benson, 1860) and C. diplochone Mollendorff, 1898 (Pulmonata: Camaeniade). Journal of Conchology. 40: 277-285.

Sutcharit, C., Naggs, F. and Panha, S. 2010. A first record of the family Cerastidae in Thailand, with a description of a new species (Pulmonata: Othurethra: Cerastidae). The Raffles Bulletin of Zoology. 58: 251-258.

Sutcharit, C., Naggs, F., Wade, C.M., Fontanilla, I. and Panha, S. 2010. The new family Diapheridae, a new species of Diaphera Albers from Thailand and the position of the Diapheridae within a molecular phylogeny of the Streptaxoidea (Pulmonata: Stylommatophora). Zoological Journal of the Linnean Society. 160: 1-16.

Denduangboripant, J., Setaphan, S., Suwanprasart, W. and Panha, S. 2010. Determination of Local Tobacco Cultivars Using ISSR Molecular Marker. Chiang Mai Journal of Science. 37: 293-303.

Likhitrakarn, N., Golovatch, S. and Panha, S. 2010. The millipede genus Orthomorpha Bollman, 1893 in Thailand. 1. Revision of the sericata-group, with descriptions of four new species (Diplopoda, Polydesmida, Paradoxosomatidae). Zootaxa, 2361: 23-45.

Pimvichai, P., Enghoff, H. and Panha, S. 2010. The Rhynchoproctinae, a south-east Asiatic subfamily of giant millipedes: cladistic analysis, classification, four new genera and a deviating new species from north-west Thailand (Diplopoda: Spirostreptida: Harpagophoridae). Invertebrate Systematics, 24: 51-80.

Likhitrakarn, N., Golovatch, S., Prateepasen, R. and Panha, S. 2010. Review of the genus Tylopus Jeekel, 1968, with descriptions of five new species from Thailand (Diplopoda, Polydesmida, Paradoxosomatidae). Zookeys, 72: 23-68.

2011

Pimvichai, P., Enghoff, H. and Panha, S. 2011. A revision of the Thyropygus allevatus group. Part 3: the T. induratus subgroup (Diplopoda: Spirostreptida: Harpagophoridae). Zootaxa, 2941:

Tan, S.K., Chan, S.Y. and Panha, S. 2011. A new subspecies of Amphidromus (Amphidromus) atricallosus from Singapore (Mollusca: Gastropoda: Camaenidae). Raffles Bulletin of Zoology, 59: 39-46.

Bantaowong, U., Chanabun, R., Tongkerd, P., Sutcharit, C, James, S. and Panha, S. 2011. New earthworm species of the genus Amynthas Kinberg, 1867 from Thailand (Clitellata, Oligochaeta, Megascolecidae). Zookeys, 90: 35-62.

Matsui, M., Panha, S., Khonsue, W. and Kuraishi, N. 2011. Two new species of the "kuhlii" complex of the genus Limnonectes from Thailand (Anura: Dicroglossidae). Zootaxa, 2615: 1-22.

Bantaowong, U., Chanabun, R., Tongkerd, P., Sutcharit, C, James, S. and Panha, S. 2011. A new species of the terrestrial earthworm of the genus Metaphire Sim and Eston, 1972 From Thaialnd with redescription of some species. Tropical Natural History.11: 55-69.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อผู้ร่วมโครงการ

(ภาษาไทย) รองศาสตราจารย์ ดร. เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์

(ภาษาอังกฤษ) Associate Professor Dr. Padermsak Jarayabhand

2. สถานที่ติดต่อ

ที่ทำงาน ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย **โทรศัพท์** 02-2188164 **โทรสาร** 02-5646700 **E-mail** padermsakj@yahoo.com

ที่บ้าน บ้านเลขที่ 329/2 ซอยจรเจริญ ถนนริมคลองประปาฝั่งซ้าย แขวงบางซื่อ เขตบางซื่อ กรุงเทพฯ 10800 **โทรศัพท์** 02-9102652

3. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์ทางทะเล	2517
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	วิทยาศาสตร์ทางทะเล	2521
Dalhousie University, Canada	ปริญญาเอก	Biology	2532

4. ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (5 ปีย้อนหลัง)

2008

Jarayabhand, P. 2008. Review of current research on farming of Thai abalone, Haliotis asinina, Linnaeus 1758. Journal of Shellfish Research, 27: 1017-1017.

2009

Klinbunga, S., Amparyup, P., Khamnamtong, B., Hirono, I., Aoki, T. and Jarayabhand, P. 2009. Identification, Characterization, and Expression of the Genes TektinA1 and Axonemal Protein 66.0 in the Tropical Abalone Haliotis asinine. Zoological Science. 26: 429-436.

Klinbunga, S., Amparyup, P., Khamnamtong, B., Hirono, I., Aoki, T. and Jarayabhand, P. 2009. Isolation and Characterization of Testis-Specific DMRT1 in the Tropical Abalone (Haliotis asinina). Biochemical Genetics, 47: 66-79.

2010

Jarayabhand, P., Kruiroongroj, W. and Chaisanit, C. 2010. Effects of stocking density on growth performance of Thai abalone, Haliotis asinina, Linnaeus 1758, reared under a semiclosed recirculating land-based system. Journal of Shellfish Research, 29: 593-597.

Ganmanee, M., Sirirustananun, N. and Jarayabhand, P. 2010. Energy budget of the Thai abalone Haliotis asinina reared in a semiclosed recirculating land-based system. Journal of Shellfish Research, 29: 637-642.

Suwattana, D., Jirasupphachok, J. and Jarayabhand, P. 2010. In vitro culture of gill and heart tissues of the abalone Haliotis asinina. Journal of Shellfish Research, 29: 651-653.

Amparyup, P., Klinbunga, S. and Jarayabhand, P. 2010. Identification and expression analysis of sex-specific expression markers of Thai abalone Haliotis asinina, Linneaus, 1758. Journal of Shellfish Research, 29: 765-773.

Soonthornchai, W., Rungrassamee, W., Karoonuthaisiri, N., Jarayabhand, P. Klinbunga, S., Soderhall, K. and Jiravanichpaisal, P. 2010. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, Penaeus monodon, after an oral infection by Vibrio harveyi. Developmental and Comparative Immunology, 34: 19-28.

Praipue P., Klinbunga S. and Jarayabhand P. 2010. Genetic diversity of wild and domesticated stocks of Thai abalone, Haliotis asinina (Haliotidae), analyzed by single-strand conformational polymorphism of AFLP-derived markers. Genetics and Molecular Research, 9: 1136-1152.

2011

Donrung, P., Tunkijjanukij, S., Jarayabhand, P. 2011. Spatial Genetic Structure of the Surf Clam Paphia undulata in Thailand Waters. Zoological Studies, 50: 211-219.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อผู้ร่วมโครงการ

(ภาษาไทย) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร

(ภาษาอังกฤษ) Assistance Professor Dr. Sanit Piyapattanakorn

2. สถานที่ติดต่อ

ที่ทำงาน ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย **โทรศัพท์** 02-2185399 **โทรสาร** 02-2550780 **E-mail** meanakorn42@yahoo.co.uk

ที่บ้าน บ้านเลขที่ 12/80 ซอยอินทรามะระ 33 ถนนสุทธิสาร เขตห้วยขวาง 10400

3. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ปริญญาตรี	ประมง	2537
University of Southampton, UK	ปริญญาเอก	Biology	2544

4. ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (5 ปีย้อนหลัง)

2008

Piyapattanakorn, S. and Krudpan, C. 2008. Preliminary study on genetic relationship of soldier river barb Cyclocheilichthys enoplos in Pak-Moom Dam area revealed by mtDNA control region. Page 70. Proceeding of the International symposium : sustainable fish diversity, fisheries and aquacultures in the Mekong basin. Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand (3rd – 5th September 2008).

Piyapattanakorn, S. and Chaitanavisuti, N. 2008. Genetic diversity and population structure of spotted Babylon (Babylonia areolata) in the Gulf of Thailand using ISSR markers. Page 235. Proceeding of the 5th World Fisheries Congress: Fisheries for Global Welfare and Environmental Conservation. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (20th -25th October 2008).

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อผู้ร่วมโครงการ

(ภาษาไทย) อาจารย์ ดร. จิรศักดิ์ สุจริต

(ภาษาอังกฤษ) Dr. Chirasak Sutcharit

2. สถานที่ติดต่อ

ที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย **โทรศัพท์** 02-2185273 **โทรสาร** 02-2185273 **E-mail** jirasak4@yahoo.com

ที่บ้าน บ้านเลขที่ 51 หมู่ที่ 1 ตำบลสะพานไทย อำเภอบางบาล พระนครศรีอยุธยา **โทรศัพท์** 035-307949

3. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	ชีววิทยา	2542
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาเอก	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ	2548

4. ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (5 ปีย้อนหลัง)

2007

Sutcharit, C. and Panha, S. 2007. Systematic review of the land snail genus Neocepolis Pilsbry, 1891 (Pulmonata: Camaenidae) from North Vietnam. Journal of Natural History. 41: 619-631.

Enghoff, H, Sutcharit, C. and Panha, S. 2007. The shocking pink dragon millipede, Desmoxytes purpurosea, a colourful new species from Thailand (Diplopoda: Polydesmida: Paradoxosomatidae). Zootaxa. 1563: 31-36.

2008

Sutcharit, C. and Panha, S. 2008. Taxonomic revaluation of Sarika diadema (Dall, 1897) and S. asamurai (Panha, 1997), two endemic land snails from Thailand (Pulmonata: Ariophantidae: Macrochlamydinae). The Raffles Bulletin of Zoology. 56: 95-100.

Prezant, R.S., Sutcharit, C., Chalermwat, K., Kakhai, N., Duangdee, T. and Dumrongrojwattana, P. 2008. Population ecology of Laternula anatina (Bivalvia: Anomalodesmata: Laternulidae) in the mangrove mud flat of Kung Krabaen Bay, Chanthaburi, Thailand with comparative notes on L. c.f. corrugata. The Raffles Bulletin of Zoology, Supplement no. 18: 57-73.

2009

Prasarnkok, P., Sutcharit, C. Tongkerd, P. and Panha, S. 2009. Biochemical assessment of the taxonomic diversity of the operculate land snail, Cyclophorus fulguratus (Gastropoda: Cyclophoridae) from Thailand. Biochemical Systematics and Ecology. 36: 900-906.

Kongim, B., Sutcharit, C., Tongkerd, P. and Panha, S. 2009. Karyotype differentiation with an assessment of the taxonomic status of Pollicaria mouhoti (Pfeiffer, 1862) (Prosobranchia: Pupinidae). The Natural History Journal of Chulalongkorn University. 9: 201-208.

2010

Sutcharit, C., Naggs, F., Wade, C.M., Fontanilla, I. and Panha, S. 2010. The new family Diapheridae, a new species of Diaphera Albers from Thailand and the position of the Diapheridae within a molecular phylogeny of the Streptaxoidea (Pulmonata: Stylommatophora). Zoological Journal of the Linnean Society. 160: 1-16.

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.

Sutcharit C. and Panha, S. 2010. Taxonomic re-evaluation of Chloritis bifoveata (Benson, 1860) and C. diplochone Mollendorff, 1898 (Pulmonata: Camaeniade). Journal of Conchology. 40: 277-285.

Panha, S., Sutcharit, C. and Can, D. N. 2010. An anatomical note on Moellendorffia eastlakeana (Möllendorff, 1882) a camaenid land snail from Vietnam (Pulmonata: Camaenidae). The Nautilus. 124: 20-24.

Sutcharit, C., Naggs, F. and Panha, S. 2010. A first record of the family Cerastidae in Thailand, with a description of a new species (Pulmonata: Othurethra: Cerastidae). The Raffles Bulletin of Zoology. 58: 251-258.

Nakadera, Y. Sutcharit, C., Ubukata, T., Seki, K., Utsuno, H., Panha, S. and Asami. T. 2010. Enatiomorphs differ in shape in opposite directions between population. Journal of Evolutionary Biology. 23: 2377-2384.

Norhanis, M.R., Tan, S.H., Zufigar, Y., Panha, S., Sutcharit, C. and Tongkerd, P. 2010. An annotated checklist of micro-landsnails from limestone areas in Langakawi Islands, Kedah, Peninsular Malaysia. Malayan Nature Journal. 62: 307-313.

2011

Bantaowong, U., Chanabun, R., Tongkerd, P., Sutcharit, C, James, S. and Panha, S. 2011. New earthworm species of the genus Amynthas Kinberg, 1867 from Thailand (Clitellata, Oligochaeta, Megascolecidae). Zookeys, 90: 35-62.

Bantaowong, U., Chanabun, R., Tongkerd, P., Sutcharit, C, James, S. and Panha, S. 2011. A new species of the terrestrial earthworm of the genus Metaphire Sim and Eston, 1972 From Thaialnd with redescription of some species. Tropical Natural History.11: 55-69.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อผู้ร่วมโครงการ

(ภาษาไทย) อาจารย์ดร. ปิโยรส ทองเกิด

(ภาษาอังกฤษ) Dr. Piyoros Tongkerd

2. สถานที่ติดต่อ

ที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย **โทรศัพท์** 02-2185273 **โทรสาร** 02-2185273 **E-mail** piyorose@hotmail.com

ที่บ้าน บ้านเลขที่ 41/3 หมู่ 7 ต.สวนดอกไม้ อ.เสาไห้ จ. สระบุรี 18160 **โทรศัพท์** 036-391139

3. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	ชีววิทยา	2542
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาเอก	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ	2547

4. ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (5 ปีย้อนหลัง)

2008

Valentich-Scott, P. and Tongkerd, P. 2008. Coral-boring bivalve molluscs of Southeastern Thailand, with the description of a new species. The Raffles Bulletin of Zoology. 18: 191–216.

2009

Kongim, B., Sutcharit, C., Tongkerd, P. and Panha, S. 2009. Karyotype differentiation with an assessment of the taxonomic status of Pollicaria mouhoti (Pfeiffer, 1862) (Prosobranchia: Pupinidae). The Natural History Journal of Chulalongkorn University. 9: 201-208.

Prasarnkok, P., Sutcharit, C., Tongkerd, P. and Panha, S. 2009. Biochemical assessment of the taxonomic diversity of the operculate land snail, Cyclophorus fulguratus (Gastropoda: Cyclophoridae) from Thailand. Biochemical Systematics and Ecology. 36: 900-906.

2010

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.

Norhanis, M.R., Tan, S.H., Zufigar, Y., Panha, S., Sutcharit, C. and Tongkerd, P. 2010. An annotated checklist of micro-landsnails from limestone areas in Langakawi Islands, Kedah, Peninsular Malaysia. Malayan Nature Journal. 62: 307-313.

2011

Bantaowong, U., Chanabun, R., Tongkerd, P., Sutcharit, C, James, S. and Panha, S. 2011. New earthworm species of the genus Amynthas Kinberg, 1867 from Thailand (Clitellata, Oligochaeta, Megascolecidae). Zookeys, 90: 35-62.

Bantaowong, U., Chanabun, R., Tongkerd, P., Sutcharit, C, James, S. and Panha, S. 2011. A new species of the terrestrial earthworm of the genus Metaphire Sim and Eston, 1972 From Thaialnd with redescription of some species. Tropical Natural History.11: 55-69.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อผู้ร่วมโครงการ

(ภาษาไทย) อาจารย์ ดร. อัมพร วิเวกแว่ว

(ภาษาอังกฤษ) Dr. Amporn Wiwegweaw

2. สถานที่ติดต่อ

ที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย **โทรศัพท์** 02-2187536

โทรสาร 02-2185368 **E-mail** ampornwiwegweaw@yahoo.com

ที่บ้าน บ้านเลขที่ 5/1 หมู่ที่ 2 ตำบลน้ำคอก อำเภอเมือง ระยอง 21000 **โทรศัพท์** 087-6769563

3. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	ชีววิทยา	2542
มหาวิทยาลัยมหิดล	ปริญญาโท	อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์	2546
Shinshu University, Japan	ปริญญาเอก	Biology	2552

4. ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (5 ปีย้อนหลัง)

2008

Seki, K., Wiwegweaw, A., and Asami, T. 2008. Fluorescent pigment distinguishes sibling species of snails. Zoological Science. 25 (12): 1212-1219.

2009

Wiwegweaw, A., Seki, K., Mori, H., and Asami, T. 2009. Asymmetric reproductive isolation during simultaneous reciprocal mating in pulmonates. Biology Letters. 5 (2): 240-243.

Wiwegweaw, A., Seki, K., Utsuno, H., and Asami, T. 2009. Fitness consequences of reciprocally asymmetric hybridization between simultaneous hermaphrodites. Zoological Science. 26(3):191-196.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อผู้ร่วมโครงการ

(ภาษาไทย) อาจารย์ดร. ผ่องพรรณ ประสารกก

(ภาษาอังกฤษ) Dr. Pongpun Prasankok

2. สถานที่ติดต่อ

ที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ **โทรศัพท์** 02-6495000 **โทรสาร** 02-2600127 **E-mail** prasankok@yahoo.com

ที่บ้าน บ้านเลขที่ 119 ม. 3 ต. เขาสามสิบ อ.เขาฉกรรจ์ สระแก้ว 27000

3. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	ชีววิทยา	2542
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	สัตววิทยา	2544
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาเอก	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ	2549

4. ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (5 ปีย้อนหลัง)

2007

Prasankok, P., Ota, H., Toda, M. and Panha, S. 2007. Allozyme variation in the camaenid tree snails, Amphidromus atricallosus (Gould, 1843) and A. inversus (Müller, 1774). Zoological Science. 24: 189-197.

2009

Prasarnkok, P., Sutcharit, C., Tongkerd, P. and Panha, S. 2009. Biochemical assessment of the taxonomic diversity of the operculate land snail, Cyclophorus fulguratus (Gastropoda: Cyclophoridae) from Thailand. Biochemical Systematics and Ecology. 36: 900-906.

Prasankok, P., Srikoom, W. and Panha, S. 2009. Genetic variation amongst viviparid snails in the genus Mekongia (Prosobranchia: Viviparidae) in Thailand. Boichemical systematics and Ecology. 37: 452-458.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อผู้ร่วมโครงการ

(ภาษาไทย) อาจารย์ ดร. บังอร กองอิ้ม

(ภาษาอังกฤษ) Dr. Bangon Kongim

2. สถานที่ติดต่อ

ที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **โทรศัพท์** 043-754245

โทรสาร 043-754245 **E-mail** kongimb@yahoo.com

ที่บ้าน บ้านเลขที่ 123/2001 หมู่ 16 ต.ในเมือง อ.เมือง ขอนแก่น 42000 โทรศัพท์ 043-754278

3. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ปริญญาตรี	ชีววิทยา	2540
มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ปริญญาตรี	ชีววิทยา	2543
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาเอก	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ	2548

4. ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (5 ปีย้อนหลัง)

2009

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.

Kongim, B., Sutcharit, C., Tongkerd, P. and Panha, S. 2009. Karyotype differentiation with an assessment of the taxonomic status of Pollicaria mouhoti (Pfeiffer, 1862) (Prosobranchia: Pupinidae). The Natural History Journal of Chulalongkorn University. 9: 201-208.