

0007/50

พว/ ๓ ม.ค. 2550

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ซิสเทมาติกส์ของหอยหอมและหอยวงท่อสกุล *Cyclophorus* และ
Rhiostoma ในประเทศไทย
(Systematics of the genera *Cyclophorus* and *Rhiostoma* in Thailand)

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา และคณะ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดือน ธันวาคม 2549

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ซิสเทมาติกส์ของหอยหอมและหอยวงท้อสกุล *Cyclophorus* และ
Rhiostoma ในประเทศไทย

(Systematics of the genera *Cyclophorus* and *Rhiostoma* in Thailand)

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา และคณะ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดือน ธันวาคม 2549

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ ชีสเทมาติกส์ของหอยหอมและหอยงวงท่อสกุล *Cyclophorus* และ *Rhiostoma* ใน
ประเทศไทย

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. รศ. ดร. สมศักดิ์ ปัญญา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. อ. ดร. ปิโยรส ทองเกิด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. อ. ดร. จิรศักดิ์ สุจริต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. อ. ดร. บังอร กองอัม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
5. นางสาว ผ่องพรรณ ประสานกก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้
และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพ
ในประเทศไทย (โครงการ BRT)

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจากสถาบันต้นสังกัดของผู้วิจัยได้แก่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุมัติให้เงินทุนทำวิจัย และอนุญาตให้ไปร่วมทำวิจัย เขียนบทความวิจัยและเสนอผลงานวิจัยในต่างประเทศ จนทำให้การวิจัยภายใต้โครงการนี้มีผลกระทบอย่างสูงต่อวงวิชาการ ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณ Dr. Fred Naggs แห่ง The Natural History Museum London และ Professor Dr. Phillippe Bouchet แห่ง Natural History Musuem Paris (Paris Museum) ที่อนุญาตให้เข้าศึกษาตัวอย่างต้นแบบ เพื่อการวิเคราะห์ผลการวิจัย และผู้วิจัยทุกคนต้องขอกราบขอบพระคุณโครงการพัฒนาองค์ความรู้ และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้และ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ทุน หน่วยวิจัยซิสเทมาติกส์ของสัตว์ในการสนับสนุนให้นักวิจัยได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลบางส่วนในประเทศอังกฤษและฝรั่งเศส

บทคัดย่อ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของหอยทากมีฝาปิดเปลือกสกุล *Cyclophorus* และ *Rhiostoma* ด้วยการวิเคราะห์อัลโลไซม์ และดีเอ็นเอ พบว่าหอยหอม 8 สปีชีส์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด และจำแนกจากกันตามอนุกรมวิธานของเปลือก แต่ *C. fulguratus* ที่มีการกระจายในหลายพื้นที่ และมีแนวโน้มว่าการวิเคราะห์ทางอนุกรมวิธาน ไม่สามารถจำแนก สปีชีส์ที่มีความคล้ายคลึงกันด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือก ใน 13 พื้นที่ของการเก็บตัวอย่าง การวิเคราะห์สามารถยืนยันความแตกต่างของสปีชีส์ ด้วยระยะห่างทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ของหอย 3 ภูมิภาค ได้แก่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก นอกจากนั้นเมื่อวิเคราะห์ด้วย 16s mitochondrial DNA พบว่า *C. borneensis* อยู่ในส่วนฐานของความสัมพันธ์ โดยที่ *C. fulguratus* ที่มีความหลากหลายมีการกระจายไปในหลายระดับ และในพื้นที่เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอัลโลไซม์

ในหอยวงท้อสกุล *Rhiostoma* พบว่า *R. chupingense* ในภาคใต้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *R. housei* ในภาคตะวันออก พบจำนวนแฮพลอยด์ และดิพลอยด์ มีค่าเท่ากันที่ $n = 14$, $2n = 28$, $FN = 56$ แต่พบค่าความผันแปรที่ค่าคาร์โอไทป์ที่ $10m + 4sm$ และ $12m + 2sm$ การวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอพบความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับหอยหอมแต่มีวิวัฒนาการมาภายหลังใกล้เคียงกับหอยสกุล *Leptopoma*

Abstract

Systematic studies of land operculate snails genera *Cyclophorus* and *Rhiostoma* were carried out using allozyme and DNA analyses. Eight species of *Cyclophorus* exhibit the close relationships and congruent with the shell taxonomy. However *C. fulguratus* which found distribute in many areas, and it seems that the shell taxonomy could not distinguish those entities. Allozyme electrophoresis analysis of snails from 13 localities has been done. There were large values of genetic distance among samples obtained from three regions. On the basis of alleles frequencies and allozyme phenogram, three groups were identified: central, northeastern Thailand, suggesting that these three groups may actually represent separate biological species. In addition the 16S DNA sequences analysis revealed that *C. borneensis* was in basal clade and *C. fulguratus* appeared in many clades as found in allozyme phenogram.

In *Rhiostoma*, the phylogenetic tree show the it as derived entity occurred after *Cyclophorus* and related to the genus *Leptopoma*. *Rhiostoma chupingense* and *R. housei* showed distinct intrageneric similarities in both haploid and diploid chromosome number ($n = 14$, $2n = 28$, $FN = 56$) but karyotype variations were recognized of $10m + 4sm$ in *R. chupingense* and $12m + 2sm$ in *R. housei*.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

หอยหอมสกุล *Cyclophorus* และหอยวงสกุล *Rhiostoma* จัดเป็นสัตว์ที่มีบทบาทที่สำคัญในระบบนิเวศบก เนื่องจากเป็นผู้ย่อยสลายซากใบไม้ และบริโภคจุลินทรีย์พวกเชื้อราบนใบไม้ และขอนไม้ผุเป็นอาหาร นอกจากนั้นหอยหอมยังได้รับความนิยมนำไปบริโภคโดยคนไทย และประเทศเพื่อนบ้านตามท้องถิ่นต่าง ๆ หอยทั้งสองสกุลยังแสดงลักษณะของวิวัฒนาการ ทำให้ลักษณะเปลือกมีความจำเพาะ ประหลาดกว่าหอยประเภทอื่นมาก ด้วยลักษณะครึ่งหนึ่งเป็นหอยน้ำจืด ครึ่งหนึ่งเป็นหอยทากบก และความคล้ายคลึงกันของลักษณะเปลือก และอวัยวะภายใน ทำให้การจัดจำแนก หรือการศึกษาทางวิวัฒนาการของหอยทากมหัศจรรย์กลุ่มนี้ทำได้ยากมาก การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือซิสเทมาติกส์ ด้วยเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ เช่น อัลโลไซม์อิเล็กโทรโฟลิซิส และดีเอ็นเอ ทำให้สามารถไขปริศนา และพบความสัมพันธ์กับอนุกรมวิธานของเปลือกของหอยหอม ยกเว้นหอยชนิด *C. fulguratus* ที่พบกระจายกว้างขวาง การวิเคราะห์พบว่าหอยใน 3 ภูมิภาค ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก มีการแยกออกเป็นสปีชีส์ที่ต่างกันแล้ว ด้วยระยะห่างทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ของ 16s DNA นอกจากนั้นยังพบว่าหอยวงท่อมีวิวัฒนาการมาภายหลังจากหอยหอม และมีความใกล้ชิดกับหอยสกุล *Leptopoma*

Executive Summary

The land operculate snails genera *Cyclophorus* and *Rhiostoma* play very important roles in terrestrial ecosystem because of their decomposers function by decayed leaved consumption and also consume microbes on dead leaves and logs. Moreover the people in local areas of Thailand and nearby countries like to eat the *Cyclophorus* snails as their usual menu. The snails in both genera exhibit evolutionary trait through the morphological characters of half freshwater and half land snails. The similarities of shell characters and internal organs brought the taxonomy problematic. Systematic studies using powerful tool such as allozyme electrophoresis and DNA can be solved the problems and found the relationships of shell taxonomy in *Cyclophorus* except in *C. fulguratus* which reported distributed in many areas. The analysis revealed three groups: central, northeastern and eastern represent separate biological species of large values of genetic distances among samples obtained from three regions. And 16s DNA sequence analysis exhibit the same result, and also showed that *Rhiostoma* has derived after *Cyclophorus* and closed related with *Leptopoma*

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	iv
Executive Summary	iv
1. บทนำ	1
2. วัตถุประสงค์	2
3. วิธีดำเนินการวิจัย	2
4. ผลการวิจัย	4
5. การอภิปรายผลการวิจัย	5
6. เอกสารอ้างอิง	6
7. รายการตารางและภาพประกอบ	8
8. ภาคผนวก	15
9. สรุป Output ที่ได้จากการดำเนินงาน (เอกสารแนบ 1)	16
10. รายงานการเงิน (เอกสารแนบ 2)	17

1. บทนำ

หอยทากมีฝาปิดเปลือก (land operculate snails) เป็นหอยทากบกที่แสดงลักษณะทางวิวัฒนาการที่จำเพาะ เป็นรอยต่อระหว่างหอยฝาเดียวน้ำจืดและหอยทากบก ลักษณะพื้นฐานที่แสดงให้เห็นความเป็นกึ่งหนึ่งของสัตว์น้ำจืดและสัตว์บกที่สำคัญคือ ลักษณะฝาปิดเปลือก และลักษณะเหงือกครึ่งหนึ่ง แสดงถึงลักษณะดั้งเดิมของหอยฝาเดียวที่เรียกว่า prosobranchs แต่ได้พบลักษณะของปอดแรกเริ่มหรือถุงลม (lung sac) ที่ถือว่าเป็นลักษณะของหอยทากบกเช่นกัน(สมศักดิ์, 2540) นอกจากนั้นยังเป็นสัตว์กลุ่มเด่นในบริเวณซากทับถมในเขตเขาหินปูน หรือบริเวณพื้นที่ที่มีคาร์บอเนต เช่นพื้นที่ป่าละเมาะที่มีสารปูน ชาวบ้านในท้องถิ่นต่าง ๆ นิยมนำไปบริโภค โดยเฉพาะหอยหอมสกุล *Cyclophorus* Tielecke (1940) ได้นิยามและพรรณนาหอยวงศ์หอยมีฝาปิดเปลือกว่าวงศ์ Cyclophoridae และพบหอยวงศ์นี้กระจายไปทั่วตั้งแต่คาบสมุทรอินเดีย ศรีลังกา แถบเทือกเขาหิมาลัย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หมู่เกาะของอินโดนีเซีย ตอนเหนือของออสเตรเลีย ไปถึงทางตะวันออกที่ญี่ปุ่น หอยวงศ์ที่ถือว่าเป็นกลุ่มเด่นและมีจำนวนสปีชีส์มากกว่า 100 สปีชีส์คือหอยสกุลหอยหอม *Cyclophorus* Montfort, 1810 พบในเขตร้อนถึงกึ่งร้อนของเอเชีย (Reeve, 1861; Nevill, 1881; Mölendorff, 1894; Blandford, 1903; Gude, 1921; Jutting van Benthem, 1948, 1949; Zilch, 1956; Habe, 1964; Solem, 1966; Minato and Habe, 1982) ด้วยจำนวนสปีชีส์ที่หลากหลาย และการกระจายที่กว้างขวาง หอยหอม *Cyclophorus* จึงกลายเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่น่าสนใจศึกษา และมีคำถามทางทฤษฎี โดยเฉพาะทางซิสเทมาติกส์ และชีวภูมิศาสตร์ แต่จากลักษณะฐานวิยาของเปลือกที่มีความผันแปรมองเห็นความหลากหลายแม้ภายในสปีชีส์เดียวกัน แต่การศึกษาลงลึกในรายละเอียด ยังไม่ปรากฏข้อมูลที่ชัดเจน ข้อมูลที่เป็นปัจจุบันที่สุดคือ การจำแนกด้วยเปลือกและคาร์โบไฮโป ของหอยหอมในประเทศไทยถึง 11 สปีชีส์ พบว่าแต่ละสปีชีส์มีการแบ่งพื้นที่ชัดเจน (Kongim, Naggs and Panha, 2006) แทบจะไม่มี การซ้อนทับกัน การอาศัยอยู่ในซากทับถมทำให้มองเห็นการตัดขาดของประชากรในแต่ละพื้นที่อย่างเด่นชัด แต่เนื่องจากหอยกลุ่มนี้เป็นที่นิยมบริโภคของสัตว์ผู้ล่าหลากหลายชนิด เช่นสัตว์เลื้อยคลาน นก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะสัตว์ฟันแทะ และมนุษย์ ผู้ล่าดังกล่าวอาจเป็นตัวการพาสัตว์ในแต่ละพื้นที่ไปพบกันแล้วทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนของยีนมาตั้งแต่อดีต ดังนั้นการใช้ฐานวิยาของเปลือกอวัยวะภายใน ตลอดจนคาร์โบไฮโป จะไม่สามารถตอบคำถามในเรื่องของขอบเขตที่ชัดเจนของสปีชีส์ตามนิยามของ Biological species และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

สำหรับหอยวงท่อสกุล *Rhiostoma* ก็เป็นรูปแบบวิวัฒนาการที่มหัศจรรย์ของชีวิต ที่พบเฉพาะในป่าเขตร้อน และป่าเขาหินปูนในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเฉพาะประเทศไทย มาเลเซียเท่านั้น ดูจากลักษณะของเปลือกที่มหัศจรรย์ มีท่อยื่นออกมาจากเปลือกเพื่อให้อากาศเข้าไปในตัวได้ และมีฝาปิดเปลือกที่ลักษณะเป็นเกลียวซับซ้อนกว่าหอยหอมมากนัก การศึกษาล่าสุดได้มีการค้นพบหอยวงท่อทั้งหมด 8 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นที่พบในประเทศไทยถึง 6 ชนิด (ศักดิ์บวร และสมศักดิ์, 2546; Patamakanthin, 2001) ข้อมูลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าดินแดนของประเทศไทยมีความหลากหลายทางระบบนิเวศ เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่เหมาะสมของหอยวงท่อ ซึ่งถือว่าเป็นหอยจำเพาะถิ่น (endemic snails) ของประเทศไทยและมาเลเซีย การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการวิเคราะห์ในเชิงความสัมพันธ์ทาง

วิวัฒนาการโดยใช้อัลโลไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส และดีเอ็นเอของหอยหอมสกุล *Cyclophorus* และหอยวงท้อสกุล *Rhiostoma* แล้วสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ผลการวิเคราะห์จะมีประโยชน์เป็นอย่างมากต่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ และองค์ความรู้ทางวิวัฒนาการ

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อวิเคราะห์ในเชิงซิสเทมาติกส์ด้วยอัลโลไซม์ และดีเอ็นเอในหอยหอม *Cyclophorus* และหอยวงท้อ *Rhiostoma* ของไทย
2. เพื่อวิเคราะห์การแพร่กระจายของหอยหอม และหอยวงท้อของไทย

3. วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนได้แก่

- 3.1 การดำเนินงานในภาคสนาม
- 3.2 การศึกษาตัวอย่างต้นแบบ (Type specimens) และตัวอย่างอ้างอิง
- 3.3 การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

3.1 การดำเนินงานในภาคสนาม

1 ทำการเก็บตัวอย่างหอยหอมและหอยวงท้อจากพื้นที่เขาหินปูน และเขาอื่น ๆ ทั่วไป และเกาะต่าง ๆ ทั่วประเทศ ได้แก่

- 1.1.1 อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี
- 1.1.2 เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าคลองท่อม จังหวัดกระบี่
- 1.2.3 ถ้ำน้ำผุด จังหวัดพังงา
- 1.2.4 ถ้ำพระขยางค์ จังหวัดระนอง
- 1.2.5 หมู่เกาะสมุย จังหวัดสุราษฎร์ธานี
- 1.2.6 วนอุทยานเทพพิทักษ์ จังหวัดนครสวรรค์
- 1.2.7 เขาสะแกกรัง จังหวัดอุทัยธานี
- 1.2.8 อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครนายก
- 1.2.9 อุทยานแห่งชาติน้ำตกพลิว จังหวัดจันทบุรี
- 1.2.10 เขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว
- 1.2.11 วนอุทยานน้ำตกวังก้านเหลือง จังหวัดลพบุรี

- 1.2.12 แนวเขาหินปูนเนินมะปรางค์ จังหวัดพิษณุโลก
- 1.2.13 อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่
- 1.2.14 วนอุทยานขุนกรณ์ จังหวัดเชียงราย
- 1.2.15 อุทยานแห่งชาติลานสาง จังหวัดตาก
- 1.2.16 ถ้ำนวะะ จังหวัดนครพนม
- 1.2.17 จังหวัดสกลนคร
- 1.2.18 จังหวัดอุดรธานี
- 1.2.19 อุทยานแห่งชาติภูเวียง จังหวัดขอนแก่น
- 1.2.20 หอถ้ำศรี จังหวัดกาฬสินธุ์
- 1.2. 21 ศรีภุมิ จังหวัดสุรินทร์
- 1.2.22 เขื่อนใน จังหวัดอุบลราชธานี
- 1.2.23 เขาหินปูน อำเภอคลองหาด จังหวัดสระแก้ว

2 เก็บรักษาตัวอย่างหอยที่ใช้ศึกษาทางกายวิภาคศาสตร์และสัณฐานวิทยาใน 70%

เอทานอล และที่ใช้ศึกษาในเชิงพันธุศาสตร์โมเลกุลใน Freezer -80 °C และ -20 °C
เปรียบเทียบโดยวิธี Allozyme Electrophoresis และวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

3.2 การศึกษาตัวอย่างต้นแบบ (Type specimens) และตัวอย่างอ้างอิง (Reference specimens) ได้เริ่มทำการศึกษาตัวอย่างต้นแบบ ณ Senckenberg Museum of Natural History, Frankfurt และที่ Natural History Museum London ก่อนเริ่มดำเนินโครงการเมื่อเดือนมีนาคม 2548, กันยายน 2549

- จดรายละเอียดของข้อมูลประกอบตัวอย่างเช่น พื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง (locality) พิกัดทางภูมิศาสตร์ (ถ้ามี) ลักษณะถิ่นที่อยู่อาศัย ข้อมูลทางเศรษฐกิจ เช่นการบริโภค และการจำหน่ายเป็นสินค้า ข้อมูลทางสาธารณสุข เช่น การเป็นโฮสต์ให้กับปรสิตประเภทใด

- นับจำนวน และวัดตัวอย่างทั้งขนาด และค่า shell height, length, width, diameter, thickness, aperture ฯ ล ฯ ตามมาตรฐานงานวิจัยทางสังขวิทยา
- ผ่าตัดศึกษาทางกายวิภาคสำหรับตัวอย่างที่มีการรักษาไว้ใน 70% เอทานอล วาดรูปลักษณะที่สำคัญด้วยกล้อง camera lucida และถ่ายภาพ

3.3 การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

1. ศึกษาทางกายวิภาค ถิ่นที่อยู่อาศัย และบริเวณพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ของหอยแต่ละชนิดอย่างละเอียด
2. ศึกษาลักษณะอื่นเพิ่มเติม เช่น อวัยวะภายในอื่น ๆ แร่ดูลา และการวิเคราะห์ โปรตีน และชีวโมเลกุล ด้วย โครโมโซม และ DNA analyses
3. ทำการวิเคราะห์ และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

4. ผลการวิจัย

การวิเคราะห์ด้วยยีน COI ทำให้การจำแนกหอยด้วยลักษณะของเปลือกในหอยหอย *Cyclophorus* โดยเฉพาะในหอยชนิด *C. fulguratus* และชนิด *C. courbeti* มีความสัมพันธ์กัน เพียงแต่หอยทั้งสองชนิดมีการกระจายค่อนข้างกว้างขวาง ที่ทำให้แนวโน้มของหอยในแต่ละพื้นที่เป็นหอยต่างสปีชีส์กัน และหอยวงท่อปรากฏในส่วนที่พัฒนาไปจากหอยหอย การวิเคราะห์ด้วยอัลโลไซม์อิเล็กโทรโพลีซิสในหอย *C. fulguratus* จาก 13 พื้นที่ ของ 12 loci ซึ่งมี 11 เอนไซม์ มีลักษณะ polymorphic ความถี่จีโนไทป์ของ 2 ประชากร พื้นที่น้ำผุด ที่ 3 loci, *Mdh*, *Mpi* และ *Aat* ที่ถ้ำนวะ 1 locus คือ *Hbdh* ค่า homozygosity สำหรับ *Mdh*, *Mpi* และ *Aat* และการไม่พบ heterozygotes อาจทำให้โอกาสของการเกิด cryptic species ขึ้นได้ เมื่อดูลักษณะสัณฐานของเปลือกและอวัยวะภายใน มีความคล้ายคลึงกันมากในกลุ่มประชากรน้ำผุด

สำหรับประชากรของถ้ำนวะ หลังจากวิเคราะห์จากทุก loci ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ค่าร้อยละของ polymorphic loci อยู่ระหว่าง 15.4 และ 53.8 ค่าคาดหวัง heterozygosity (H_{exp}) มีความผันแปรมากระหว่างประชากร อยู่ในช่วง 0.008 ถึง 0.127 ประชากรจากภาคกลาง แสดงค่า P และ H_{exp} อยู่ที่ 38.5 – 46.2 และ 0.091 – 0.124 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ตัวอย่างที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แสดงค่า P และ H_{exp} ที่ระดับปานกลางถึงต่ำ ที่ 15.4 – 53.8 และ 0.039 – 0.096 ตามลำดับ ที่ภูเก็ตมีค่า P และ H_{exp} ค่อนข้างต่ำอยู่ที่ 15.4 และ 0.008

อัลลีลที่ต่างกัน พบอยู่ 3 ของ 12 polymorphic loci คือ *Idh-1*, *Mpi* และ *Aat* จากตัวอย่างที่เขาดงกรรจ์ ภาคตะวันออก และตัวอย่างจากภาคกลาง ตัวอย่างเขาดงกรรจ์ต่างจากตัวอย่างทุกพื้นที่ที่มีอัลลีล "c" ที่ *Idh-1* ตัวอย่างภายในภาคกลาง พบความแตกต่างของตัวอย่างจากสองพื้นที่คือ ตัวอย่างจากบริเวณอุทยานแห่งชาติรามคำแหง และอุทยานแห่งชาติศรีสัชนาลัย ที่ *Hbdh*

ค่าเมตริก Nei's (1978) ระยะห่างทางพันธุกรรม (D) และ Rogers (1972) ของหอย *C. fulguratus* แสดงในตารางที่ 4 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (D) ระหว่างตัวอย่าง มีค่าตั้งแต่ 0 – 1.060 ค่า D ที่สูงที่สุด พบในตัวอย่างจากตะวันออกที่เขาดงกรรจ์ และตัวอย่างจากภาคกลาง ค่า mean $\pm$ S.D. , 0.078; range 0.544 – 0.701 และค่าระหว่างตัวอย่างที่เขาดงกรรจ์ กับตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่ค่า 0.974 ± 0.076 ; range 0.831 – 1.060 และระหว่างตัวอย่างจากภาคกลางกับตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่ค่า 0.444 ± 0.049 ; range 0.369 – 0.557 ค่า D ระหว่างตัวอย่างภาคกลางมีค่าต่ำ ที่ 0.099 ± 0.058 ; range 0.000 – 0.181 และมีค่าสูงกว่าในตัวอย่างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่ 0.005 ± 0.004 ; range 0.000 – 0.016

เฟโนแกรมค่าระยะห่างทางพันธุกรรม ระหว่างประชากรต่าง ๆ ของประชากรเขาดงกรรจ์ และประชากรจากพื้นที่อื่น ๆ ตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แยกออกจากตัวอย่างจากภาคกลาง

Phylogenetic Tree จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ยีน COI พบว่า *Cyclophorus borneensis* จากเกาะ Tioman ประเทศมาเลเซีย ปรากฏอยู่ที่จุดกำเนิด แล้วถัดมาเป็นชนิด *C. cantori* จากจังหวัดกระบี่ ที่อยู่ทางใต้ สำหรับ *C. fulguratus* พบกระจายอยู่ในหลายส่วนของความสัมพันธ์ เมื่อเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยอัลโลไซม์อิเล็กโทรโพลีซิส ทำให้ประชากรของหอยหอยชนิดนี้ใน 3 ภูมิภาค

เป็นสปีชีส์ที่แยกออกจากกันตามแนวทางของสปีชีส์ในความหมายทางชีววิทยา (Biological species) ได้แก่ประชากรเขาดงกรรจในภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง

5. การอภิปรายผลการวิจัย

ค่า P values ในหอยทากบก มีการรายงานไว้ตั้งแต่ 6 % ถึง 100 % โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 31.5 % (Nevo, 1978) ค่า H_{exp} มีค่าผันแปร อยู่ในช่วง 0.0002 – 142 แสดงให้เห็นว่าค่า P และค่า H_{exp} ในหอย *Cyclophorus fulguratus* ก่อนข้างจะมีลักษณะเป็น polymorphic species

ตามลักษณะของอัลลีลที่คงที่ และผันแปรตามภูมิศาสตร์ และตารางจาก UPGMA ได้แบ่งกลุ่มตัวอย่างของหอย *C. fulguratus* ตามลักษณะทางภูมิศาสตร์ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ภาคกลาง ตะวันออกเฉียงเหนือ และตะวันออก ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่มีค่าสูง และความต่างของอัลลีลแสดงถึง หอย 3 กลุ่มประชากรอย่างชัดเจน ตามลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกที่จำแนกโดย Habe (1964) ได้สรุปว่า *C. fulguratus* พบที่ภาคกลาง ตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และพบลักษณะความผันแปรของเปลือกอย่างเด่นชัดของหอยสองบริเวณ เมื่อตรวจสอบอย่างละเอียดพบว่า หอยที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือค่อนข้างมีสีสัน และลวดลายบนเปลือกที่หลากหลาย ในขณะที่หอยที่ภาคกลางไม่มีสีสันที่หลากหลาย ค่อนข้างเป็นสีลักษณะเดียว และการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตก็เห็นความแตกต่างของหอยสองบริเวณ กล่าวคือ หอยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบเป็น 13m + 1sm ในขณะที่หอยในภาคกลางมีค่าเป็น 13m + 1sm (Kongim et al., 2006) โดยเฉพาะหอยที่พบที่ เขาดงกรรจ จังหวัดสระแก้ว ภาคตะวันออก พบว่ามีระยะห่างทางพันธุกรรมอย่างเด่นชัด ค่าจากการวิเคราะห์ด้วยอัลโลไซม์แสดงให้เห็นถึงการแยกออกเป็นสปีชีส์อย่างเด่นชัดของประชากรนี้ เช่นเดียวกับข้อมูลของการวิเคราะห์ด้วยยีน COI หอยจากสระแก้วแยกออกจากกลุ่มอย่างเด่นชัด

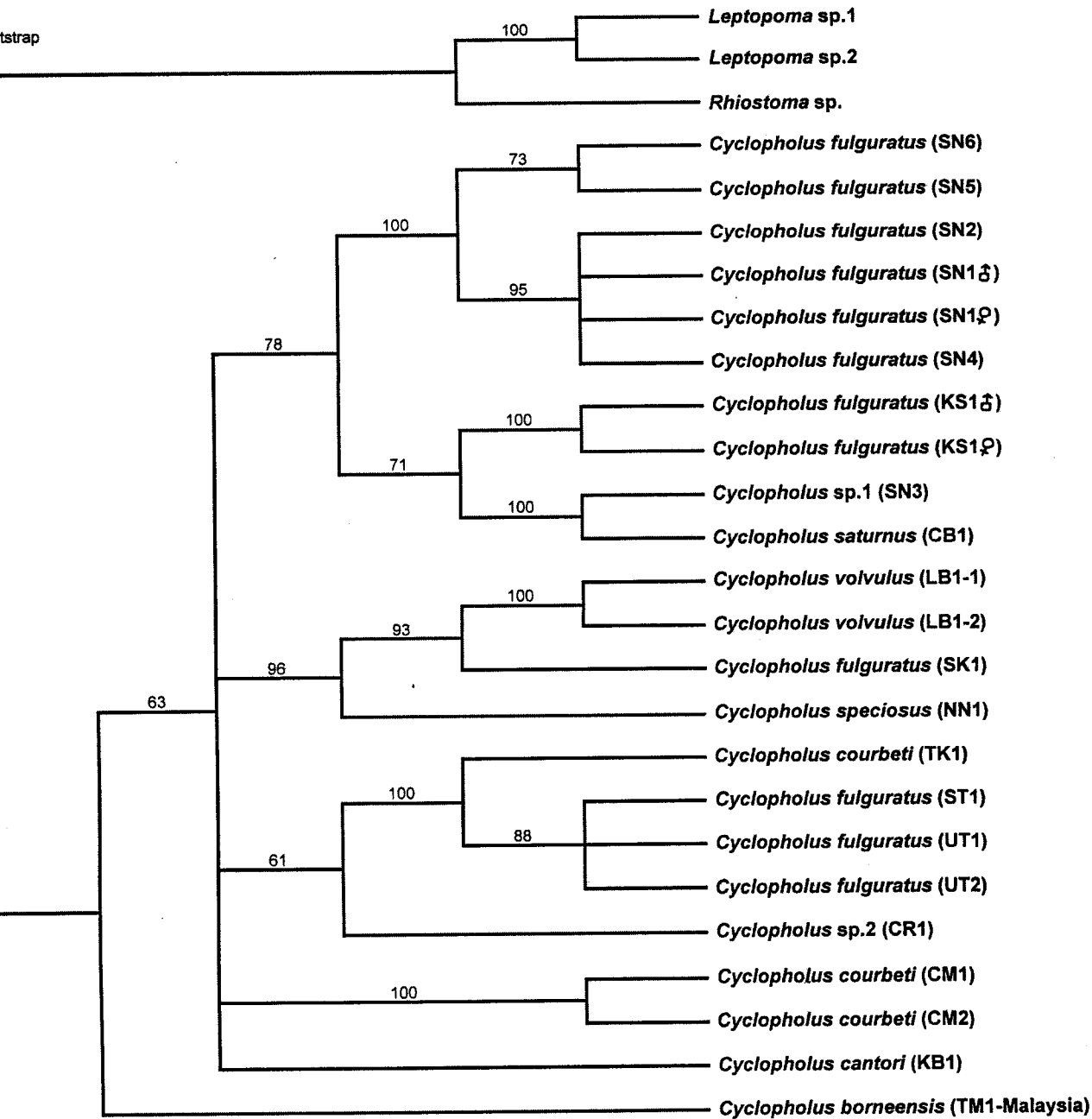
นอกจากนั้นพบว่าหอยวงท่อนั้นจับกลุ่มอยู่กับหอยสกุล *Leptopoma* ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกใกล้เคียงกันมาก เพียงแต่หอย *Leptopoma* ไม่มีท่อชัดเจนเช่น *Rhiostoma* และหอยวงท่อนั้นมีแนวโน้มว่าจะพัฒนาไปจากหอยหอม จากความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์ออกมาพบว่าหอยวงท่อนั้นมีมาภายหลังหอยหอม การพบฟอสซิลของหอยหอมที่อำเภอดำรงวิทยะกา ของคณะนักวิจัยที่แนวเขาหินปูนที่อำเภอดำรงวิทยะกาจังหวัดกาญจนบุรี เมื่อวิเคราะห์อายุพบว่า มีอายุในราว 2 ล้านปี ในราวยุค Quaternary เป็นช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงมากในแนวเขาหินปูน ทั้งการค่อยสลายของหินปูน และการเกิดเขาหินปูนใหม่ พืชบนเขามีการเปลี่ยนแปลงให้ผลผลิตของซาก และการสลายซากเป็นธาตุอาหารมากมาย เป็นลักษณะทางนิเวศที่เหมาะสมมาก สำหรับหอยทากมีฝาปิดเปลือก เช่นหอยหอมและหอยวงท่อนั้นที่จะเจริญและพัฒนา แม้ในยุคปัจจุบันก็ถือว่าเป็นยุคที่สมบูรณ์มากสำหรับการเจริญพัฒนา จึงสามารถเห็นความหลากหลาย และแนวการเปลี่ยนแปลงในเชิงวิวัฒนาการ หากทำการวิเคราะห์ในเชิงลึก ไม่ว่าจะเป็นด้วยคาร์โบไฮเดรต อัลโลไซม์ และความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอ

6. เอกสารอ้างอิง

- ศักดิ์บวร ตุ่มปีสุวรรณ และสมศักดิ์ ปัญหา. 2546. อนุกรมวิธานและซิสเต็มมาติกส์ของหอยวง
ท่อกุล *Rhiostoma* Benson, 1860 ในประเทศไทย. รายงานวิชาการโครงการ BRT ปี
2546 หน้า 145-153.
- สมศักดิ์ ปัญหา. 2543. หอยทากบก. บทความปริทัศน์งานวิจัยด้านความหลากหลายทาง
ชีวภาพในประเทศไทย (Review of Biodiversity Research in Thailand). หน้า 110-126.
- Abbott RT (1989) Compendium of Landshells. Madison Publishing Associates, New York.
- Blandford, WT (1903) Notes on Mr. WM Daly's collections of land and fresh water Mollusca of
Siam. Proc Malac Soc London 5: 247-284
- Boyer SH, Fainer DC, Watson EJ (1963) Lactate dehydrogenase variation from human blood:
evidence for molecular subunit. Science 141: 642-643
- Clayton JW, Tretiak DN (1972) Amine-citrate buffers for pH control in starch gel
electrophoresis. J Fish Res Board Canada 29: 1169-1172
- Choudhury RC, Pandit RK (1997) Chromosome of prosobranch gastropods from Viviparidae,
Pilidae and Cyclophoridae (Order Mesogastropoda). Caryologia 50: 303-315
- Gude, GK (1921) Mollusca III (Land Operculates). In the Fauna of British India including Ceylon
and Burma, AE Shipley and AK Marshall (eds.), Taylor and Francis, London, pp. 45-90.
- Habe T (1964) Operculate land mollusks from Southeast Asia. Fauna Flora Res Soc Kyoto 4:
111-127
- Justing van Benthem WSS (1948) Systematic studies on the non-marine Mollusca of the Indo-
Australian Archipelago. Treubia 19: 539-604
- Justing van Benthem WSS (1949) On a collection of non-marine Mollusca from Malaya in the
Raffles Museum, Singapore, with an appendix on cave shells. Bull Raffles Museum 19: 50-
77.
- Kasinathan R, Natarajan R (1975) Chromosome numbers of five species of Cyclophoridae
(Prosobranch: Mesogastropoda) from South India. Malacol Rev 8: 109-110
- Kobelt W (1902) Cyclophoridae. Das Tierreich, Cyclophoridae. Friedländer, Berlin pp. i-xxxix, 1-
663
- Kongim B, Naggs F, Panha S (2006) Karyotypes of operculate land snails of the genus
Cyclophorus (Prosobranchia: Cyclophoridae) in Thailand. Invert Rep Dev 49: 1-8
- Kongim B (2006) Taxonomy and systematics of operculate land snails genus *Cyclophorus*
Montfort, 1810 in Thailand. Doctoral dissertation, Department of Biology, Faculty of
Science, Chulalongkorn University
- Minato H, Habe T (1982) Land shell fauna of Ujigunto, Kusakakigunto I. Venus 41: 124-140.

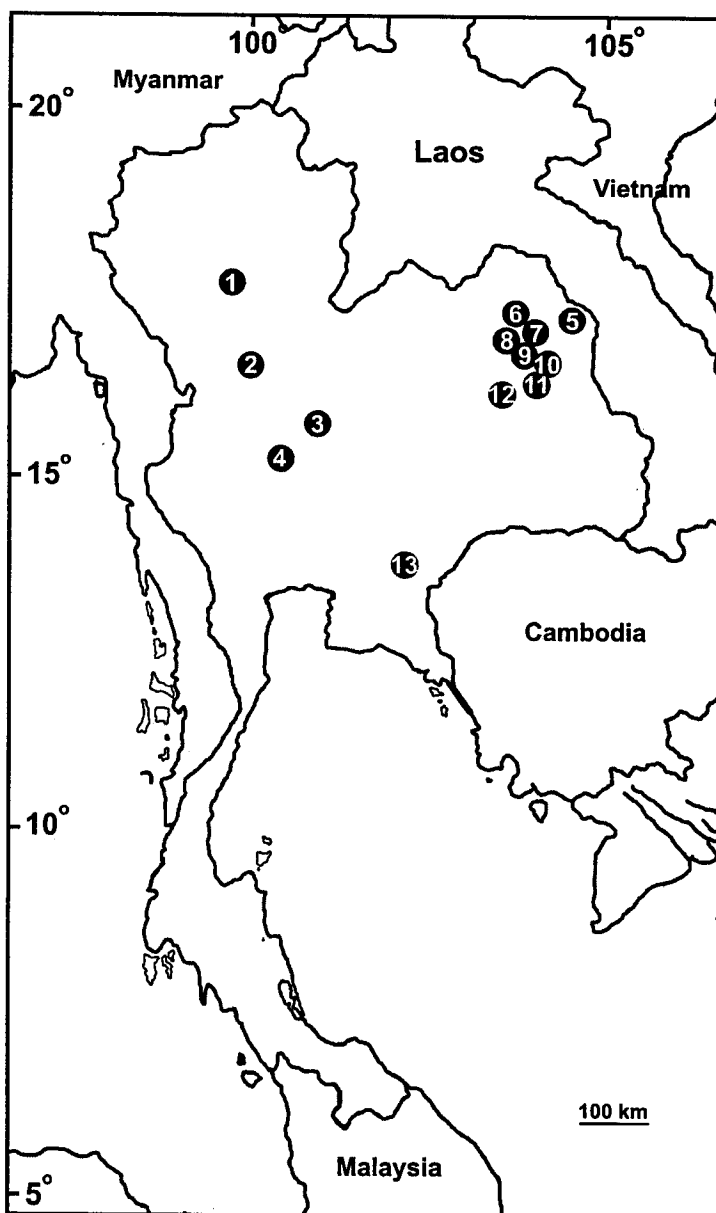
- Möllendorff, OF (1894) On a collection of land shell from the Samui Islands, Gulf of Siam. Proc Zool Soc London 62: 146-156.
- Murphy RW, Sites Jr JW, Buth DG, Haufler CH (1996) Protein: Isozyme electrophoresis. In "Molecular Systematics, 2nd edition" Ed by DM Hillis, C Moritz, BK Mable, Sinauer Association, Sunderland, Massachusetts, pp 51-120
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small sample number of individuals. Genetics 89: 583-590
- Nevill, G (1881) New or little-known Mollusca of the Indo Malayan Fauna. J Asiatic Soc Bengal 50: 125-167.
- Nevo E (1978) Genetic variation on natural populations: Pattern and Theory. Theo Pop Biol 13: 121-177
- Reeve, LA (1861) Monograph of the genus *Cyclophorus*. Conchologia Iconica, London
- Rogers JS (1972) Measures of genetic similarity and genetic distance. Stud Genet Univ Texas Publ 7213: 145-153
- Pattamakanthin, S. 2001. *Rhiostoma* from Thailand and Malaysia. *Of Sea and Shore*, 23(4): 222-223.
- Shaw CR, Prasad R (1970) Starch gel electrophoresis a compilation of recipes. Biochem Genet 4: 297-320
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. San Francisco: W. H. Freeman
- Solem, A (1966) Some non marine mollusks from Thailand. Spolia Zoologia Musei Hauniensis 24: 9-13.
- Swofford DL, Selander RB (1981) BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. J Heredity 72: 281-283
- Tielecke, H (1940) Anatomie, Phylogenie und Tiergeographie der Cyclophoroiden. Archiv Naturgeschichte 9: 317-371
- Woodruff DS, Solem A (1990) Allozyme variation in the Australian Camaenid land snail *Cristilabrum primum*: A prolegomenon for a Molecular phylogeny of an extraordinary radiation in an isolated habitat. Veliger 33: 129-139
- Zilch A (1956) Die typen und typoide des Natur-Museums Senckenberg (17): Mollusca, Cyclophoridae, Cyclophorinae-Cyclophoreae. (3) Archiv Molluskenkunde 85: 33-54

7. รายการตารางและภาพประกอบ

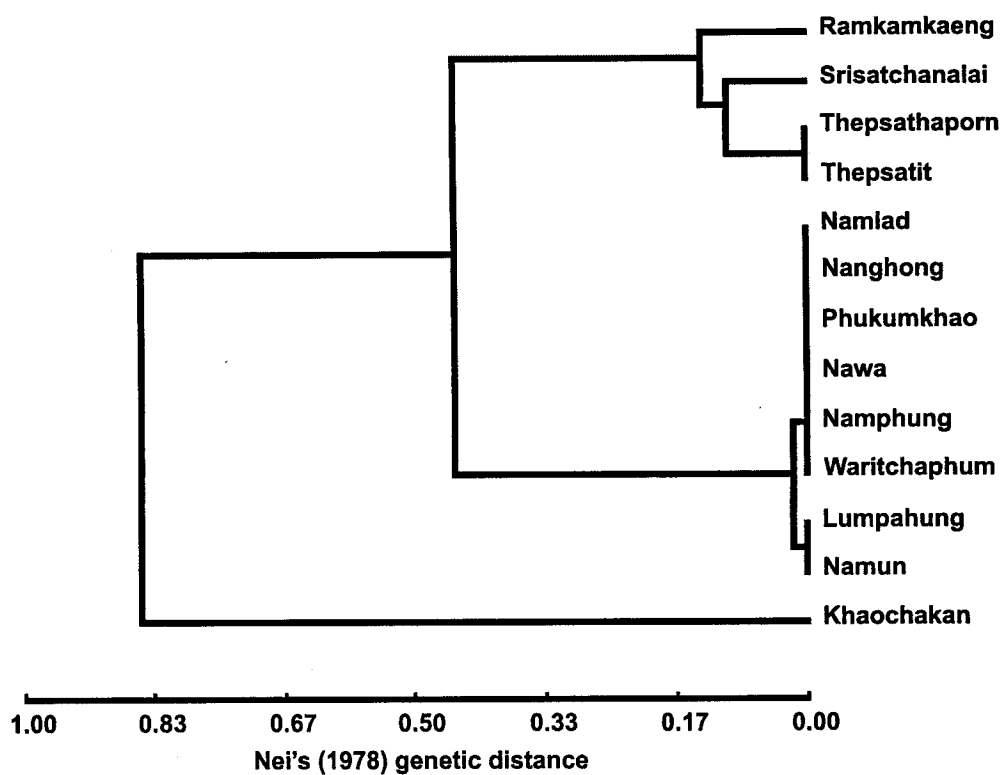


Length	CI	RI	RC	HI	G-fit
774	0.556848	0.684743	0.381297	0.443152	-170.096429
774	0.556848	0.684743	0.381297	0.443152	-170.096429
774	0.556848	0.684743	0.381297	0.443152	-170.096429
774	0.556848	0.684743	0.381297	0.443152	-170.096429

ภาพที่ 3 Phylogenetic tree ที่วิเคราะห์ ด้วยยีน COI ในหอย Cyclophorus และ Rhlostoma



ภาพที่ 1 แผนที่ประเทศไทยแสดงพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างหอย *Cyclophorus fulguratus* ในการศึกษาครั้งนี้ 1. อช. ศรีสัชนาลัย 2. อช. रामคำแหง 3. เทพประสิทธิ์ 4. เทพสถาพร 5. ถ้ำนะวะ 6. ลำพะหุ้ง 7. นามูล 8. วชิรภูมิ 9. นางหงส์ 10. น้ำพุง 11. น้ำลาด 12. ภูกุ่มข้าว 13. เขาฉกรรจ์



ภาพที่ 2 UPGMA ของ *Cyclophorus fulguratus* ตาม Nei's (1978) genetic distance

ตารางที่ 1. พื้นที่ทำการเก็บตัวอย่าง และจำนวนหอยหอม *Cyclophorus fulguratus* ที่ใช้ในการศึกษา รูปภาพที่ 1 ประกอบ

ตัวอย่าง	
พื้นที่	N
1. ศรีสัชนาลัย	14
2. รามคำแหง	20
3. เทพสถิตย์	20
4. เทพสถาพร	18
5. ถ้ำนวะะ	29
6. ลำพะทุ่ง	20
7. นามูน	9
8. วชิรภูมิ	19
9. นางหงส์	12
10. น้ำพุ	11
11. น้ำลาด	11
12. ภูกุ่มข้าว	20
13. เขาฉกรรจ์	20

ตารางที่ 2. Enzymes and presumptive loci with tissues and buffer systems used.

Enzyme	E.C. Number	Locus	Tissue*	Buffer system**
Aspartate aminotransferase	2.6.1.1	<i>Aat</i>	L	TC7
Esterase	3.1.1.-	<i>Est-1, 2, 3</i>	L	TC8
Glucose-6-phosphate isomerase	5.3.1.9	<i>Gpi</i>	L	TBE8.7
3-Hydroxybutyrate dehydrogenase	1.1.1.30	<i>Hbdh</i>	L	TBE8.7
Peptidase (leucyl-glycyl-glycine)	3.4.-.-	<i>Lgg</i>	L	TBE8.7
Peptidase (glycyl-leucine)	3.4.-.-	<i>Lg</i>	M	TC8
Malate dehydrogenase	1.1.1.37	<i>Mdh</i>	L	TC7
Isictrate dehydrogenase	1.1.1.42	<i>Idh-1, 2</i>	L	TC8
Mannose-6-phosphate isomerase	5.3.1.8	<i>Mpi</i>	M	TC8
Phosphoglucomutase	2.7.5.1	<i>Pgm</i>	L	TC8
Superoxide dismutase	1.15.1.1	<i>Sod</i>	L	TBE8.7

* Tissues: L, liver; M, muscle

** Buffer systems: TC8, tris-citrate, pH 8.0 (Clayton and Tretiak, 1972); TC7, tris-citrate, pH 7.0

(Shaw and Prasad, 1970); TBE8.7, tris-borate-EDTA, pH 8.7 (Boyer *et al.*, 1963)

ตารางที่ 3. Allele frequencies at polymorphic loci, mean number of alleles per locus (A), percentage of polymorphic loci (P), and expected heterozygosity (Standard error in parentheses) in *Cyclophorus fulguratus*. Locality numbers correspond to those in Fig. 1. Notations of alleles are alphabetical in order of anodal mobilities.

Locus and allele	Locality												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Lg</i>													
a	1.000	0.975	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.921	1.000	1.000	1.000	0.975	0.289
b		0.025						0.079				0.025	0.711
<i>Est-1</i>													
a					0.018		0.167	0.053	0.150		0.091		
b				0.028	0.982	1.000	0.833	0.868	0.850	1.000	0.909	1.000	0.594
c	0.250		0.775	0.694				0.079					0.406
d	0.750	1.000	0.225	0.278									
<i>Est-2</i>													
a						1.000	1.000	0.111		0.955	1.000		0.147
b	0.929	0.342	0.325	0.393	1.000			0.889	1.000	0.045		1.000	0.588
c	0.071	0.658	0.675	0.607									0.265
<i>Est-3</i>													
a	0.071	0.075	0.132	0.094	0.914	1.000	0.944	0.868	1.000	0.864	1.000	1.000	0.025
b	0.929	0.925	0.868	0.906	0.086		0.056	0.132		0.136			0.975
<i>Idh-1</i>													
a	0.036	0.300				1.000	1.000		0.091	0.864	1.000		
b	0.964	0.700	1.000	1.000	1.000			1.000	0.909	0.136		1.000	
c													1.000
<i>Idh-2</i>													
a	0.036				0.143	0.368	0.333				0.045		0.025
b	0.964	1.000	1.000	1.000	0.857	0.632	0.667	1.000	1.000	1.000	0.955	1.000	0.975
<i>Mdh</i>													
a			0.075							0.091			1.000
b	1.000	1.000	0.925	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.909	1.000	1.000	
<i>Hbdh</i>													
a									0.111		0.045	0.025	
b	1.000		0.700	0.767	0.966	0.975	0.944	0.944	0.889	1.000	0.955	0.975	
c		1.000	0.300	0.233	0.034	0.025	0.056	0.056					0.025
d													0.975
<i>Gpi</i>													
a		0.025		0.028					0.042				
b	1.000	0.975	1.000	0.972	1.000	1.000	1.000	1.000	0.958	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Mpi</i>													
a										0.091			1.000
b	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.909	1.000	1.000	
<i>Aat</i>													
a		0.025		0.028									
b	1.000	0.975	1.000	0.972	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.909	1.000	1.000	
c										0.091			1.000
<i>Pgm</i>													
a					1.000	1.000	1.000	0.816	1.000	0.955	0.909	1.000	
b	0.286	1.000	1.000	1.000				0.184		0.045	0.091		1.000
c	0.714												
<i>A</i>	1.5	1.5	1.4	1.5	1.3	1.2	1.3	1.5	1.3	1.5	1.3	1.2	1.5
<i>p</i>	46.2	46.2	38.5	46.2	30.8	15.4	30.8	46.2	30.8	53.8	30.8	15.4	46.2
<i>Hexp</i>	0.095	0.091	0.124	0.123	0.039	0.041	0.076	0.096	0.056	0.092	0.041	0.008	0.12
	(0.041)	(0.045)	(0.050)	(0.052)	(0.022)	(0.037)	(0.041)	(0.033)	(0.027)	(0.028)	(0.019)	(0.005)	(0.00)

ตารางที่ 4 Matrix of genetic distances between samples of *Cyclophorus fulguratus* from Thailand. Below diagonal: Nei's (1978) unbiased genetic distance. Above diagonal: Rogers (1972) genetic distance.

Population	Locality											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Srisatchanarai	-	0.225	0.181	0.161	0.361	0.385	0.375	0.341	0.363	0.355	0.354	0.354
2. Ramkamhaeng	0.181	-	0.154	0.144	0.430	0.456	0.441	0.394	0.417	0.420	0.421	0.421
3. Thepsatit	0.110	0.105	-	0.029	0.388	0.414	0.398	0.352	0.379	0.370	0.379	0.379
4. Thepsataporn	0.092	0.104	0.000	-	0.381	0.406	0.390	0.345	0.367	0.370	0.371	0.371
5. Nawa	0.418	0.514	0.442	0.432	-	0.026	0.030	0.053	0.046	0.057	0.030	0.030
6. Lumpahung	0.453	0.557	0.479	0.470	0.004	-	0.022	0.078	0.058	0.079	0.042	0.042
7. Namun	0.428	0.522	0.452	0.443	0.002	0.000	-	0.068	0.049	0.087	0.043	0.043
8. Waritchaphum	0.370	0.442	0.369	0.361	0.005	0.016	0.011	-	0.063	0.069	0.045	0.045
9. Nanghong	0.417	0.509	0.437	0.428	0.003	0.012	0.007	0.005	-	0.071	0.030	0.030
10. Namphung	0.375	0.486	0.397	0.387	0.003	0.014	0.012	0.004	0.004	-	0.063	0.063
11. Namlad	0.414	0.502	0.428	0.419	0.001	0.008	0.005	0.002	0.000	0.003	-	0.003
12. Phukumkhao	0.429	0.529	0.452	0.443	0.002	0.010	0.009	0.004	0.001	0.002	0.000	-
13. Khaochakan	0.701	0.662	0.544	0.555	0.993	1.060	1.044	0.895	1.000	0.831	0.980	0.980

ภาคผนวก

โครงการวิจัยรหัส BRT R_148007

เรื่อง ชีสเทมาติกส์ของหอยหอมและหอยวงท่อสกุล *Cyclophorus* และ *Rhiostoma*
ในประเทศไทย

สรุปผลงานวิจัย

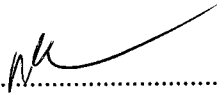
หอยหอมสกุล *Cyclophorus* และหอยวงท่อสกุล *Rhiostoma* จัดเป็นสัตว์ที่มีบทบาทที่สำคัญในระบบนิเวศบก เนื่องจากเป็นผู้ย่อยสลายซากใบไม้ และบริโภคจุลินทรีย์พวกเชื้อราบนใบไม้ และขอนไม้ผู้เป็นอาหาร นอกจากนั้นหอยหอมยังได้รับความนิยมนำไปบริโภคโดยคนไทย และประเทศเพื่อนบ้านตามท้องถิ่นต่าง ๆ หอยทั้งสองสกุลยังแสดงลักษณะของวิวัฒนาการ ทำให้ลักษณะเปลือกมีความจำเพาะ ประหลาดกว่าหอยประเภทอื่นมาก ด้วยลักษณะครึ่งหนึ่งเป็นหอยน้ำจืด ครึ่งหนึ่งเป็นหอยทากบก และความคล้ายคลึงกันของลักษณะเปลือก และอวัยวะภายใน ทำให้การจัดจำแนก หรือการศึกษาทางวิวัฒนาการของหอยทากมหัตถ์จรรยักกลุ่มนี้ทำได้ยากมาก การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือชีสเทมาติกส์ ด้วยเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ เช่น อัลโลไซมอเลคโตรโพลีซิส และดีเอ็นเอ ทำให้สามารถไขปริศนา และพบความสัมพันธ์กับอนุกรมวิธานของเปลือกของหอยหอม ยกเว้นหอยชนิด *C. fulguratus* ที่พบกระจายกว้างขวาง การวิเคราะห์พบว่าหอยใน 3 ภูมิภาค ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก มีการแยกออกเป็นสปีชีส์ที่ต่างกันแล้ว ด้วยระยะห่างทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ของ 16s DNA นอกจากนั้นยังพบว่าหอยวงท่อมีวิวัฒนาการมาภายหลังจากหอยหอม และมีความใกล้ชิดกับหอยสกุล *Leptopoma*

ผลการวิจัยครั้งนี้ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการในระดับนานาชาติคือ The 9th International Medical and Applied Malacology ณ เมือง Qingdao ประเทศสาธารณประชาชนจีนระหว่างวันที่ 17 – 20 ตุลาคม 2549 และขณะนี้ได้เตรียมต้นฉบับบทความเพื่อส่งไปรับการพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในระดับนานาชาติในฐาน ISI ที่มี impact factor ในวงการวิจัยทางด้านนี้

ในประเด็นสำคัญทางวิชาการ ทำให้สามารถพิสูจน์ว่ามีหอยอย่างน้อย 1 สปีชีส์เชิงซ้อนคือ *Cyclophorus fulguratus* ที่มีการแยกออกจากกันเป็นสปีชีส์ ตามเกณฑ์ของ Biological Species Concept ซึ่งจะได้ทำการเขียนบทความในเชิงของการตั้งหอยหอมชนิดใหม่ต่อไป การวิจัยครั้งนี้ทำให้เห็นเป็นแบบอย่างของปัญหาวิจัยของ common species ว่ามีกระบวนการทางวิวัฒนาการเกิดขึ้นมาแล้ว แต่เป็นลักษณะของ cryptic species ที่ไม่สามารถแสดงออกให้เห็นได้ด้วยตาได้

สรุป Outputs ที่ได้รับจากการดำเนินงาน

1. การตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
 - 1.1 อยู่ระหว่างการประเมินเพื่อการตีพิมพ์ จำนวน 1 เรื่อง ดังนี้
 1. Prasankok, P., Tongkerd, P., Sutcharit, C. and Panha, S. Genetic divergence in the *Cyclophorus fulguratus* (Pfeiffer, 1852) (Gastropoda: Cyclophoridae) in Thailand. *Zoological Science*.
2. การตีพิมพ์ผลงานในรูปแบบอื่น ๆ
3. การนำเสนอผลงานในที่ประชุม/สัมมนาในระดับนานาชาติ
 - 3.1 Tongkerd, P., Kongim, B., Prasankok, P., Sutcharit, C., Douzery, E., Jaeger, J.-J. and Panha, S. 2006. Molecular systematics of the land operculate snail genus *Cyclophorus* Montfort, 1810 from Thailand. Abstract on IX International Congress on Medical and Applied Malacology (October 17-20, 2006), Qingdao, China, p. 90.
 - 3.2 Kongim, B., Tongkerd, P., Sutcharit, C. and Panha, S. 2006. Karyotypes of two snorel snail of the genus *Rhiostoma* (Prosobranchia: Cyclophoridae) from Thailand. Abstract on IX International Congress on Medical and Applied Malacology (October 17-20, 2006), Qingdao, China, p. 92.
4. จำนวนนักศึกษาปริญญาเอก ในโครงการ จำนวน 2 คน ดังนี้
 - 4.1 นางสาว บังอร กองอิม ระดับปริญญาเอก ชื่อวิทยานิพนธ์ TAXONOMY AND SYSTEMATICS OF OPERCULATE LAND SNAILS GENUS *CYCLOPHORUS* MONTFORT, 1810 IN THAILAND
 - 4.2 นางสาว ผ่องพรรณ ประสานกก ระดับปริญญาเอก ชื่อวิทยานิพนธ์ GENETIC VARIATION IN TWO CAMAENID TREE SNAILS *Amphidromus atricallosus* (Gould, 1843) AND *A. inversus* (Muller, 1774) FROM SOUTHEAST ASIA, AS REVEALED BY ALLOZYME ANALYSES.

ลงนาม.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา)

ผู้รับทุน

**Genetic divergence in the *Cyclophorus fulguratus* (Gastropoda:
Cyclophoridae) in Thailand**

**Pongpun Prasankok, Piyoros Tongkerd, Chirasak Sutcharit
and Somsak Panha**

Category: Taxonomy and Systematics

ABSTRACT— Allozyme variation in *Cyclophorus fulguratus*, obtained from Thailand have been examined. To determine whether this species was monotypic across its regional distribution, genetic differentiation among populations from 13 localities were studied through allozyme electrophoresis of 12 loci. There were fixed allelic differences and large values of genetic distances among samples obtained from three regions. On the basis of allele frequencies and allozyme phenogram, three groups were identified: central, northeastern, and eastern Thailand, suggesting that these three groups may actually represent separate biological species.

Key words: *Cyclophorus fulguratus*; Allozyme: Genetic variation: Taxonomy

INTRODUCTION

The operculate land snails, *Cyclophorus fulguratus* (Pfeiffer, 1852) is a ground dwelling prosobranch gastropod species widely distributed throughout Myanmar and Thailand (Kobelt, 1902; Habe, 1964; Abbott, 1989). Based on shell morphology of red brown color of medium size shell, about 3-4 cm width, with zigzag transverse bands throughout, this demonstrated that populations of this species in various parts of Thailand are taxonomic unclear. This may because of the convergence of shell characters.

With high species diversity of over 600 and a wide-ranging distribution, *Cyclophorus* is an attractive subject for systematic and biogeography. However, while the intraspecific shell morphology of *Cyclophorus* is variable, general shell form in *Cyclophorus* is conservative and morphology of the reproduction organs has not been reported as being of value in species discrimination. There are few papers reported karyotyping of less than 5% of the total species in the genus (Kasinathan and Natarajan, 1975; Choudhury and Pandit, 1997). Recently Kongim *et al.*, (2006) reported karyotypes of the genus *Cyclophorus* in Thailand and found the sex-determining chromosome as the first record for *Cyclophorus*. *Cyclophorus fulguratus* showed variation between central (12m +

2sm) and northeastern regions (13m + 1sm) of Thailand. This was the first attempt for alpha systematics of the genus. And Kongim (2006) confirmed that reproductive anatomy could not be used as a good tool for sytematics.

Here we present genetic divergence in *C. fulguratus* on the basis of allozyme data among populations from 13 localities in Thailand, which will allows some discussion of systematic implications.

MATERIALS AND METHODS

Sampling was carried out in Thailand (Fig.1). In total, 222 *C. fulguratus* were collected from 13 localities. We also collected specimen following Kongim *et al.* (2006) for samples from Khaochakan and Nawa. All snails were stored at -70°C until they were processed for electrophoresis. Liver and muscle tissue was removed from each specimen and homogenized. Protein extracts from each homogenate were subjected to horizontal starch gel electrophoresis following Murphy *et al.* (1996) with slight modifications. Voucher specimens were deposited in the Chulalongkorn University, Museum of Zoology.

Electrophoretic methods largely followed Clayton and Tretiak (1972), Boyer *et al.* (1963), and Shaw and Prasad (1970). Enzyme nomenclature and E.C. numbers follow those proposed by the International Union of Biochemistry.

Genotypic frequency at each polymorphic locus was tested for agreement with Hardy-Weinberg expectation using exact test. Genetic variability within each population was assessed by calculating the mean expected heterozygosity (H_{exp}), the mean number of alleles per locus (A), and the percentage of polymorphic loci (P).

Nei's (1978) unbiased genetic distance and Rogers' (1972) genetic distance were calculated for all pairwise comparisons of samples in order to estimate the extent of differentiation among populations. The coefficient was cluster by the UPGMA (Sneath and Sokal, 1973). Data analyses were performed using BIOSYS-1 (Swofford and Selander, 1981).

RESULTS

In the samples of *C. fulguratus*, 13 out of 12 loci for eleven enzymes were polymorphic (Table 3). Genotype frequencies appeared to deviate from Hardy-Weinberg expectation in two populations, Namphung at three loci, *Mdh*, *Mpi* and *Aat*, and Nawa at one locus, *Hbdh*. In Namphung population, lack of fit can be attributed to the presence of one individual homozygous for an allele (a, a, and c, respectively) not present in other Namphung snails. The homozygosity of this snail for *Mdh*, *Mpi* and *Aat* and the absence of heterozygotes might be indicated that this snail represents a cryptic species. In addition, this snail did not differ morphologically from other Namphung individuals and its genotypes

were otherwise identical to other snails (Table 3). In Nawa population, considering the total number of loci examined, it is not statistically significant because of multiple comparisons involved. The percentage of polymorphic loci varies between 15.4 and 53.8. The expected heterozygosity (H_{exp}) varied greatly among populations, ranging from 0.008 to 0.127. The central Thailand samples showed moderate P and H_{exp} values (38.5-46.2 and 0.091-0.124, respectively: Table 3). Likewise, the northeastern Thailand samples exclusive of those from Phukumkhao displayed moderate to low P and H_{exp} values (15.4-53.8 and 0.039-0.096, respectively). In the Phukumkhao sample, both P and H_{exp} were much lower (15.4 and 0.008).

Different alleles were fixed at three of the 12 polymorphic loci (*Idh-1*, *Mpi*, and *Aat*) between the Khaochakan sample and the central Thailand samples. The Khaochakan sample was distinct from all Thailand samples in having allele "c" at *Idh-1*. Also, this sample showed fixed and nearly fixed allelic differences from the northeastern Thailand samples at *Idh-1*, *Mdh*, *Hbdh*, *Mpi* and *Aat*. Within the northeastern Thailand samples, fixed differences were observed between the Namlad-Lumpahung-Namun samples and the Nakhonphanom-Nanghong-Phukumkhao samples at *Est-2*, between the Namlad-Lumpahung-Namun samples and the Nakhonphanom-Waritchaphum-Phukumkhao samples at *Idh-1*. Within the central Thailand samples, there was fixed differences between the Ramkamhaeng sample and the Srisatchanarai sample at *Hbdh*.

Matrices of Nei's (1978) genetic distance (D) and Rogers (1972) distance between the samples of *C. fulguratus* are presented in Table 4. The values of D between the samples varied from 0-1.060. Large D values were obtained between the Khaochakan sample and the central Thailand samples (mean $\pm$ S.D., 0.616 ± 0.078 ; range, 0.544-0.701), between the Khaochakan sample and the northeastern Thailand samples (0.974 ± 0.076 ; range, 0.831-1.060), and between the central Thailand samples and the northeastern Thailand samples (0.444 ± 0.049 ; range, 0.369-0.557). The D values between the central Thailand samples (0.099 ± 0.058 ; range, 0.000-0.181) were smaller, and larger than those between the northeastern Thailand samples (0.005 ± 0.004 ; range, 0.000-0.016).

The phenogram (Fig. 2) constructed from the matrix of genetic distance for among population comparisons revealed a marked divergence between the Khaochagan population and the remaining populations. The remaining northeastern populations were separated from the central populations.

DISCUSSION

The *P* values in land snails have been reported from 6% to 100 %, with an average of 31.5% (Nevo, 1978). The *H_{exp}* values also vary, ranging from 0.0002-142. Thus, the obtained *P* and *H_{exp}* values of *C. fulguratus* are considered moderate for a polymorphic species.

Both the geographic pattern of fixed allelic differences and the topology of the UPGMA phenogram have grouped the samples of *C. fulguratus* according to their geographic location in to three groups: central, northeastern, and eastern Thailand. The relatively large genetic distance and allelic differences suggest that these samples actually represent three distinct localized populations. On the basis of shell morphology, Habe (1964) mentioned that *C. fulguratus* obtained between central Thailand, northeastern Thailand exhibit significant variation. The samples from the northeastern region differ from that of central Thailand in having unicolored periostracum. The present results do not only support these notions, but also support the validity of the chromosome variation between two regions.

The Khaochakan population, identified as *C. fulgurtus* (Kongim *et al.*, 2006; Habe, 1964) reveals relatively large degree of divergence from the remaining populations. Data obtained from allozyme analyses strongly suggest that this population represents the full species. However, our data suggest that the taxonomic allocation of this population is yet unclear and remains to be clarified on the basis of comparative analyses of the geographic variation in morphological characters and DNA sequence of the potential *C. fulguratus* species complex.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to express our sincere gratitude towards P. Tongkerd, B. Kongim and C. Sutcharit for assistance in collecting the materials. This research was funded by TRF-CNRS Project (BRT-248005).

REFERENCES

- Abbott RT (1989) Compendium of Landshells. Madison Publishing Associates, New york
- Boyer SH, Fainer DC, Watson EJ (1963) Lactate dehydrogenase variation from human blood: evidence for molecular subunit. *Science* 141: 642-643
- Clayton JW, Tretiak DN (1972) Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. *J Fish Res Board Canada* 29: 1169-1172
- Choudhury RC, Pandit RK (1997) Chromosome of prosobranch gastropods from Viviparidae, Pilidae and Cyclophoridae (Order Mesogastropoda). *Caryologia* 50: 303-315
- Habe T (1964) Operculate land mollusks from Southeast Asia. *Founa Flora Res Soc Kyoto* 4: 111-127
- Kasinathan R, Natarajan R (1975) Chromosome numbers of five species of Cyclophoridae (Prosobranch: Mesogastropoda) from South India. *Malacol Rev* 8: 109-110
- Kobelt W (1902) Cyclophoridae. *Das Tierreich, Cyclophoridae*. Friedländer, Berlin pp. i-xxxix, 1-663
- Kongim B, Naggs F, Panha S (2006) Karyotypes of operculate land snails of the genus *Cyclophorus* (Prosobranchia: Cyclophoridae) in Thailand. *Invert Rep Dev* 49: 1-8

- Kongim B (2006) Taxonomy and systematics of operculate land snails genus *Cyclophorus* Montfort, 1810 in Thailand. Doctoral dissertation, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University
- Murphy RW, Sites Jr JW, Buth DG, Haufler CH (1996) Protein: Isozyme electrophoresis. In "Molecular Systematics, 2nd edition" Ed by DM Hillis, C Moritz, BK Mable, Sinauer Association, Sunderland, Massachusetts, pp 51-120
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small sample number of individuals. *Genetics* 89: 583-590
- Nevo E (1978) Genetic variation on natural populations: Pattern and Theory. *Theo pop biol* 13: 121-177
- Rogers JS (1972) Measures of genetic similarity and genetic distance. *Stud Genet Univ Texas Publ* 7213: 145-153
- Shaw CR, Prasad R (1970) Starch gel electrophoresis a compilation of recipes. *Biochem Genet* 4: 297-320
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. San Francisco: W. H. Freeman
- Swofford DL, Selander RB (1981) BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J Heredity* 72: 281-283

Woodruff DS, Solem A (1990) Allozyme variation in the Australian Camaenid land snail *Cristilabrum primum*: A prolegomenon for a Molecular phylogeny of an extraordinary radiation in an isolated habitat. Veliger 33: 129-139

Figure legends

Fig. 1. Map of Thailand showing the collecting localities of *Cyclophorus fulguratus* in this study. 1 Srisatchanarai; 2 Ramkamhaeng; 3 Thepsatit; 4 Thepsataporn; 5 Nawa; 6 Lumpahung; 7 Namun; 8 Waritchaphum; 9 Nanghong; 10 Namphung; 11 Namlad; 12. Phukumkhao; 13 Khaochakan.

Fig. 2. UPGMA phenogram for *Cyclophorus fulguratus* based on Nei's (1978) genetic distance.

Table 1. Localities and sizes of samples of *Cyclophurus fulguratus* used in this study. The sample numbers correspond to those in Fig. 1.

Sample	
Locality	N
1. Srisatchanarai	14
2. Ramkamhaeng	20
3. Thepsatit	20
4. Thepsataporn	18
5. Nawa	29
6. Lumpahung	20
7. Namun	9
8. Waritchaphum	19
9. Nanghong	12
10. Namphung	11
11. Namlad	11
12. Phukumkhao	20
13. Khaochakan	20

Table 2. Enzymes and presumptive loci with tissues and buffer systems used.

Enzyme	E.C. Number	Locus	Tissue*	Buffer system**
Aspartate aminotransferase	2.6.1.1	<i>Aat</i>	L	TC7
Esterase	3.1.1.-	<i>Est-1, 2, 3</i>	L	TC8
Glucose-6-phosphate isomerase	5.3.1.9	<i>Gpi</i>	L	TBE8.7
3-Hydroxybutyrate dehydrogenase	1.1.1.30	<i>Hbdh</i>	L	TBE8.7
Peptidase (leucyl-glycyl-glycine)	3.4.-.-	<i>Lgg</i>	L	TBE8.7
Peptidase (glycyl-leucine)	3.4.-.-	<i>Lg</i>	M	TC8
Malate dehydrogenase	1.1.1.37	<i>Mdh</i>	L	TC7
Isicitrate dehydrogenase	1.1.1.42	<i>Idh-1, 2</i>	L	TC8
Mannose-6-phosphate isomerase	5.3.1.8	<i>Mpi</i>	M	TC8
Phosphoglucomutase	2.7.5.1	<i>Pgm</i>	L	TC8
Superoxide dismutase	1.15.1.1	<i>Sod</i>	L	TBE8.7

* Tissues: L, liver; M, muscle

** Buffer systems: TC8, tris-citrate, pH 8.0 (Clayton and Tretiak, 1972); TC7, tris-citrate, pH 7.0 (Shaw and Prasad, 1970); TBE8.7, tris-borate-EDTA, pH 8.7 (Boyer *et al.*, 1963)

Table 3. Allele frequencies at polymorphic loci, mean number of alleles per locus (*A*), percentage of polymorphic loci (*P*), and expected heterozygosity (Standard error in parentheses) in *Cyclophorus fulguratus*. Locality numbers correspond to those in Fig. 1. Notations of alleles are alphabetical in order of anodal mobilities.

Locus and allele	Locality												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Lg</i>													
a	1.000	0.975	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.921	1.000	1.000	1.000	0.975	0.289
b		0.025						0.079				0.025	0.711
<i>Est-1</i>													
a					0.018		0.167	0.053	0.150		0.091		
b				0.028	0.982	1.000	0.833	0.868	0.850	1.000	0.909	1.000	0.594
c	0.250		0.775	0.694				0.079					0.406
d	0.750	1.000	0.225	0.278									
<i>Est-2</i>													
a						1.000	1.000	0.111		0.955	1.000		0.147
b	0.929	0.342	0.325	0.393	1.000			0.889	1.000	0.045		1.000	0.588
c	0.071	0.658	0.675	0.607									0.265
<i>Est-3</i>													
a	0.071	0.075	0.132	0.094	0.914	1.000	0.944	0.868	1.000	0.864	1.000	1.000	0.025
b	0.929	0.925	0.868	0.906	0.086		0.056	0.132		0.136			0.975
<i>Idh-1</i>													
a	0.036	0.300				1.000	1.000		0.091	0.864	1.000		
b	0.964	0.700	1.000	1.000	1.000			1.000	0.909	0.136		1.000	
c													1.000
<i>Idh-2</i>													
a	0.036				0.143	0.368	0.333				0.045		0.025
b	0.964	1.000	1.000	1.000	0.857	0.632	0.667	1.000	1.000	1.000	0.955	1.000	0.975
<i>Mdh</i>													
a			0.075							0.091			1.000
b	1.000	1.000	0.925	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.909	1.000	1.000	
<i>Hbdh</i>													
a									0.111		0.045	0.025	
b	1.000		0.700	0.767	0.966	0.975	0.944	0.944	0.889	1.000	0.955	0.975	
c		1.000	0.300	0.233	0.034	0.025	0.056	0.056					0.026
d													0.974
<i>Gpi</i>													
a		0.025		0.028					0.042				
b	1.000	0.975	1.000	0.972	1.000	1.000	1.000	1.000	0.958	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Mpi</i>													
a										0.091			1.000
b	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.909	1.000	1.000	
<i>Aat</i>													
a		0.025		0.028									
b	1.000	0.975	1.000	0.972	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.909	1.000	1.000	
c										0.091			1.000
<i>Pgm</i>													
a					1.000	1.000	1.000	0.816	1.000	0.955	0.909	1.000	
b	0.286	1.000	1.000	1.000				0.184		0.045	0.091		1.000
c	0.714												
<i>A</i>	1.5	1.5	1.4	1.5	1.3	1.2	1.3	1.5	1.3	1.5	1.3	1.2	1.5
<i>p</i>	46.2	46.2	38.5	46.2	30.8	15.4	30.8	46.2	30.8	53.8	30.8	15.4	46.2
<i>Hexp</i>	0.095	0.091	0.124	0.123	0.039	0.041	0.076	0.096	0.056	0.092	0.041	0.008	0.127
	(0.041)	(0.045)	(0.050)	(0.052)	(0.022)	(0.037)	(0.041)	(0.033)	(0.027)	(0.028)	(0.019)	(0.005)	(0.060)

Table 4. Matrix of genetic distances between samples of *Cyclophorus fulguratus* from Thailand. Below diagonal: Nei's (1978) unbiased genetic distance. Above diagonal: Rogers (1972) genetic distance.

Population	Locality												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. Srisatchanarai	-	0.225	0.181	0.161	0.361	0.385	0.375	0.341	0.363	0.355	0.354	0.364	0.525
2. Ramkamaeng	0.181	-	0.154	0.144	0.430	0.456	0.441	0.394	0.417	0.420	0.421	0.426	0.504
3. Thepsatit	0.110	0.105	-	0.029	0.388	0.414	0.398	0.352	0.379	0.370	0.379	0.388	0.446
4. Thepsataporn	0.092	0.104	0.000	-	0.381	0.406	0.390	0.345	0.367	0.370	0.371	0.381	0.447
5. Nawa	0.418	0.514	0.442	0.432	-	0.026	0.030	0.053	0.046	0.057	0.030	0.023	0.650
6. Lumpahung	0.453	0.557	0.479	0.470	0.004	-	0.022	0.078	0.058	0.079	0.042	0.032	0.675
7. Namun	0.428	0.522	0.452	0.443	0.002	0.000	-	0.068	0.049	0.087	0.043	0.048	0.663
8. Waritchaphum	0.370	0.442	0.369	0.361	0.005	0.016	0.011	-	0.063	0.069	0.045	0.050	0.605
9. Nanghong	0.417	0.509	0.437	0.428	0.003	0.012	0.007	0.005	-	0.071	0.030	0.030	0.643
10. Namphung	0.375	0.486	0.397	0.387	0.003	0.014	0.012	0.004	0.004	-	0.063	0.053	0.602
11. Namlad	0.414	0.502	0.428	0.419	0.001	0.008	0.005	0.002	0.000	0.003	-	0.021	0.639
12. Phukumkhao	0.429	0.529	0.452	0.443	0.002	0.010	0.009	0.004	0.001	0.002	0.000	-	0.648
13. Khaochakan	0.701	0.662	0.544	0.555	0.993	1.060	1.044	0.895	1.000	0.831	0.980	0.993	-

