การจำแนกชนิดของทากเล็บมือนางสกุล *Parmarion* ในประเทศไทยด้วยสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล

Identification of semi-slug genus *Parmarion* in Thailand using morphological and molecular genetic

ศุภกร วงษ์เรืองพิบูล[1] ดาราพร รินทะรักษ์[1] อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข[1]

[1]กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

In this study, 95 Semi-slug specimens, genus *Parmarion,* were collected from five regions of Thailand. Cytochrome C oxidase subunit I or COI gene, 600 base-pairs length, mitochondrial gene, of 20 snail specimens were amplified and analyzed. The DNA sequences were compared with COI gene of *Parmarion martensi* from GenBank (Specimen from Taiwan; Accession number: FJ481180). Results from comparison, pairwise distance, suggested that the distance values were ranged between 0.00000 to 0.04228 (Overall mean distance = 0.01874). Calculation from phylogenetic, maximum likelihood and Bayesian inference methods, showed that two clades of semi-slugs in Thailand occurred. Firstly, 14 DNA sequences were grouped together and become clade A. The remaining sequences, six semi-slugs, were combined with GenBank's *Parmarion martensi* sequence. Moreover, at least two *Parmarion martensi* specimens from Loei (NNLO01) and Nakhon Nayok (KDNN01) provinces, were identified (sequences similarity = 100%)

Keyword: *Parmarion*, Morhological, Molecular genetics, Thailand

บทคัดย่อ

งานวิจัยชิ้นนี้ดำเนินการเก็บตัวอย่างทากเล็บมือนางสกุล *Parmarion* จาก 5 ภูมิภาคทั่วประเทศไทยจำนวน 95 ตัวอย่าง ทำการเพิ่มปริมาณยีนไซโตโครม ซี ออกซิเดส ซับยูนิตหนึ่ง หรือ COI ความยาว 600 คู่เบสสำเร็จจำนวน 20 ตัวอย่าง จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนดังกล่าวกับทากเล็บมือนางมาร์เทนส์จากฐานข้อมูล GenBank (ตัวอย่างจากประเทศไต้หวัน; Accession number: FJ481180) โดยการหาค่า pairwise distance และการสร้างไฟโลเจเนติกทรีวิธีการ Maximum likelihood และ Bayesian inference ผลปรากฏว่าลำดับพันธุกรรมของทากเล็บมือนางทั้ง 20 ตัวอย่างมีค่า pairwise distance ตั้งแต่ 0.00000 จนถึง 0.04228 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.01874. ผลการสร้างไฟโลเจเนติกทรีทั้งสองวิธีพบการจับกลุ่มของลำดับ

พันธุกรรมทากเล็บมือนางแบ่งออกเป็นสองกลุ่มอย่างชัดเจน ได้แก่ เคลด A มีสมาชิกทากเล็บมือนางจำนวน 14 ตัวอย่างและ เคลด B ประกอบไปด้วยสมาชิกทากเล็บมือนางจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งมีการจับกลุ่มรวมกันกับทากเล็บมือนางมาร์เทนส์จากฐานข้อมูล GenBank พบตัวอย่างทากเล็บมือนางอย่างน้อยสองตัวอย่างจากจังหวัดเลย (NNLO01) และนครนายก (KDNN01) ถูกระบุชนิดว่าเป็นทากเล็บมือนางมาร์เทนส์เนื่องจากมีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน COI เหมือนกับทากเล็บมือนางมาร์เทนส์จาก GenBank 100% (Pairwise distance = 0.00000)

คำสำคัญ: ทากเล็บมือนาง *Parmarion*, ลักษณะทางสัญฐานวิทยา, ลักษณะทางพันธุกรรม, ประเทศไทย

คำนำ

ทากเล็บมือนาง *Parmarion* spp. (Gastropoda, Stylommatophora, Helicarionidae) จัดอยู่ในกลุ่มหอยฝาเดียว อาศัยอยู่บนบกและหายใจด้วยปอด ส่วนเปลือกของทากจะมีการลดรูปกลายเป็นแผ่นเกล็ดเล็กสีเหลือง น้ำตาล จนถึงสีดำคล้ายเล็บมือติดอยู่ด้านบนของลำตัวทาก บริเวญเปลือกด้านบนยังหลงเหลือร่องรอยการขดวนเล็กน้อย และมีแผ่นหนังบาง ๆ ที่เรียกว่าแผ่น mantle lapp เลื่อนเปิดปิดคลุมส่วนเปลือก เนื้อเยื่อส่วนชั้นแมนเทิลมีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับลำตัว ลำตัวทากมีความหลากหลายของสีสันตั้งแต่เทาดำ สีน้ำตาลเหลือง ไปจนถึงเหลืองนวล ส่วนด้านปลายของหางมีลักษณะเป็นสันติ่งเนื้อสีจางกว่าลำตัวและมีลักษณะเป็นสันตั้งขึ้นมาจากลำตัวส่วนหาง (จิรศักดิ์และคณะ, 2561) ด้านข้างของลำตัวส่วนล่างมีร่องแบ่งระหว่างส่วนลำตัวส่วนบนกับส่วนเท้าออกจากกันชัดเจน ทากเล็บมือนางพบอาศัยอยู่ตามป่าที่มีความชื้นสูง ภูเขา ไปจนถึงพื้นที่เกษตรกรรม โดยเฉพาะเรือนเพาะชำ ทากสกุลดังกล่าวมีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่ปัจจุบันกลายเป็นชนิดพันธุ์ต่างถิ่นรุกรานในบางประเทศ เช่น รัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา และฟิจิ (Brodie & Barker, 2012) โดยเป็นศัตรูพืชที่สำคัญของพืชตระกูลกระหล่ำและมะละกอ นอกจากนี้ยังเป็นพาหะของพยาธิ *Angiostrongylus cantonensis* หรือพยาธิปอดหนูซึ่งสามารถก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดอิโอสิโนฟิลิกในมนุษย์ จากการรายงานของ Cowie (2018) พบว่าทาก *P. martensi* เป็นหนึ่งในสัตว์อาศัยตัวกลางที่สำคัญของพยาธิตัวกลม *Angiostrongylus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพยาธิหอยโข่งที่พบได้บ่อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งมีสัตว์อาศัยตัวกลาง ได้แก่ หอยโข่ง หอยเชอรี่ กุ้งน้ำจืด ปูน้ำจืด หอยทากบก และมีสัตว์อาศัยสุดท้ายคือหนู แต่มนุษย์สามารถเป็นสัตว์อาศัยโดยบังเอิญ (accidental host) ในกรณีที่รับประทานสัตว์อาศัยตัวกลางในลักษณะกึ่งสุกกึ่งดิบ

ความสำคัญของทากเล็บมือนางด้านการเกษตรของไทย ในปี 2554 มีการรายงานว่าทากสกุลนี้สามารถกัดกินและทำลายพืชผลทางการเกษตรโดยพบการเข้าทำลายในโรงเรือนปลูกพืชหลายชนิด ได้แก่ โรงเรือนกล้วยไม้ หน้าวัว เบญจมาศ ส้มปลอดโรค และโรงเรือนปลูกผักชีฝรั่ง ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศ (ปราสาททองและคณะ, 2554) ในปี 2555 มีการรายงานว่ามีการเข้าทำลายพืชผลทางการเกษตรของทากเล็บมือนางในพื้นที่สวนกล้วยไม้ แปลงผัก สวนผลไม้ต่าง ๆ ในภาคกลางและภาคตะวันตก (ปิยาณีและคณะ, 2555) สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชระบุว่ามีทากเล็บมือนางในสกุล *Parmarion* จำนวนสองชนิดเป็นศัตรูพืชที่สำคัญของกล้วย ได้แก่ *P. setchaunensis* และ *P. siamensis* โดยมีการเข้าทำลายในส่วนของใบและหน่อเป็นหลัก (Plant Protection Research and Development Office, 2559) เนื่องจากมีขนาดตัวที่เล็กและแบนทำให้สามารถในการหลบซ่อนตัวตามไปตามสินค้าและยานพาหนะขนส่งสินค้าเกษตรส่งออก ในกรณีที่ประเทศปลายทางมีความเข้มงวดเกี่ยวกับการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันทางการเกษตร เช่น ญี่ปุ่น หรือสหภาพ

ยุโรป หากมีการตรวจพบทากดังกล่าวในสินค้าอาจถูกส่งกลับหรือถูกเผาทำลายทั้งหมด ส่งผลกระทบต่อภาพลักษณ์ของประเทศไทยทางด้านการเป็นผู้ส่งออกสินค้าทางการเกษตรที่สำคัญ

ถึงแม้ว่าทากเล็บมือนางสกุลนี้จะมีความสำคัญต่อคนไทยในเชิงเกษตรกรรมและสาธารณสุข อย่างไรก็ตามข้อมูลเชิงอนุกรมวิธานการและการจำแนกชนิดทากกลุ่มดังกล่าวในประเทศไทยที่ยังไม่มีการศึกษาที่ชัดเจน ประกอบกับฐานของมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) หรือ Gen Bank ที่มีข้อมูลทางอณูชีววิทยาทากดังกล่าวเพียงเล็กน้อย ดังนั้นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานประกอบกับข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อนำเอามาใช้เป็นเครื่องมือแก้ปัญหาความสับสนในการระบุชนิดของทากเล็บมือนางในประเทศไทยจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อที่จะทราบชนิดของทากเล็บมือนาง *Pamarion* spp. ที่มีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางอณูชีววิทยาในการจำแนก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ภาชนะเลี้ยงหอยทากเล็บมือนาง ขนาดกว้าง x ยาว x สูง : 30 x 15 x 20 ซม พร้อมฝาปิด
2. วัสดุรองนอนได้แก่ กระดาษทิชชูชุ่มน้ำ และใบกล้วย
3. อาหารที่ใช้เลี้ยงหอยได้แก่ ผักต่าง ๆ หรือผลไม้
4. ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป และสารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์
5. กล้องสเตอริโอไมโครสโคป และอุปกรณ์ผ่าตัด

วิธีการ

1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทาก

เก็บตัวอย่างทากเล็บมือนางจากแหล่งธรรมชาติหรือแปลงเกษตรที่เป็นพืชอาหาร ลงในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% ดำเนินการผ่าตัดทากเล็บมือนางภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป สังเกตุลักษณะสัญฐานของอวัยวะสืบพันธุ์พร้อมบันทึกภาพเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวกับเอกสารทางวิชาการทั้งภายในและต่างประเทศ

2 การศึกษาข้อมูลทางอณูชีววิทยาของทากเล็บมือนาง (ยีน Cytochrome C oxidase subunit I หรือ COI)

การเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างทากเล็บมือนางโดยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อของสัตว์ เก็บรักษาดีเอ็นเอของทากไว้ที่ตู้แช่งแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ตามวิธีการของ Folmer *et* al., (1994) โดยแต่ละไพร์เมอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ COI-1490 (5’--- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G ---3’)

รีเวิร์สไพรเมอร์ COI-2198 (5’--- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA ---3’)

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 25 microlites ใช้สารเคมีต่อไปนี้

PCR Master Mix 2X (DreamTaq PCR Master Mix, Thermo Scientific) 12.5 µl

10 µM COI-1490 forward primer	2.5 µl
10 µM COI-2198 reverse primer	2.5 µl
template DNA (ดีเอ็นเอทากเล็บมือนาง)	3 µl
$MgCl_2$ ความเข้มข้น 52 millimolar (Optional)	0 - 1 µl
น้ำกลั่น (Water nuclease free)	4.5 – 5.5 µl

นำสารทั้งหมดใส่ในหลอดพีซีอาร์และผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง thermocycler ภายใต้อุณหภูมิดังนี้

1)	Initial Denaturation	95°C	เป็นเวลา 3 นาที
2)	Denaturation	95°C	เป็นเวลา 30 วินาที
3)	Annealing	50°C	เป็นเวลา 1 นาที
4)	Extension	72°C	เป็นเวลา 1 นาที
5)	Final Extension	72°C	เป็นเวลา 1 นาที

ทำขั้นตอนที่ 2 – 4 ซ้ำ จำนวน 40 รอบ

ทำการตรวจสอบว่ามียีนที่เราต้องการเพิ่มขึ้นมาในผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เกิดขึ้นจากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือไม่ โดยใช้อะกาโรสเจล (ไม่ต้องผสมสีย้อมหรือ Loading dye เนื่องจาก DreamTaq PCR Master Mix ผสมสีย้อมเรียบร้อยแล้ว) ความเข้มข้นของเนื้อเจลที่ 1.5% ต่อความเข้มข้นทีบีอีบัฟเฟอร์ 1X จ่ายกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักดิ์ 100 โวลต์ผ่านอะกาโรสเจล เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีเพื่อเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ด้วยเครื่อง เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล Gel Documentation ในกรณีที่มียีน COI ที่เราต้องการเพิ่มขึ้นจะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ความยาวประมาณ 650 คู่เบส เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสรอการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated sequencer ที่มีให้บริการโดยบริษัทเอกชนที่รับจ้างอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน COI ในฐานข้อมูล Genbank และเปรียบเทียบข้อมูลทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำไฟล์ที่ได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated sequencer มาวิเคราะห์ และตัดบริเวณสัญญาณรบกวนออก นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงด้วยโปรแกรม ClustalX2 (Larkin *et* al., 2007) ดำเนินการหาค่า Pairwise distances เพื่อคำนวนความแตกต่างทางพันธุกรรมของทากเล็บมือนางแต่ละตัวอย่างเปรียบเทียบตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ *Parmarion martensi* ยีน COI จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information หรือ GenBank (Accession number: FJ481180) ซึ่งเป็นตัวอย่างจากประเทศไต้หวันจำนวน 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม MEGA version 11 (Tamura, Stecher, and Kumar 2021) จากนั้นคำนวน Nucleotide substitution model ที่เหมาะสมกับชุดข้อมูลพันธุกรรมดังกล่าว ทำการสร้างไฟโลเจนเนติกทรีด้วยวิธีการ Maximum likelihood (Goldman, 1990) เพื่อวิเคราะห์หาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม MEGA version 11 และสร้างไฟโลเจนเนติกทรีด้วยวิธีการ Bayesian (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) โดยใช้โปรแกรม MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ดำเนินการเก็บตัวอย่างทากเล็บมือนางสกุล *Parmarion* ภูมิภาคต่าง ๆ ตั้งแต่ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2564 จนถึงสิงหาคม 2565 (Figure 1) จากภาคเหนือที่ตำบลบ้านกลาง อำเภอสอง จังหวัดแพร่ (BSPR) จำนวน 22 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ ตำบลนาดอกคำ อำเภอนาด้วง จังหวัดเลย (NNLO) จำนวน 12 ตัวอย่าง ตำบลดงพญาเย็น อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (DPNS) จำนวน 1 ตัวอย่าง และสถานีวิจัยลำตะคอง ตำบลหนองสาหร่าย อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (PCNS) จำนวน 15 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกที่ตำบลด่านชุมพล อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด (DBTR) จำนวน 14 ตัวอย่าง ภาคตะวันตกที่ตำบลลิ่นถิ่น อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี (LTKC) จำนวน 6 ตัวอย่าง และภาคกลางได้แก่ ตำบลนาเกาะ อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ (LKPB) จำนวน 15 ตัวอย่าง เขื่อนขุนด่าน อำเภอเมือง จังหวัดนครนายก (KDNN) จำนวน 1 ตัวอย่าง และศูนย์วิจัยเกษตรที่สูงเพชรบูรณ์ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ (KKPB) จำนวน 9 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 95 ตัวอย่าง (Table 1)

จากการศึกษาลักษณะทางสัญฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ทากเล็บมือนางสกุล *Parmarion* spp. ในประเทศไทยพบว่าเป็นแบบรวมเพศหรือมีสองเพศในตัวเดียวกัน (hermaphrodite) แต่ไม่สามารถผสมพันธุ์กับตัวเองได้ อวัยวะสืบพันธุ์สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนได้แก่ 1) ส่วนของเพศผู้ ประกอบไปด้วย penis, epiphallus และ flagellum 2) ส่วนของเพศเมียประกอบไปด้วย Vagina, Gametolytic sac และ Oviduct 3) ส่วนของ Dart apparatus ประกอบไปด้วย Dart Sac และ Dart apparatus ซึ่งภายในบรรจุศรรักหรือ Dart Love มีลักษณะคล้ายลูกศรสีขาว มีความแข็ง ประกอบไปด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นหลัก ซึ่งส่วนของ Dart love พบความแปรผันเกิดขึ้นระหว่างชนิด (Figure 2) อวัยวะสืบพันธุ์ทั้งสามส่วนนี้จะมีช่องเปิดร่วมกันที่เรียกว่า Atrium โดยช่องดังกล่าวจะเปิดที่บริเวณส่วนหน้าของลำตัวบริเวณด้านขวาใกล้ปากของทากเล็บมือนาง

การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งยีน Cytochrome oxidase subunit I หรือยีน COI ความยาวประมาณ 650 คู่เบส ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเสร็จทั้งสิ้นจำนวน 20 ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ ตัวอย่างจากตำบลบ้านกลาง อำเภอสอง จังหวัดแพร่ จำนวน 5 ลำดับ ตำบลนาดอกคำ อำเภอนาด้วง จังหวัดเลย จำนวน 8 ลำดับ ตำบลนาเกาะ อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ จำนวน 6 ลำดับ และเขื่อนขุนด่าน อำเภอเมือง จังหวัดนครนายก จำนวน 1 ลำดับ (Figure 3)

ผลการคำนวนหาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างทากเมื่อเปรียบเทียบกันเป็นคู่ (Pairwise distances) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 20 ลำดับ เปรียบเทียบกับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน COI ของทากเล็บมือนางมาร์เทนส์จากฐานข้อมูล GenBank (Accession number: FJ481180) พบว่ามีตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ทากมาร์เทนส์มากที่สุดจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างจากเขื่อนขุนด่าน อำเภอเมือง จังหวัดนครนายก (KDNN1) และตัวอย่างจากตำบลนาดอกคำ อำเภอนาด้วง จังหวัดเลย (NNLO12) โดยมีค่าเท่ากับ 0.00000 ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวน่าจะเป็นทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ ในส่วนของตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ทากมาร์เทนส์มากที่สุด ได้แก่ตัวอย่างจากตำบลนาดอกคำ อำเภอนาด้วง จังหวัดเลย (NNLO4) มีค่า Pairwise distances เท่ากับ 0.04228 จากการคำนวนค่าเฉลี่ยของ

ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 21 ตัวอย่างลำดับ หรือค่า Overall mean distance มีค่าเท่ากับ 0.01874 (Table 2)

ผลการคำนวน Nucleotide substitution model หรือโมเดลการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับนิวคลีอไทด์ยีน COI ของทากเล็บมือนางจำนวน 21 ลำดับ พบว่าโมเดล GTR+G (General Time-Reversible model + Gamma distribution) เป็นโมเดลที่เหมาะสมมากที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างไฟโลเจเนติกทรี จากการสร้างไฟโลเจเนติกทรีด้วยวิธีการ Maximum likelihood (Bootstrap = 500 replicates) และ Bayesian inference (จำนวนเจเนอเรชั่น = 1,000,000) พบการจับกลุ่มของลำดับทางพันธุกรรมทากเล็บมือนางออกเป็นสองกลุ่มหรือสองเคลดอย่างชัดเจน (Figure 4, Figure 5) ประกอบไปด้วยเคลด A มีสมาชิกทากเล็บมือนางทั้งหมด 14 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างจากจังหวัดแพร่ 5 ตัวอย่าง (BSPR2 BSPR5 BSPR6 BSPR8 และ BSPR10) ตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบูรณ์ 6 ตัวอย่าง (LKPB1 LKPB2 LKPB3 LKPB4 LKPB5 และ LKPB6) และตัวอย่างจากจังหวัดเลย 3 ตัวอย่าง (NNLO3 NNLO4 และ NNLO5) ซึ่งกลุ่มดังกล่าวมีค่า Bootstrap support และค่า Bayesian posterior probability เท่ากับ 100 และ 0.97 ตามลำดับ สำหรับเคลด B มีสมาชิกทากเล็บมือนางทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วยตัวอย่างจากจังหวัดนครนายก 1 ตัวอย่าง (KDNN01) และตัวอย่างจากจังหวัดเลย 5 ตัวอย่าง (NNLO1 NNLO8 NNLO10 NNLO11 และ NNLO12) ซึ่งเคลดดังกล่าวนี้มีการจับกลุ่มร่วมกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน COI ของทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ *Parmarion martensi* จากฐานข้อมูล GenBank โดยมีค่า Bootstrap support และค่า Bayesian posterior probability เท่ากับ 99 และ 0.99 ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทากเล็บมือนางทั้ง 21 ลำดับในไฟโลเจเนติกทรีมีการจับกลุ่มรวมเป็นกลุ่มก้อนเดียวกันหรือเป็นแบบ Monophyletic group (มีค่า Bootstrap support ที่กิ่งเท่ากับ 100) แสดงให้เห็นถึงการมีบรรพบุรุษร่วมกันของทากเล็บมือนางทั้งหมด และได้แบ่งแยกออกจากลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน COI ของหอยทากชนิด *Macrochlamys* sp (Accession number: MT906154), ชนิด *Hemiplecta thailandica* (Accession number: MT654615), และชนิด *Sarika pellosa* (Accession number: MT894112) ซึ่งเป็น Out group เมื่อพิจารณาความยาวกิ่งของไฟโลเจเนติกทรีวิธีการ Maximum likelihood ระหว่างเคลดทั้งสอง พบว่าเคลด A และเคลด B มีความยาวกิ่งเท่ากับ 0.015 และ 0.017 ตามลำดับเมื่อทำการวัดจากจุดที่เป็นบรรพบุรุษร่วมกันของทั้งสองเคลด ดังนั้นสรุปได้ว่าระยะห่างทางพันธุกรรมยีน COI ของทากเล็บมือนางทั้งสองเคลดมีค่าเท่ากับ 0.032 หรือ 3.2% เมื่อดำเนินการเปรียบเทียบค่าดังกล่าวความแปรผันทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน (Intraspecific genetic distance) ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในอาณาจักรย่อย Eumetazoan ส่วนของยีน COI ในไมโทคอนเดรีย ได้แก่ *Dinogamasus saengdaoae* (Insecta; Hymenoptera) มีค่าระหว่าง 0.2–0.9% (Attasopa *et* al., 2021), *Rissoella* sp. (Mollusca, Gastropod) มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 2.32% (Buršic *et* al., 2021), *Mytilus Galloprovincialis* (Mollusca, Bivalve) มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 2.72% (Buršic *et* al., 2021), *Thenus uinmaculatus* (Crustacean; Decapoda) มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 2.68% (Wongruengpibool, 2013), *Thenus orientalis* (Crustacean; Decapoda) มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 1.8% (Iamsuwansuk, 2011), และ *Melanoconion* sp. (Insecta; Diptera) มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 3% (เกศรินทร์และคณะ 2561), ในส่วนของยีน Cytochrome B ในไมโทคอนเดรีย ได้แก่ *Rattus argentiventer* (Mammalia, Rodentia) มีค่าระหว่าง 0.001-0.02% (วิชาญและคณะ, 2558) และในส่วนของยีน 12S rDNA ในไมโทคอนเดรีย ได้แก่ *Thenus uinmaculatus* (Crustacean; Decapoda) มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 2.91% (Wongruengpibool, 2013) พบว่าทากเล็บมือนาง *Parmarion* spp. มีแนวโน้มที่

ความแปรผันทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกันของหากสูงกว่าความแปรผันทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกันสูงสุดของสัตว์ชนิดอื่นที่อยู่ในอาณาจักรย่อย Eumetazoa ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 3 นอกจากนี้งานวิจัยของ Buršic เมื่อปี 2021 รายงานว่าสัตว์ในไฟลัม Molluska ในทะเลที่มีขอบเขตที่แบ่งระหว่างค่าความแปรผันทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกัน (intraspecific genetic distance) และความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างชนิด (interspecific genetic distance) ของยีน COI ดังกล่าวไม่เกิน 3% (Buršic *et* al., 2021; Meyer and Paulay, 2005; Audzijonyte *et* al., 2012; Breure, 2016; Zhang, 2018) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่หากเล็บมือนางที่อยู่ในเคลด A อาจเป็นคนละชนิดกับหากเล็บมือนางมาร์เทนส์ ทั้งนี้เพื่อตัดสินสมมุติฐานดังกล่าวจึงจำเป็นต้องศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และศึกษาลักษณะทางสัญฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์จากหากเล็บมือนางตัวอย่างอื่นเพิ่มเติมต่อไปในปี พ.ศ. 2566

สรุปผลการทดลอง

ดำเนินการเก็บตัวอย่างหากเล็บมือนางจากจังหวัดต่าง ๆ ในภูมิภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ตะวันออก ตะวันตก และภาคกลาง ทั้งหมด 95 ตัวอย่าง ทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งยีน Cytochrome oxidase subunit I หรือ COI ได้สำเร็จทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง หาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Pairwise distances) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 20 ลำดับ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของหากเล็บมือนางมาร์เทนส์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.00000 ถึง 0.04228 และมีค่าเฉลี่ยหรือค่า Overall mean distance เท่ากับ 0.01874 จากการสร้างไฟโลเจเนติกทรีด้วยวิธีการ Maximum likelihood และวิธีการ Bayesian inference พบว่าเกิดการจับกลุ่มของตัวอย่างหากเล็บมือนางออกเป็นสองกลุ่ม ประกอบไปด้วยเคลด A ซึ่งมีสมาชิกทั้งหมด 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเคลด B ทั้งหมด 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของหากเล็บมือนางมาร์เทนส์จาก GenBank ได้ปรากฏขึ้นมาในเคลด B ทำให้มีสมาชิกภายในเคลดรวมเป็น 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้มีหากเล็บมือนางอย่างน้อย 2 ตัวอย่างที่น่าจะเป็นหากเล็บมือนางมาร์เทนส์ ได้แก่ ตัวอย่างจากจังหวัดเลย (NNLO12) และตัวอย่างจากนครนายก (KDNN01) เนื่องจากมีค่า Pairwise distance ของยีน COI เปรียบเทียบกับหากเล็บมือนางมาร์เทนส์ เท่ากับ 0.00000 เมื่อพิจารณาความยาวกิ่งของทั้งสองเคลดพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.032 หรือมีความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic divergent) หรือ 3.2% เป็นความเป็นไปได้ว่าหากเล็บมือนางจากทั้งสองเคลดอาจเป็นคนละชนิดกัน งานวิจัยนี้ยังไม่สิ้นสุด จึงต้องดำเนินการศึกษาต่อในปี พ.ศ. 2566

เอกสารอ้างอิง

เกศรินทร ทิพย์เพ็ชร, ณรงค จัตุรัส, และนพวรรณ บุญชู. 2561. ดีเอ็นเอบาร์โค๊ดสำหรับการระบุชนิดแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทย DNA Barcodes for Identification of Medically-Important Insects of Thailand. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 26 ฉบับที่ 2.

ปิยาณี หนูกาฬ ดาราพร รินทะรักษ์ เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ 2556. ศึกษาการป้องกันกำจัดหาก *Parmarion siamensis* ในสวนกล้วยไม้. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 1:315-319.

ปราสาททอง พรหมเกิด ปิยาณี หนูกาฬ ดาราพร รินทะรักษ์ สมเกียรติ กล้าแข็ง ทรงทัพ แก้วตา. ความหลากชนิดและประชากร

ของหอยทากและทากในโรงเรือนปลูกพืช รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 1:1822-1828.

วิชาญ วรรธนะไกวัล สมเกียรติ กล้าแข็ง ปราสาททอง พรหมเกิด ทรงทัพ แก้วตา. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่, *Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916) ที่พบในประเทศไทย. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2558 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 3:2178-2211.

Audzijonyte A., Krylova E. M., Sahling H., Vrijenhoek R. C., 2012. Molecular Taxonomy Reveals Broad Trans-Oceanic Distributions and High Species Diversity of Deep-Sea Clams (Bivalvia: Vesicomyidae: Pliocardiinae) in Chemosynthetic Environments. Syst. Biodivers., 10, 403–415.

Attasopa K., Ferrari R. R., Chantawannakul P., Banzinger H. 2021. Morphological description, DNA barcodes and phylogenetic placement of a new mite species: *Dinogamasus saengdaoae* sp. nov. (Mesostigmata: Laelapidae) found in the acarinarium of carpenter bees in Thailand. Systematic & Applied Acarology 26(2): 474–495.

Bingpeng X, Heshan L, Zhilan Z, Chunguang W, Yanguo W, JianjunW. 2018. DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. PLoS ONE 13(6): e0198109.

Brodie, G. & Barker, G.M. 2012. *Parmarion martensi* Simroth, 1893. Family Ariophantidae. 'USP Introduced Land Snails of the Fiji Islands Fact Sheet Series', No. 1.

Breure A. S. H. 2016. Caribbean *Bulimulus* Revisited: Physical Moves and Molecular Traces (Mollusca, Gastropoda, Bulimulidae). PeerJ, 4, e1836.

Burši´c M., Ivesa L., Jaklin A., Pijevac M. A., Ku˘cini´c M., Štifani´c M., Neal L., Mad¯aric B. B. 2021. DNA Barcoding of Marine Mollusks Associated with *Corallina officinalis* Turfs in Southern Istria (Adriatic Sea). Diversity. 13. 196.

Cowie, R. H. 2018. *Parmarion martensi* Simroth, 1893 (Gastropoda: Ariophantidae), an intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* (rat lungworm), on Maui Bishop Museum occasional papers. 123(2018): 7-10.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3(1994): 294-297.

Goldman N. 1990. Maximum likelihood inference of phylogenetic trees, with special reference to a Poisson process model of DNA substitution and to parsimony analyses. Syst. Zool., 39(4):345-361.

Huelsenbeck, J.P., and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17:754-755.

Iamsuwansuk A. 2011. Genetic diversity of shovel-nosed lobster of the Genus *Thenus* in Thailand using cytochrome C oxidase subunit I gene. Thesis for the Degree of Master of Science Program in Zoology. Department of Biology Faculty of Science Chulalongkorn University.

Tamura K., Stecher G., and Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. Molecular Biology and Evolution 38:3022-3027.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. 2007. Bioinformatics 23: 2947-2948.

Liu J., Zhang H. 2018. DNA Barcoding for Species Identification in Deep-Sea Clams (Mollusca: Bivalvia: Vesicomyidae). Mitochondrial DNA Part. A 29, 1165–1173.

Meyer, C.P.; Paulay, G. 2005. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. PLoS Biol., 3, e422.

Plant Protection Research and Development Office. 2559. List of insects, mite and other zoological pests of economic plant in Thailand. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพ 1: 2-188.

Ronquist F., Huelsenbeck J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 19(12):1572-4.

Wongruengpibool S. 2013. Genetic diversity of purple-legged shovel-nosed lobster *Thenus unimaculatus* in Thailand by Mitochondrial gene analysis. Thesis for the Degree of Master of Science Program in Zoology. Department of Biology Faculty of Science Chulalongkorn University.

Yue L., Liu X., Hayashi F., Wang M., Yang D. 2015. Molecular systematics of the fishfly genus Anachauliodes Kimmins, 1954 (Megaloptera: Corydalidae: Chauliodinae). Zootaxa 3941(1): 091–103.

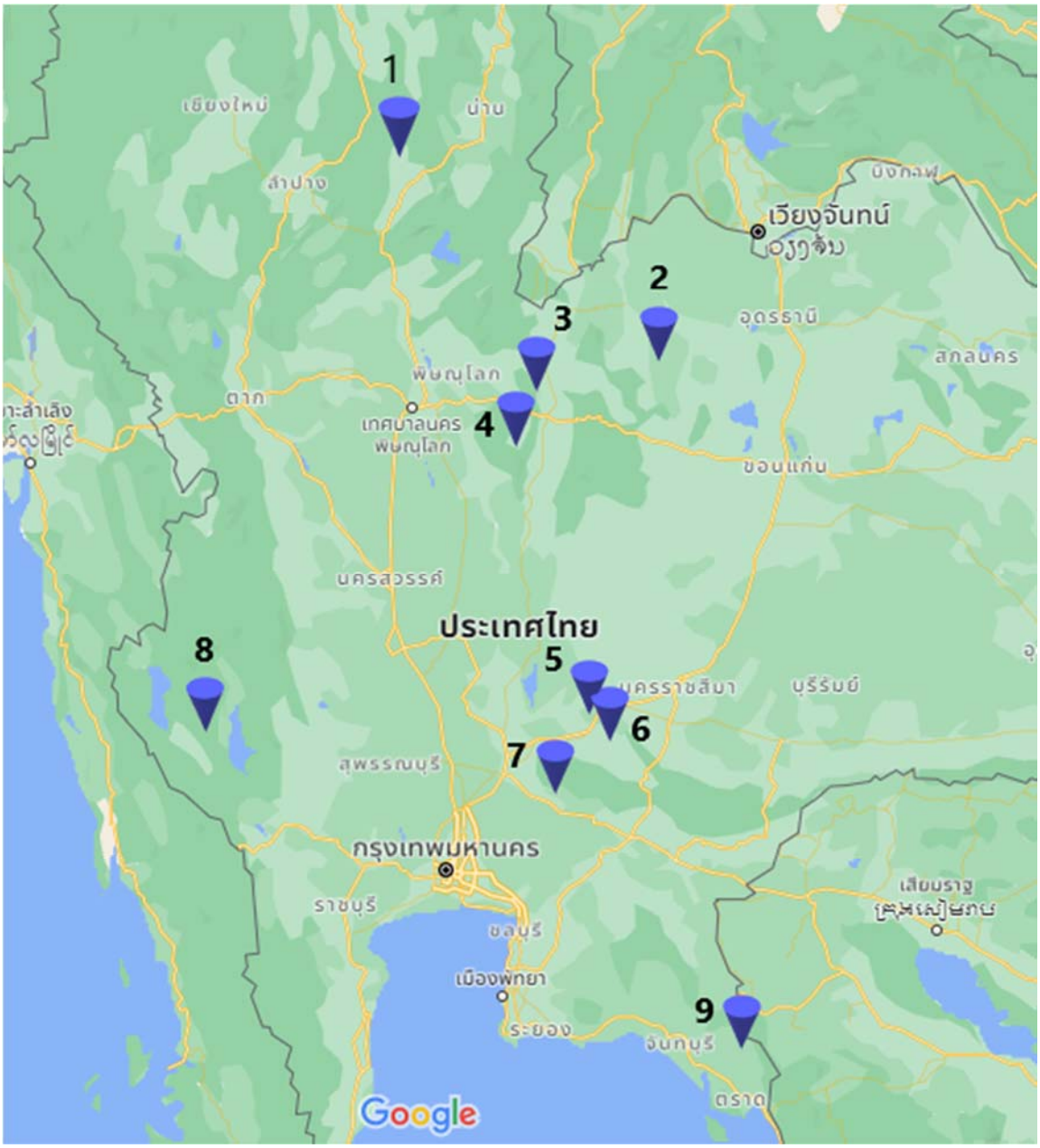

Figure 1 The figure show specimens of semi-slug in genus *Parmarion* collecting sites on nine locations.

ลำดับที่	สถานที่	พิกัด	ภูมิภาค	จำนวน	ลักษณะสถานที่
1	ต.บ้านกลาง อ.สอง จ.แพร่	18°28'57.1"N 100°10'27.2"E	เหนือ	22	สวนกล้วยติดที่อยู่อาศัย
2	ต.นาดอกคำ อ.นาด้วง จ.เลย	17°32'26.2"N 101°58'30.6"E	ตะวันออกเฉียงเหนือ	12	โรงเรือนเพาะเห็ดขอน
3	ต.นาเกาะ อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์	16°52'57.5"N 101°11'11.7"E	กลาง	15	สวนป่าติดที่อยู่อาศัย
4	ศูนย์วิจัยเกษตรที่สูงเพชรบูรณ์ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์	16°52'57.5"N 101°11'11.7"E	กลาง	9	สวนป่าติดบ้านพักรับรอง
5	ต.ดงพญาเย็น อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	14°34'57.3"N 101°15'11.8"E	ตะวันออกเฉียงเหนือ	1	สวนกล้วย
6	สถานีวิจัยลำตะคอง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	14°46'24.7"N 101°31'07.3"E	ตะวันออกเฉียงเหนือ	15	ต้นกล้วยบริเวณโรงเรือนเพาะชำ
7	เขื่อนขุนด่าน อ.เมือง จ.นครนายก	14°18'12.1"N 101°18'40.5"E	กลาง	1	สวนกล้วยติดที่อยู่อาศัย
8	ต.ลิ่นถิ่น อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	14°33'36.8"N 98°45'20.7"E	ตะวันตก	6	สวนกล้วย
9	ต.ด่านชุมพล อ.บ่อไร่ จ.ตราด	12°27'03.0"N 102°38'27.5"E	ตะวันออก	14	สวนป่าติดที่อยู่อาศัย
			รวม	95	

Table 1 This table show data concerning ordinal location (form figure 1), GPS coordinates, locations, amount and area of each specimen collecting sites.

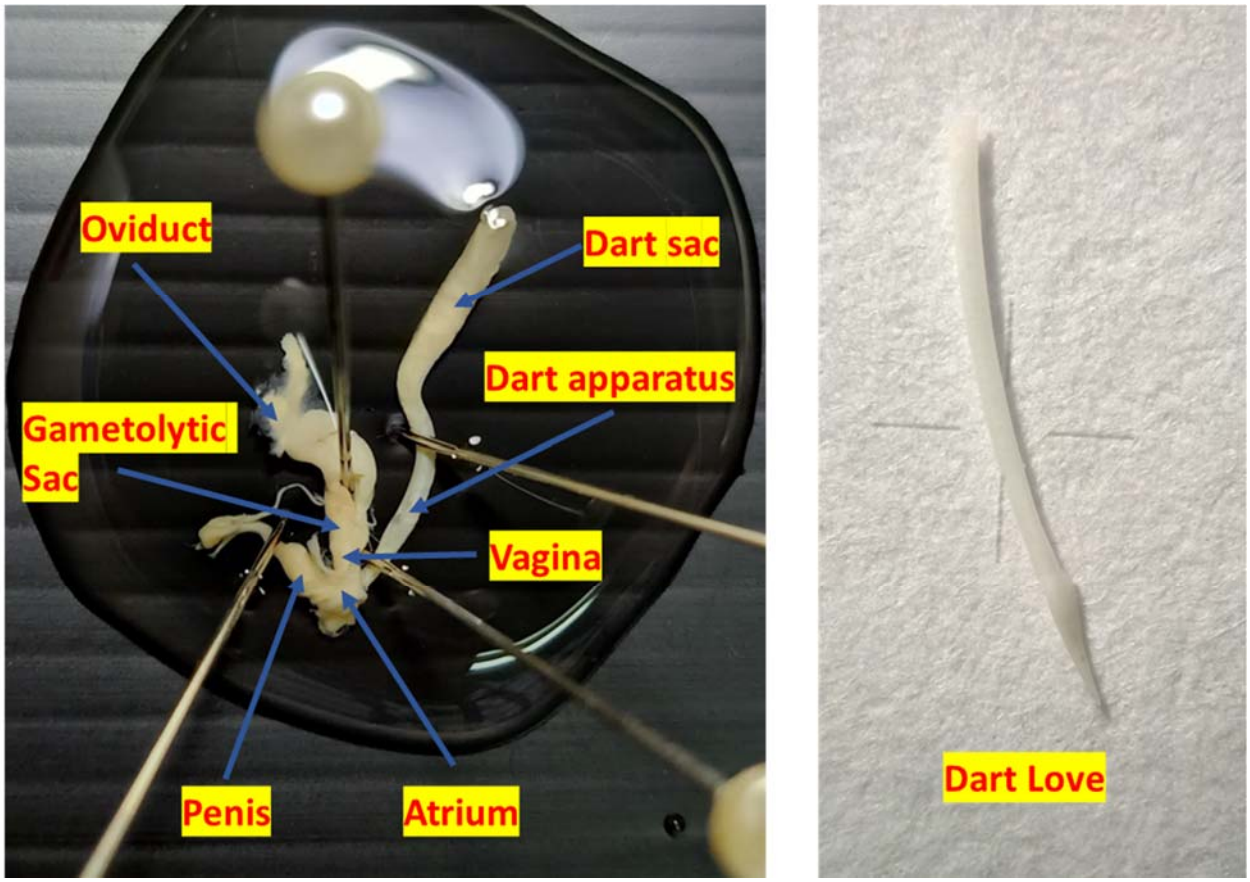

Figure 2 These pictures present semi-slug's genitalia specimen from Ban Klang Subdistrict, Song District, Phrae Province (left) and Dart love specimen (Right)

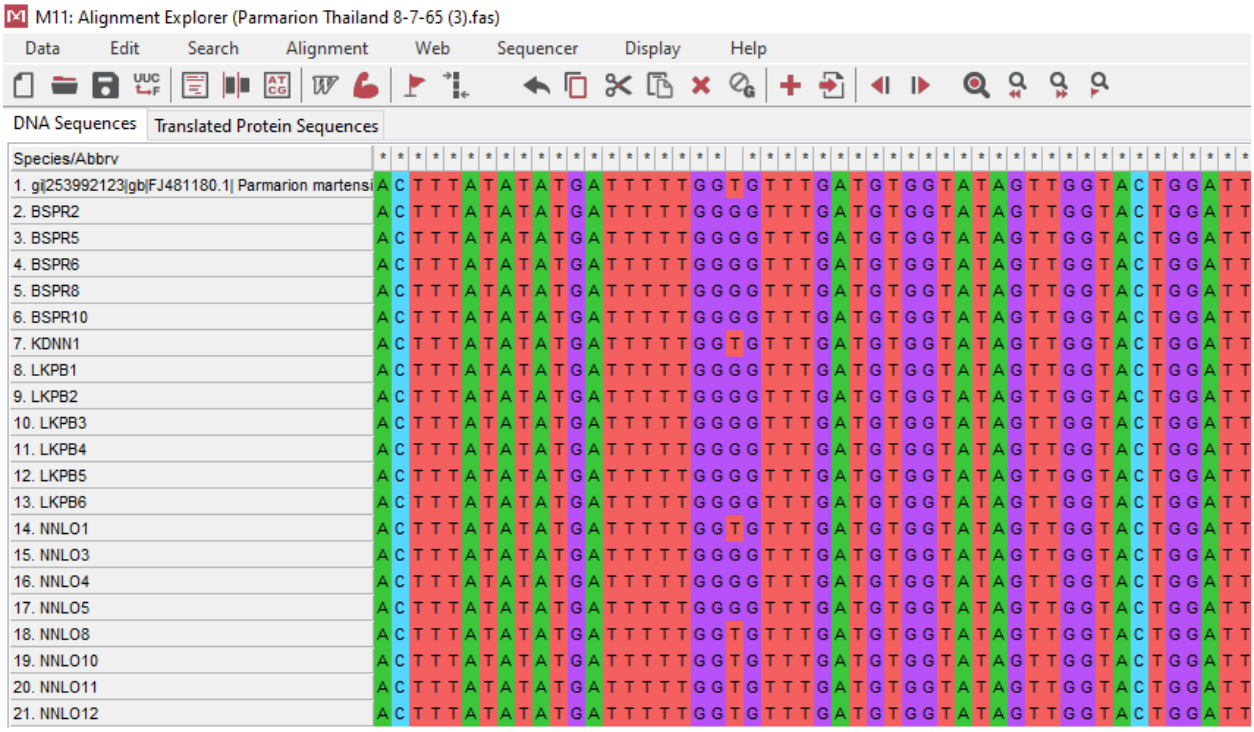

Figure 3 This figure represent 650 base-pairs of Cytochrome C oxidase subunit I or COI gene alignment (21 *Parmarion* sequences) showed on MEGA11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11) software.

Location and Code Name	Pairwise distances	Percentage (%)
ต.บ้านกลาง อ.สอง จ.แพร่, BSPR2	0.03372	3.372
ต.บ้านกลาง อ.สอง จ.แพร่, BSPR5	0.02859	2.859
ต.บ้านกลาง อ.สอง จ.แพร่, BSPR6	0.02859	2.859
ต.บ้านกลาง อ.สอง จ.แพร่, BSPR8	0.03032	3.032
ต.บ้านกลาง อ.สอง จ.แพร่, BSPR10	0.02859	2.859
เขื่อนขุนด่าน อ.เมือง จ.นครนายก, KDNN1	0.00000	0.000
ต.นาเกาะ อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์, LKPB1	0.02859	2.859
ต.นาเกาะ อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์, LKPB2	0.02859	2.859
ต.นาเกาะ อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์, LKPB3	0.03202	3.202
ต.นาเกาะ อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์, LKPB4	0.02859	2.859
ต.นาเกาะ อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์, LKPB5	0.03028	3.028
ต.นาเกาะ อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์, LKPB6	0.02859	2.859
ต.นาดอกคำ อ.นาด้วง จ.เลย, NNLO1	0.00164	0.164
ต.นาดอกคำ อ.นาด้วง จ.เลย, NNLO3	0.03032	3.032
ต.นาดอกคำ อ.นาด้วง จ.เลย, NNLO4	0.04228	4.228
ต.นาดอกคำ อ.นาด้วง จ.เลย, NNLO5	0.03032	3.032
ต.นาดอกคำ อ.นาด้วง จ.เลย, NNLO8	0.00329	0.329
ต.นาดอกคำ อ.นาด้วง จ.เลย, NNLO10	0.01831	1.831
ต.นาดอกคำ อ.นาด้วง จ.เลย, NNLO11	0.00825	0.825
ต.นาดอกคำ อ.นาด้วง จ.เลย, NNLO12	0.00000	0.000

Table 2 This table show locations, code names, pairwise distances and percentage distance of each semi-slug genus *Parmarion* specimens compared with *Parmarion martensi* COI nucleotide sequence from GenBank.

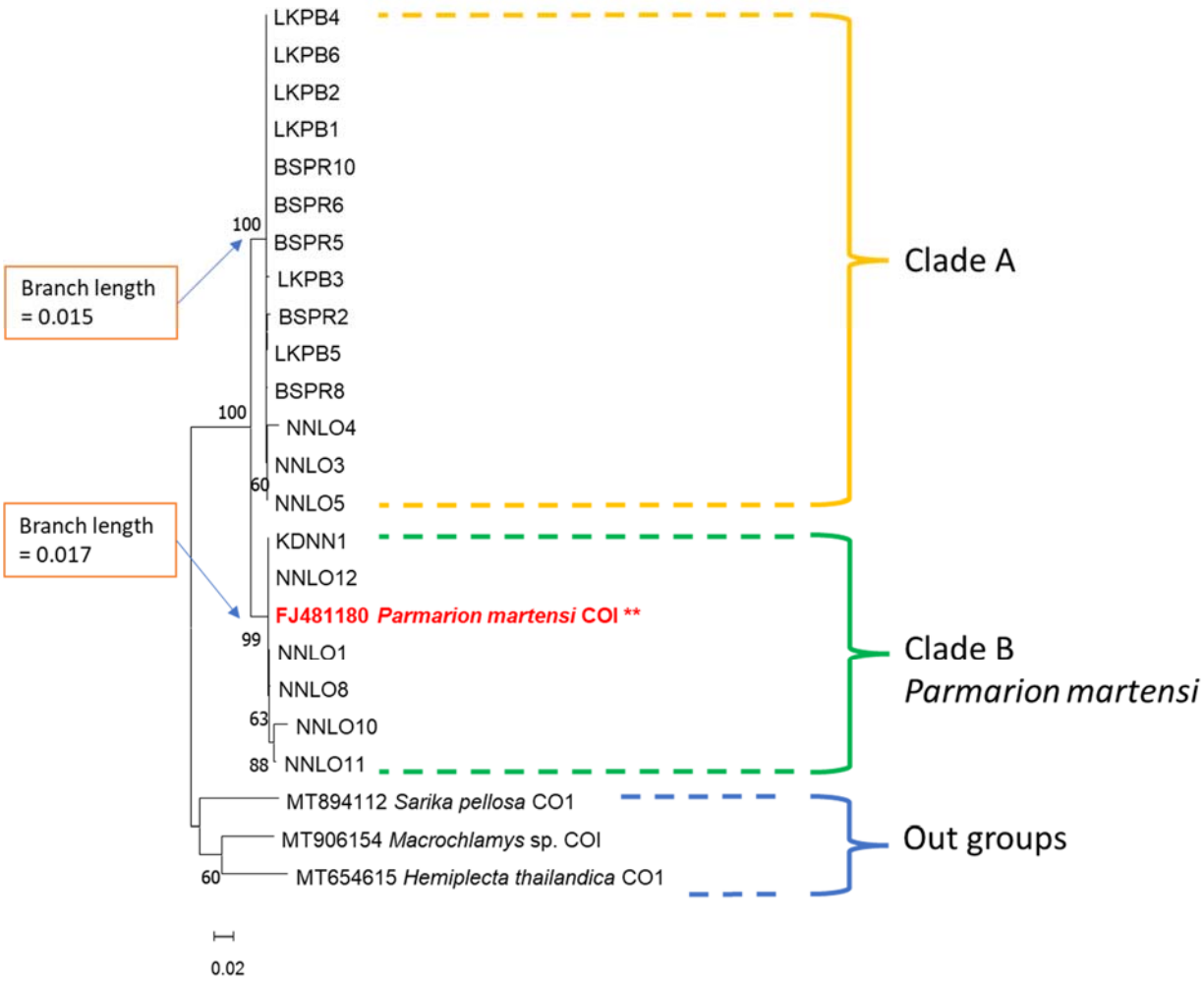

Figure 4 Maximum likelihood tree of Cytochrome C oxidase subunit I sequence alignment of 20 *Parmarion* specimens from Thailand and 1 sequence of *Parmarion martensi* from Taiwan. The numbers above branches indicated the percentage of bootstrap values (with 500 replicates)

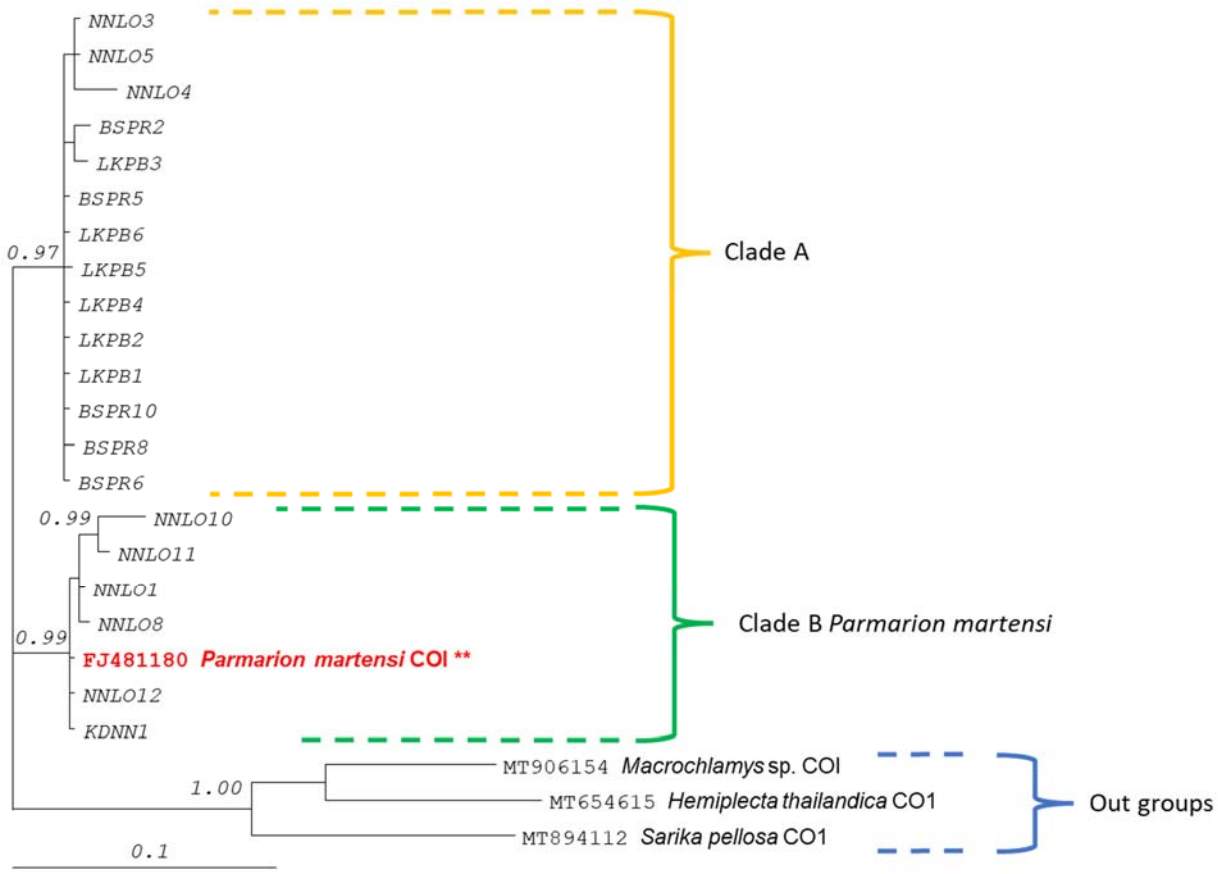

Figure 5 Bayesian tree inferred from 650 base-pairs COI data matrix of 20 *Parmarion* specimens from Thailand and 1 sequence of *Parmarion martensi* from Taiwan. The number along branches indicated the posterior probabilities of the nodes.

Animal (Classification)	Mitochondrial Genes	Primers	Intraspecific Genetic distance	References
Thenus orientalis (Crustacean: Decapod)	COI	LCO1490, HCO2198	Maximum = 1.8 % Average = 0.5 %	Iamsuwansuk, 2011
Thenus uinmaculatus (Crustacean: Decapod)	COI	LCO1490, HCO2198	Maximum = 2.68 % Average = 0.59 %	Wongruengpibool, 2013
Thenus uinmaculatus (Crustacean: Decapod)	12S rDNA	12SCRF, 12SCRR	Maximum = 2.91 % Average = 0.66 %	Wongruengpibool, 2013
Melanoconion sp. (Insecta: Diptera)	COI	LCO1490, HCO2198	Maximum ≈ 3 %	เกศรินทร์และคณะ, 2561
Anachauliodes sinensis (Insecta: Megaloptera)	COI	C1-J-21835, TL2-N-3014	Range = 0.0 – 2.6 %	Yue *et* al., 2015
Dinogamasus saengdaoae (Insecta: Hymenoptera)	COI	LCO1490, HCO2198	Range = 0.2 – 0.9 %	Attasopa *et* al., 2021
Rissoella sp. (Mollusca: Gastropod)	COI	LCO1490, HCO2198	Maximum = 2.32 %	Buršic *et* al., 2021
Cerithium traillii (Mollusca: Gastropod)	COI	LCO1490, HCO2198	Maximum = 2.6 % Average = 0.5 %	Ran *et* al., 2020
Mytilus Galloprovincialis (Mollusca: Bivalve)	COI	LCO1490, HCO2198	Maximum = 2.72 %	Buršic *et* al., 2021
Fish species in Taiwan Strait	COI	FishF1, FishF2, FishR1, FishR2	Average = 0.21 %	Bingpeng *et* al., 2018
Rattus argentiventer (Mammalia: Rodent)	Cytochrome b	R.a outer F new, R.a outer R new	Range = 0.1 – 2 %	วิชาญและคณะ, 2558

Table 3 This table show maximum, average, or range of intraspecific genetic distance values (3 mitochondrial genes) of animal in subkingdom Eumetazoa.