

การวิเคราะห์ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาและการศึกษาอัลโลไซม์ของหอยทราขสกุล *Mekongia*

Crosse & Fischer, 1876 ในประเทศไทย



นายวชิร ศรีคุ้ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา

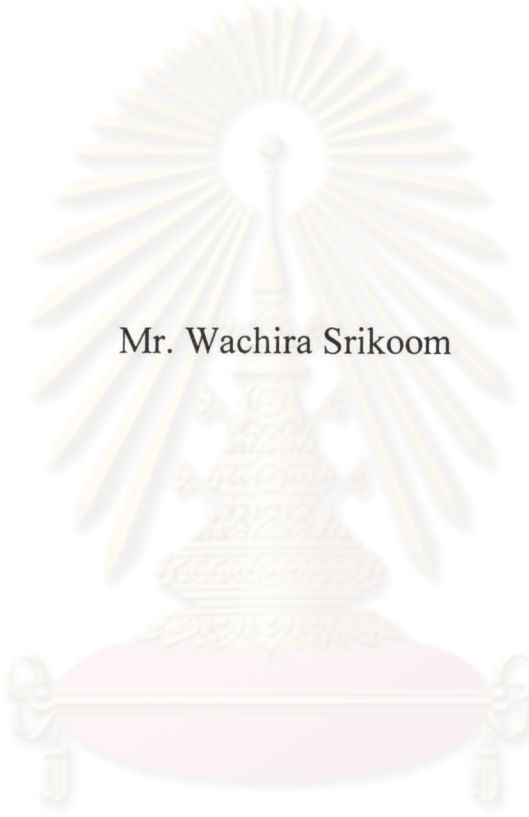
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6558-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MORPHOLOGICAL VARIATION ANALYSIS AND ALLOZYME
STUDY OF VIVIPARID SNAIL GENUS *Mekongia* Crosse & Fischer, 1876
IN THAILAND



Mr. Wachira Srikoom

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Zoology

Department of Biology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004
ISBN 974-17-6558-4

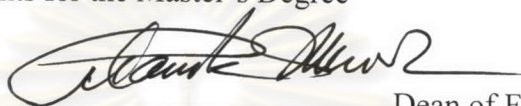
Thesis Title MORPHOLOGICAL VARIATION ANALYSIS AND
ALLOZYME STUDY OF VIVIPARID SNAIL GENUS
Mekongia Crosse & Fischer, 1876 IN THAILAND

By Mr. Wachira Srikoom

Field of Study Zoology

Thesis Advisor Associate Professor Somsak Panha, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

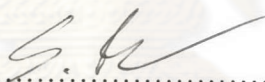


.....Dean of Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE



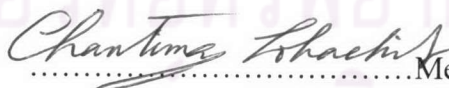
.....Chairman
(Associate Professor Kingkaew Wattanasirmit, Ph.D.)



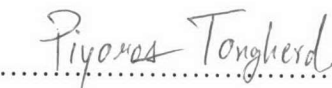
.....Thesis Advisor
(Associate Professor Somsak Panha, Ph.D.)



.....Member
(Associate Professor Takahiro Asami, Ph.D.)



.....Member
(Assistant Professor Chantima Lohachit, Ph.D.)



.....Member
(Piyoros Tongkerd, Ph.D.)

วชิร ศรีคุ้ม : การวิเคราะห์ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาและการศึกษาอัลโลไซม์ของหอย
ทรายสกุล *Mekongia* Crosse & Fischer, 1876 ในประเทศไทย. MORPHOLOGICAL
VARIATION ANALYSIS AND ALLOZYME STUDY OF VIVIPARID SNAIL GENUS
Mekongia Crosse & Fischer, 1876 IN THAILAND. อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ. ดร. สมศักดิ์
ปัญหา จำนวนหน้า 87 ISBN 974-17-6558-4

หอยทรายสกุล *Mekongia* พบอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืดทั่วไป เช่น แม่น้ำ หรือสาขาน้ำของแม่น้ำ และเป็นที่ยอมรับโดย
อย่างกว้างขวาง พบอยู่แทบทุกภาคของประเทศไทย ยกเว้นภาคใต้ หอยทรายสกุลนี้ จัดอยู่ใน อันดับ Prosobranchia วงศ์
หอยขม Viviparidae บางชนิดเป็นพาหะกึ่งกลางของพยาธิ อาทิ พยาธิใบไม้ลำไส้ ก่อให้เกิดโรคทั้งมนุษย์และสัตว์ การศึกษา
ครั้งนี้ ทำการศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยา โดยเปรียบเทียบลักษณะของเปลือก อวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของหอยแต่
ละสปีชีส์ และศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมโดยการศึกษาอัลโลไซม์ จากกลุ่มตัวอย่างหอยทั้งหมด 14 บริเวณทั่วประเทศ
ไทย

ผลจากการศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยา จากการวัดวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของเปลือกด้วยตัวแปร 14
ลักษณะ (shell height; shell width, aperture height, aperture width, body whorl width, spire height, penultimate
whorl height, shell height/shell width, shell height / spire height, shell height / penultimate whorl height, shell width
/ aperture width, aperture height / aperture width, aperture width / spire height และ body whorl width / aperture
width) วิเคราะห์ความแตกต่างของเปลือกโดยสถิติ Canonical Discriminant Analysis พบว่าลักษณะของเปลือกสามารถใช้
จำแนกหอยทรายจาก 14 กลุ่มตัวอย่างออกเป็น 8 กลุ่มเป็นไปตามการจัดจำแนกด้วยเปลือก นอกจากนี้จากการศึกษาหอย
ชนิด *M. swainsoni braueri* พบความแตกต่างของขนาดเปลือกระหว่างเพศผู้และเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยที่
เปลือกเพศเมียใหญ่กว่าเพศผู้

ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างระดับสปีชีส์ และระดับซัพสปี
ชีส์ ของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และพบว่าหอยทรายมีลักษณะแยกเพศกันอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังตรวจพบไรหอย *Unionicola*
sp. บริเวณเหงือกหอยทรายอีกด้วย

ผลการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรม โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสของเอ็นไซม์ 9 ชนิด ได้แก่ esterase, glucose-6-
phosphate isomerase, malate dehydrogenase, mannose-6-phosphate isomerase, peptidase (glycyl-L-leucine และ
lucyl-glycyl-glycine), 6-phosphogluconate dehydrogenase, phosphoglucomutase และ sorbitol dehydrogenase
ผลจากการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมตามวิธีของ Nei (1978) พบว่าค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับสปี
ชีส์อยู่ในช่วง 0.071 ถึง 1.125 และระดับซัพสปีชีส์อยู่ในช่วง 0.089 ถึง 1.125 ค่าความแตกต่างของพันธุกรรมของ *M.*
sphaericula spiralis กับซัพสปีชีส์อื่น

ผลการศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยาและทางพันธุกรรมทำให้สามารถเสนอการปรับปรุงอนุกรมวิธานของ
หอยสกุลนี้ อาจปรับปรุงจัดจำแนกได้เป็น *M. pongensis*, *M. lamarcki*, *M. spiralis*, *M. swainsoni swainsoni*, *M.*
swainsoni braueri, *M. swainsoni kmeriana*, *M. sphaericula sphaericula*, and *M. sphaericula extensa*.

ภาควิชา.....ชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....สัตววิทยา.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2547.....

##4572464023 MAJOR ZOOLOGY

KEY WORDS *Mekongia* / ALLOZYME / GENETIC DISTANCE

WACHIRA SRIKOOM : MORPHOLOGICAL VARIATION ANALYSIS AND ALLOZYME STUDY OF VIVIPARID SNAIL GENUS *Mekongia* Crosse & Fischer, 1876 IN THAILAND. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMSAK PANHA, Ph.D., 87 pp. ISBN 974-17-6558-4

The viviparid snail genus *Mekongia* Crosse & Fischer, 1876 is classified in order Mesogastropoda family Viviparidae. The snail is widely consumed in Thailand and neighboring countries, and also plays important roles in medical and veterinary science. It acts as intermediate hosts of many parasitic worms such as flukes. Snail usually lives on the bottom of fresh water habitat such as river, canals, and streams. In this study, shell morphological variations, reproductive system and allozyme genetic variation were analysed.

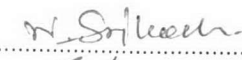
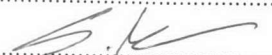
Morphological variation revealed that shell height ranged from 10-30 mm to more than 30 mm in larger size, shell dextral with corneous operculum. The shell is subglobose, ovate-conic and elongate. Fourteen variables of shell measurements were used to discriminate the group of snails. The results from Canonical Discriminant Analysis showing the effective variables with order by size of correlation within function were shell height; shell width, aperture height, aperture width, body whorl width, spire height, penultimate whorl height, shell height/shell width, shell height /spire height, shell height / penultimate whorl height, shell width / aperture width, aperture height / aperture width, aperture width /spire height, and body whorl width / aperture width. The results indicated that measurement characters of shell measurement can be divided snails into eight groups congruent to Brandt's (1974) classification. Moreover, the snails, *M. swainsoni braueri* revealed sexual size dimorphism, which shell of female larger than male.

The comparative reproductive system revealed no significant differences between these organ systems in all taxa and population. Snail is dioecious, which sexes are separate and, in male the right tentacle is enlarged and it used for sperm transfer to the male. In addition, on dissecting snails for reproductive system study, water mite species, *Unionicola* sp. were found on gill surfaces.

Nine enzymatic proteins used to detect genetic variations were esterase, glucose-6-phosphate isomerase, malate dehydrogenase, mannose-6-phosphate isomerase, peptidase (glycyl-L-lucine and luecyl-glycyl-glycine), 6-phosphogluconate dehydrogenase, phosphoglucomutase, and sorbitol dehydrogenase. Based on the data obtained for 13 allozyme loci, the allele frequencies, genetic variability, and *F*-statistic values were determined. The genetic diversity and genetic differences were estimated from allele frequency. The mean heterozygosities, mean allele number per locus, and the percentage of loci polymorphic were 0.281, 1.30, and 9.8, respectively.

According to the Nei's genetic distances, indices of pairwise comparison between two populations in this study ranged from 0.010 to 1.125. The genetic distances among species ranged from 0.071 to 1.125 and among subspecies 0.089 to 1.125. Genetic distance of *M. sphaericula spiralis* comprised with other subspecies ranged from 0.907 1.125. These values are much greater than conspecific level. This is indicated the different identify of *M. sphaericula spiralis* from the recognized species.

As from the above results, I have proposed the new classification of *Mekongia* as follows; *M. pongensis*, *M. lamarcki*, *M. spiralis*, *M. swainsoni swainsoni*, *M. swainsoni braueri*, *M. swainsoni kmeriana*, *M. sphaericula sphaericula*, and *M. sphaericula extensa*.

Department.....Biology.....Student's signature.....
 Field of study.....Zoology.....Advisor's signature.....
 Academic year.....2004.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincere gratitude to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Somsak Panha, for his care, encouragement, and invaluable advice throughout my study.

I would like to express my grateful thank to Professor Dr. Siriwat Wongsiri, chairman of the thesis committee. I also would like to express my appreciation to Associate Professor Dr. Chantima Lohachit, Assistance Professor Dr. Takahiro Asami, and Dr. Piyoros Tongkerd, members of thesis committee for kind guidance in many ways.

I would like to express my special thanks to Dr. Chirasak Sucharit, Mr. Marut Fuangarworn, and Mr. Grisada Deein for their help in collecting materials used in this study.

I must thank many other persons including Dr. Chirasak Sucharit, Mrs. Chanidaporn Tumpeesuwan, Miss Bang-on Kong-Im, and Miss Pongpun Prasankok at Mollusc Research Unit for their assistances in many ways and their friendship.

This work was supported from Biodiversity Research and Training Program (BRT T_147002).

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my family and Miss Orawan Phuphisut for their love, encouragement, and supports.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

| | Page |
|--------------------------------------|-------------|
| Thai abstract..... | iv |
| English abstract:..... | v |
| Acknowledgements..... | vi |
| Contents..... | vii |
| List of Tables..... | viii |
| List of Figures..... | ix |
| Chapter 1 Introduction..... | 1 |
| Chapter 2 Literature Review..... | 9 |
| Chapter 3 Materials and Methods..... | 19 |
| Chapter 4 Results..... | 30 |
| Chapter 5 Discussion..... | 60 |
| References..... | 68 |
| Appendix..... | 75 |
| Appendix I..... | 76 |
| Biography..... | 87 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

| Table | Page |
|---|-------------|
| 1-1 Taxonomic position of the genus <i>Mekongia</i> in Thailand.... | 6 |
| 3-1 Gel and electrode chamber buffers..... | 25 |
| 3-2 Buffer combinations giving optimal resolution of enzyme in <i>Mekongia</i> | 25 |
| 3-3 Stock solution for preparing stains and buffers..... | 28 |
| 3-4 Solution of preparing protein stains and buffers..... | 29 |
| 4-1 Classification results of nine groups of <i>Mekongia</i> | 33 |
| 4-2 The 14 populations of <i>Mekongia</i> snails collected from fourteen localities and employed for electrophoretic studies..... | 51 |
| 4-3 Allele frequencies at 13 polymorphic loci in fourteen samples of <i>Mekongia</i> from Thailand..... | 54 |
| 4-4 Chi-square values for heterozygous loci in <i>Mekongia</i> | 55 |
| 4-5 Index of genetic variability at 13 loci in all population..... | 56 |
| 4-6 Unbiased genetic distance (Nei, 1978) and genetic similarity (Rogers, 1972)..... | 57 |
| 4-7 <i>F</i> -statistics values for the 9 loci of 14..... | 58 |
| 4-8 <i>F</i> -statistics values for the 2 loci of 3 populations of <i>M.</i> <i>pongensis</i> | 58 |
| 4-9 <i>F</i> -statistics values for the 5 loci of 3 populations of <i>M.</i> <i>sphaericula sphaericula</i> | 58 |
| 4-10 <i>F</i> -statistics values for the 2 loci of 3 populations of <i>M.</i> <i>sphaericula extensa</i> | 59 |

LIST OF FIGURES

| Figure | Page |
|--------|---|
| 1-1 | Distribution of the genus <i>Mekongia</i> in Thailand and neighbor countries..... 7 |
| 2-1 | Shell morphological variation of <i>M. sphaericula</i> complex.. 10 |
| 3-1 | Map showing 14 collecting sites from several rivers in Thailand..... 20 |
| 3-2 | Morphometric measurement positions..... 21 |
| 4-1 | Canonical Discriminant Functions, showing the separated of <i>Mekongia</i> species by group centroids..... 31 |
| 4-2 | Canonical Discriminant Functions, showing the separated of <i>M. sphaericula</i> complex by group centroids..... 32 |
| 4-3 | Canonical Discriminant Functions, showing the separated of <i>M. swainsoni</i> complex by group centroids..... 32 |
| 4-4 | Frequency distribution of canonical discriminant scores for male and female of <i>M. swainsoni braueri</i> 34 |
| 4-5 | Comparisons of adult shell of <i>M. swainsoni braueri</i> 34 |
| 4-6 | Shell of <i>Mekongia</i> in Thailand..... 38 |
| 4-7 | The drawing tentacles of <i>M. swainsoni swainsoni</i> 39 |
| 4-8 | Male reproductive system of <i>Mekongia</i> 40 |
| 4-9 | Female reproductive system of <i>Mekongia</i> 42 |
| 4-10 | <i>Unionicola</i> sp. found in <i>M. sphaericula</i> 43 |
| 4-11 | The activity of α -esterase (EST- α)..... 44 |
| 4-12 | The activity of glucose-6-phosphate isomerase (GPI)..... 45 |
| 4-13 | The activity of malate dehydrogenase (MDH)..... 46 |
| 4-14 | The mannose-6-phosphate isomerase (MPI)..... 46 |
| 4-15 | The activity peptidase-glycyl-L-lucine of (PEP-GL)..... 47 |

LIST OF FIGURES (cont.)

| Figure | Page |
|---|-------------|
| 4-16 The activity of peptidase-luecylglycylglycine (PEP-LGG)..... | 48 |
| 4-17 The activity of 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD)..... | 48 |
| 4-18 The activity of phosphoglucomutase (PGM)..... | 49 |
| 4-19 The activity of sorbitol dehydrogenase (SDH)..... | 49 |
| 4-20 Dendrogram, constructed by UPGMA using Nei's unbiased (1978) genetic distance..... | 53 |



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย