การวิเคราะห์ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาและการศึกษาอัลโลไซม์ของหอยทรายสกุล *Mekongia* Crosse & Fischer, 1876 ในประเทศไทย

นายวชิร ศรีคุ้ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 Wattanasirmkit, 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.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วชิร ศรีคุ้ม : การวิเคราะห์ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาและการศึกษาอัลโลไซม์ของหอยทรายสกุล *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 หรือสาขาของแม่น้ำ และเป็นที่นิยมบริโภคอย่างกว้างขวาง พบอยู่แทบทุกภาคของประเทศไทย ยกเว้นภาคใต้ หอยทรายสกุลนี้ จัดอยู่ใน อันดับ Prosobranchia วงศ์ หอยขม Viviparidae บางชนิดเป็นพาหะกึ่งกลางของพยาธิ อาทิ พยาธิใบไม้ลำไส้ ก่อให้เกิดโรคทั้งมนุษย์และสัตว์ การศึกษาครั้งนี้ ทำการศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยา โดยเปรียบเทียบลักษณะของเปลือก อวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของหอยแต่ละสปีชีส์ และศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมโดยการศึกษาอัลโลไซม์ จากกลุ่มตัวอย่างหอยทั้งหมด 14 บริเวณทั่วประเทศไทย

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 พบว่าลักษณะของเปลือกสามารถใช้จำแนกหอยทรายจาก 14 กลุ่มตัวอย่างออกเป็น 8 กลุ่มเป็นไปตามการจัดจำแนกด้วยเปลือก นอกจากนี้จากการศึกษาหอยชนิด *M. swainsoni braueri* พบความแตกต่างของขนาดเปลือกระหว่างเพศผู้และเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยที่เปลือกเพศเมียใหญ่กว่าเพศผู้

ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างระดับสปีชีส์ และระดับซับสปีชีส์ ของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และพบว่าหอยทรายมีลักษณะแยกเพศกันอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังตรวจพบไรหอย *Unionicola* sp. บริเวณเหงือกหอยทรายอีกด้วย

ผลการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรม โดยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีสของเอ็นไซม์ 9 ชนิด ได้แก่ esterase, glucose-6-phosphate isomerase, malate dehydrogenase, mannose-6-phosphate isomerase, peptidase (glycyl-L-luecine และ luecyl-glycyl-glycine), 6-phosphogluconate dehydrogenase, phosphoglucomutase และ sorbitol dehydrogenase ผลจากการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมตามวิธีของ Nei (1978) พบว่าค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับสปีชีส์อยู่ในช่วง 0.071 ถึง 1.125 และระดับซับสปีชีส์อยู่ในช่วง 0.089 ถึง 1.125 ค่าความแตกต่างของพันธุกรรมของ *M. sphaericula spiralis* กับซับสปีชีส์อื่น

ผลการศึกษาความผันแปรทางสัณฐานิทยาและทางพันธุกรรมทำให้สามารถเสนอการปรับปรุง อนุกรมวิธานของหอยสกุลนี้ 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-luecine 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.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
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 *Mekongia* in Thailand....	6
3-1	Gel and electrode chamber buffers.....	25
3-2	Buffer combinations giving optimal resolution of enzyme in *Mekongia*.....	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 *Mekongia*.....	33
4-2	The 14 populations of *Mekongia* snails collected from fourteen localities and employed for electrophoretic studies.....	51
4-3	Allele frequencies at 13 polymorphic loci in fourteen samples of *Mekongia* from Thailand.....	54
4-4	Chi-square values for heterozygous loci in *Mekongia*.....	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	*F*-statistics values for the 9 loci of 14.....	58
4-8	*F*-statistics values for the 2 loci of 3 populations of *M. pongensis*.....	58
4-9	*F*-statistics values for the 5 loci of 3 populations of *M. sphaericula sphaericula*.....	58
4-10	*F*-statistics values for the 2 loci of 3 populations of *M. sphaericula extensa*.....	59

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1-1	Distribution of the genus *Mekongia* in Thailand and neighbor countries.....	7
2-1	Shell morphological variation of *M. sphaericula* 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 *Mekongia* species by group centroids.....	31
4-2	Canonical Discriminant Functions, showing the separated of *M. sphaericula* complex by group centroids.....	32
4-3	Canonical Discriminant Functions, showing the separated of *M. swainsoni* complex by group centroids.....	32
4-4	Frequency distribution of canonical discriminant scores for male and female of *M. swainsoni braueri*.....	34
4-5	Comparisons of adult shell of *M. swainsoni braueri*.....	34
4-6	Shell of *Mekongia* in Thailand.....	38
4-7	The drawing tentacles of *M. swainsoni swainsoni*.....	39
4-8	Male reproductive system of *Mekongia*.....	40
4-9	Female reproductive system of *Mekongia*.....	42
4-10	*Unionicola* sp. found in *M. sphaericula*.....	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-luecine 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