

สัณฐานวิทยาและลักษณะทางโมเลกุลของทากบกสปีชีส์ *Valiguna siamensis* (Martens, 1867)
ในประเทศไทย (Systellommatophora: Veronicellidae)

Morphological and molecular characteristics of land slug *Valiguna siamensis* (Martens, 1867)
in Thailand (Systellommatophora: Veronicellidae)

นางสาวบวรลักษณ์ มิตรเชื้อชาติ

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิโยรส ทองเกิด

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ โครงการความหลากหลายทางชีวภาพของหอยทากไทย:

การวิจัยและพัฒนา จากการใช้เครื่องมือเชิงลึกทางวิวัฒนาการไปสู่การรังสรรค์ธุรกิจจากฐานชีวภาพ

โดย ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญญา (DGP6280001)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย	: สัณฐานวิทยาและลักษณะทางโมเลกุลของทากบกสปีชีส์ <i>Valiguna siamensis</i> (Martens, 1867) ในประเทศไทย (Systemommatophora: Veronicellidae)
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวบวรลักษณ์ มิตรเชื้อชาติ
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิโยรส ทองเกิด
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

ทากบกสปีชีส์ *Valiguna siamensis* (Martens, 1867) อยู่ในวงศ์ Veronicellidae มีลักษณะลำตัวแบนคล้ายใบไม้ มีชื่อสามัญว่า leatherleaf slug บริเวณพืชหรือเศษซากพืชเป็นอาหาร พบกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ทากบกสปีชีส์นี้ได้ถูกบันทึกข้อมูลเป็นครั้งแรกโดยใช้ชื่อสปีชีส์ *Vaginulus siamensis* (Martens, 1867) ต่อมามีการศึกษาสัณฐานวิทยาาระบบสืบพันธุ์เพศผู้เป็นลักษณะสำคัญ และพบว่าทากบกสปีชีส์นี้ควรย้ายไปอยู่ในสกุล *Valiguna* เนื่องจากมีลักษณะของเพนีส (penis) แตกต่างจากสกุลอื่น ๆ การศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาจากตัวอย่างที่เก็บได้จากภาคสนามและตัวอย่างจากพิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก ได้แก่ สี ความเข้มจางของสี ลวดลายบนตัว ความยาวและความกว้างของลำตัว ความกว้างของแผ่นเท้า (foot) และลักษณะสัณฐานวิทยาภายใน ซึ่งได้แก่ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้โดยเฉพาะลักษณะของเพนีส เพื่อนำมาใช้ในการจำแนกทากบก และเปรียบเทียบกับศึกษาลักษณะทางโมเลกุล (DNA barcode) โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (CO I) ขนาด ~700 คู่เบส ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดจำแนกนั้นเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับข้อมูลทางโมเลกุล ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสปีชีส์ *Val. siamensis* ที่จัดจำแนกได้โดยลักษณะของเพนีส กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของทากบกสปีชีส์อื่น และสกุลอื่นในวงศ์เดียวกันจากฐานข้อมูล NCBI (GenBank) และคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยโปรแกรม MEGA X v10.1.7 (Kumar, S. et al., 2018) เพื่อให้ได้เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ และระหว่างสกุลภายในวงศ์เดียวกัน รวมไปถึงเปอร์เซ็นต์ความต่างระหว่างประชากรภายในสปีชีส์ ผลการศึกษาพบว่า ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกไม่สามารถนำมาจัดจำแนกได้ แต่ลักษณะของเพนีสและข้อมูลทางโมเลกุลนั้นเป็นไปในทิศทางเดียวกัน และสามารถจัดจำแนกตัวอย่างทากบกในประเทศไทยจากที่ได้ศึกษาตัวอย่างที่มีอยู่ ได้เป็น 2 สปีชีส์ ได้แก่ *S. thailandensis* และ *Val. siamensis* ข้อมูลเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการจัดจำแนกทากบกในวงศ์นี้ต่อไปในอนาคตได้

คำสำคัญ: ระยะห่างทางพันธุกรรม, ลักษณะสัณฐานวิทยา, ลำดับนิวคลีโอไทด์, *Valiguna*

Research title : Morphological and molecular characteristics of land slug *Valiguna siamensis* (Martens, 1867) in Thailand (Systellommatophora: Veronicellidae)

Student name : Miss Bowornluk Mitchueachart

Advisor : Asst. Prof. Dr. Piyoros Tongkerd

Department : Biology

Abstract

Land slug, *Valiguna siamensis* (Martens, 1867) is classified into the family Veronicellidae. They have flat body, leaf-like shape and also known as leatherleaf slug which is their common name. Their diets are plants or leaf litter. They can be found commonly in various habitats all over Thailand. This species was first described as a name *Vaginulus siamensis* in 1867 by Martens which was considered by only the external morphologies. Later, the male genitalia morphological characters of this species were examined by focusing especially on the penis characteristics and found that they are totally different from the species in the other genera. In this study, we explored the specimens from our fieldworks and Chulalongkorn University Museum of Natural History collections. All external morphological characters; coloration, color intensity, spotted pattern, body length, body width, foot width and the internal morphological characters especially the penis characteristics were observed. The slug morphological analyses were compared with molecular characteristic (DNA barcode) using cytochrome c oxidase subunit 1 (CO I) gene (~700 bp). All classified from penis characteristic specimens of *Val. siamensis* CO I sequences were analyzed and collated with other veronicellids sequences from GenBank. Genetic distances in the generic and interspecific levels, including the genetic differentiation within species were calculated using MEGA X v10.1.7 program. The results showed that the external morphologies could not be used to classify the leatherleaf slugs. However, the penis characteristics concordant with molecular data can be the precise way to identify Thai leatherleaf slug specimens into 2 species, *S. tailandensis* and *Val. siamensis*. All of these data we discovered will be the basic knowledge for slugs in family Veronicellidae in the future.

Keywords: genetic distances, morphological characteristics, nucleotide sequences, *Valiguna*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิโยรส ทองเกิด อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ ทั้งในส่วนของข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ การวิเคราะห์ข้อมูล การจัดทำรูปแบบ การตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ตลอดจนข้อคิดในการใช้ชีวิตและการทำงาน ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญหา ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้ และคำแนะนำต่าง ๆ ที่มอบให้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์จรัสศักดิ์ สุจริต ที่ให้คำแนะนำในการทำโครงการในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา และอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวดี ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโครงการความหลากหลายทางชีวภาพของหอยทากไทย: การวิจัยและพัฒนาจากการวิเคราะห์เชิงลึกทางวิวัฒนาการไปสู่การรังสรรค์ธุรกิจจากฐานชีวภาพ โดย ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา (DGP6280001) ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้

ขอขอบคุณสมาชิกทุกคนใน Animal Systematics Research Unit ที่คอยให้การสนับสนุน คำแนะนำ และกำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัว และเพื่อนทุกคน สำหรับกำลังใจและคำปรึกษาตลอดการทำโครงการครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
ABSTRACT	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการนำเสนอผลงาน	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	9
3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายใน	9
3.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	9
3.1.2 การเก็บรักษาตัวอย่าง	9
3.1.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก	9
3.1.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใน	9
3.2 การศึกษาลักษณะทางโมเลกุล ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา	9
3.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)	9
3.2.2 PCR product purification	10
3.2.3 Agarose gel electrophoresis	11
3.2.4 การวิเคราะห์หาลำดับของนิวคลีโอไทด์ (sequencing)	11
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางโมเลกุล	11
3.3.1 การวิเคราะห์ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและภายใน	11
3.3.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางโมเลกุล	12
บทที่ 4 ผลการศึกษา	17
4.1 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและลักษณะสัณฐานวิทยาภายใน	17
4.2 ผลการศึกษาข้อมูลทางโมเลกุล	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา	24
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	32

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ข้อมูลตัวอย่างและสถานที่เก็บตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	15
ตารางที่ 2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	15
ตารางที่ 3	ชนิดของทากบกจาก GenBank และ Accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นำมาวิเคราะห์	16
ตารางที่ 4	สปีชีส์ของตัวอย่างทากบกที่จำแนกได้จากลักษณะของเพนีส	22
ตารางที่ 5	ตารางเปรียบเทียบค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (%)	23
ตารางที่ 6	ตารางเปรียบเทียบลักษณะเพนีสของทากบกที่เคยมีรายงานจากเอกสารว่าพบในประเทศไทย	27
ตารางที่ 1A	ความกว้างของลำตัว ความยาวของลำตัว และความกว้างของแผ่นเท้าของตัวอย่างทากบกทั้ง 29 ตัวอย่าง	32
ตารางที่ 2A	สีของทากบกจากแต่ละสถานที่	33

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของทากบกวงศ์ Veronicellidae	5
ภาพที่ 2	แผ่นพื้นของทากบกวงศ์ Veronicellidae สปีชีส์ <i>Val. flava</i>	6
ภาพที่ 3	รูปแบบเพนีสของทากบกแต่ละสกุล	7
ภาพที่ 4	รูปแบบเพนีสของทากบก 2 สปีชีส์	8
ภาพที่ 5	สถานที่เก็บตัวอย่างในจังหวัดเพชรบุรี	13
ภาพที่ 6	ลักษณะภายนอกของตัวอย่างทากบกที่เก็บได้จากจังหวัดเพชรบุรี	14
ภาพที่ 7	ลักษณะเพนีสรูปแบบ <i>acropleurocaulis</i> ของตัวอย่างทากบก Chan1E ใน ทิศทางต่าง ๆ	19
ภาพที่ 8	ลักษณะเพนีสรูปแบบ <i>pleurocaulis</i> ในทิศทางต่าง ๆ ของตัวอย่างทากบก Phet3C, Phet6C และ Phet8C	20
ภาพที่ 9	แผนภูมิไฟโลเจเนติกส์แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีความเป็นไปได้ สูงสุด (maximum likelihood) ของตัวอย่างทากบกที่เก็บมาจากจังหวัดเพชรบุรี	21
ภาพที่ 10	แผนที่การกระจายของตัวอย่างทากบก 29 ตัวอย่าง ในประเทศไทย	26

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการนำเสนอผลงาน

หอยทากบก (land snails) มีวิวัฒนาการออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มหอยทากมีเปลือก (snails) กลุ่มหอยทากลดเปลือก (semi-slugs) และกลุ่มทากบกหรือหอยทากริ่เปลือก (land slugs) (จิรศักดิ์ สุจริต และคณะ, 2560) โดยกลุ่มทากบกบางสปีชีส์มีความเกี่ยวข้องกับมนุษย์ สามารถก่อให้เกิดโทษได้ เช่น *Vaginulus plebeius* เป็นโฮสต์ตัวกลาง (intermediate host) ของหนอนตัวกลม *Angiostrongylus costaricensis* ซึ่งเป็นปรสิตในมนุษย์ นำไปสู่โรคพยาธิหอยโข่ง (abdominal angiostrongylosis) ได้หากมีการบริโภคหนอนตัวกลมที่อยู่ในเนื้อทากบกที่ปรุงไม่สุกเข้าไป (Morera, 1971) นอกจากนี้ Douglas และ Tooker (2012) ได้ศึกษาที่รัฐเพนซิลวาเนียกลาง พบว่าทากบก *Deroceras reticulatum* เป็นศัตรูพืชผลทางการเกษตร โดยจะเข้าไปทำลายพืชจำพวกพืชใบกว้าง ข้าวสาลี ข้าวโพด และถั่วเหลือง

ทากบกที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทยอยู่ในอันดับ Systellommatophora แบ่งเป็น 3 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ ทากหินหรือทากดิน (Family Onchidiidae) พบตามแหล่งน้ำกร่อยและป่าชายเลน วงศ์ทากนักล่า (Family Rathouisiidae) พบตามป่าเขตร้อนชื้น ลำหอยทากบกอื่นเป็นอาหาร และพบว่าสามารถบริโภคเห็ดราหรือพืชเป็นอาหารได้ เช่น ทากนักล่าสกุล *Atopos* และวงศ์ทากหรือตัวกล้วยตาก (Family Veronicellidae) พบอาศัยอยู่ในป่าเขตร้อนชื้นและเขตอบอุ่นเป็นหลัก บริโภคพืชหรือเศษซากพืชเป็นอาหาร และมีสองเพศในตัวเดียวกัน (hermaphrodite)

ตัวกล้วยตาก ทากฟ้า หรือตัวลิ้นหมา เป็นชื่อท้องถิ่นที่ใช้เรียกกลุ่มทากบกที่มีลักษณะลำตัวแบนคล้ายใบไม้ มีชื่อสามัญว่า leatherleaf slugs ซึ่งมีอยู่หลายสกุล เช่น *Laevicaulis*, *Sarasinula*, *Semperula*, *Vaginulus* และ *Valiguna* สำหรับสกุลที่พบในประเทศไทย ได้มีรายงานไว้ 3 สกุล คือ *Filicaulis*, *Semperula* และ *Valiguna* (Gomes and Thomé, 2004) ตัวกล้วยตาก หรือทากบกสปีชีส์ *Valiguna siamensis* (Martens, 1867) ถูกบันทึกข้อมูลครั้งแรกโดย Martens ในปี 1867 ซึ่งในขณะนั้นตั้งชื่อไว้ว่า *Vaginulus siamensis* โดย Martens ได้มาเก็บตัวอย่างที่จังหวัดเพชรบุรี ประเทศไทย และบันทึกข้อมูลเพียงสั้น ๆ อธิบายถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสีภายนอกเท่านั้น ต่อมา Grimpe และ Hoffmann ในปี 1925 ได้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายในเพิ่มเติม และย้ายสกุลจาก *Vaginulus* เป็น *Semperula* (*Se. siamensis*) และมีการใช้ชื่อนี้เรื่อยมา จนกระทั่งในปี 2004 Gomes และ Thomé ได้ศึกษาลักษณะของเพนีสทากบก *Se. siamensis* เพิ่มเติม แล้วพบว่ามีรูปแบบของเพนีสแตกต่างกันกับสกุลอื่น จึงได้ย้ายสกุลจาก *Semperula* เป็นสกุล *Valiguna* (*Val. siamensis*) นอกจากนี้ จากการศึกษาจนถึงปัจจุบัน ทากบกสกุล *Valiguna* มีอยู่สองสปีชีส์ คือ *Val. flava* และ *Val. siamensis* (Gomes and Thomé, 2004) โดยทั้งสองสปีชีส์มีการแพร่กระจายและลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ที่มีความแตกต่างกัน

การศึกษาลักษณะทางโมเลกุลเพื่อช่วยในการจัดจำแนก (classification) ของทากบกวงศ์ Veronicellidae ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ยังมีไม่มากนัก ส่วนใหญ่เป็นการศึกษากลุ่มสปีชีส์ในแถบอเมริกาใต้ และเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับสกุลและระดับสปีชีส์ โดยสปีชีส์จากทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ได้ถูกนำไปอ้างอิงและวิเคราะห์ร่วมกับสปีชีส์ทางอเมริกาใต้คือ *S. wallacei* ที่ได้จากประเทศมาเลเซีย และเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีรายงานว่าพบในประเทศไทย อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมเฉลี่ยของยีนไมโทคอนเดรีย cytochrome c oxidase subunit 1 (CO I) และ 16S rDNA รวมถึงส่วน internal transcribed spacer 2 (ITS2) ในนิวเคลียสระหว่างสปีชีส์ของทากบกวงศ์นี้มีค่าประมาณ 6-10% และระหว่างสกุลมีค่าประมาณ 17-20% (Gomes et al., 2009)

จากลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนกทั้งในระดับสกุลและระดับสปีชีส์ของทากบกวงศ์ Veronicellidae ที่กล่าวมาทั้งหมด โดยเฉพาะลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้หรือเพศเมียที่ใช้เป็นลักษณะสำคัญนั้น จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างที่เป็นตัวเต็มวัยแล้วเท่านั้นในการจัดจำแนก อีกทั้งทากบกกลุ่มนี้จะพบความผันแปรทางสัณฐานวิทยาภายในสปีชีส์เดียวกัน ทำให้ลักษณะภายนอกแต่เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกได้ บางครั้งจึงจำเป็นต้องใช้ลักษณะทางโมเลกุลมาช่วยในการจัดจำแนก การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในเปรียบเทียบระหว่างสกุลและระหว่างสปีชีส์ และการศึกษาในระดับโมเลกุลมาช่วยในการจัดจำแนกทากบกกลุ่มนี้ให้ชัดเจนยิ่งขึ้น นอกจากนี้การศึกษาระดับโมเลกุลของทากบกสกุล *Valiguna* ยังไม่มีการศึกษามาก่อน และยังไม่มีการกระจายที่ชัดเจนในประเทศไทย การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการได้ข้อมูลดังกล่าวเป็นครั้งแรก และจะเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านอนุกรมวิธานและวิวัฒนาการของทากบกกลุ่มนี้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและภายใน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (CO I) ของทากบกสปีชีส์ *Valiguna siamensis* ในประเทศไทย

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

รู้จักวิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและภายในของทากบก สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (CO I) เพื่อนำไปช่วยในการจัดจำแนกรวมถึงเป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมและความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน CO I ของทากบกในประเทศไทย

บทที่ 2

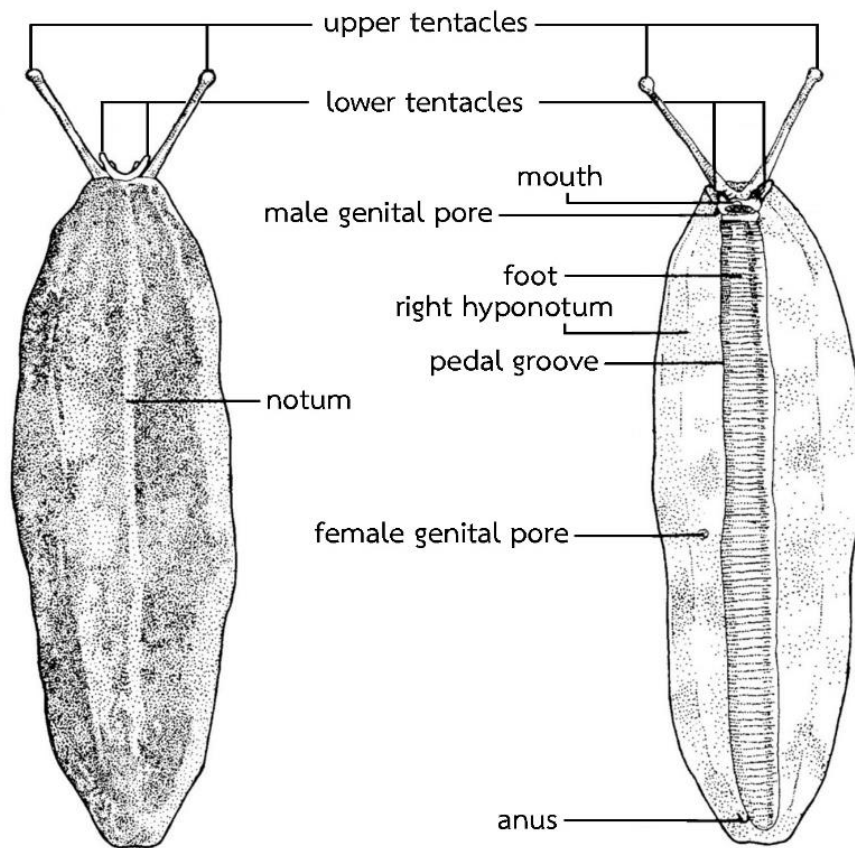
การทบทวนวรรณกรรม

ทากบกในวงศ์ Veronicellidae ในปัจจุบันมีสกุลที่ถูกบันทึกไว้จำนวน 23 สกุล พบว่ามีการกระจายตัวอยู่ตามบริเวณเขตร้อนและบริเวณใกล้เขตร้อน (Gomes et al., 2009) ทากบกในวงศ์นี้ลำตัวเป็นรูปทรงกระบอกแบน มีขนาดลำตัวยาวประมาณ 30-120 มิลลิเมตร เป็นทากบกที่ไม่มีเปลือกโดยสมบูรณ์ ด้านหัวและด้านท้ายมีขนาดคล้ายกันมาก ด้านหลัง (notum) มีเนื้อเยื่อแมนเทิล ลักษณะหนา มักมีสีน้ำตาล สีดำ อาจมีแถบสีจางหรือจุดสีเข้มปรากฏ ผังลำตัวด้านท้อง (hyponotum) มีสีจางกว่าด้านหลัง เฝ้ามมีขนาดเล็กเรียวยาวตลอดความยาวลำตัว วางอยู่กลางลำตัวด้านท้องอยู่ในร่องเท้า (pedal groove) ส่วนหัวมีขนาดเล็ก มีหนวด 2 คู่ หนวดคู่บน (upper tentacles) มีอวัยวะรับแสงหรือตาอยู่ที่ปลาย หนวดคู่ล่าง (lower tentacles) สันช่องหายใจเปิดที่ส่วนท้ายของลำตัวอยู่ในร่องเท้าใกล้กับทวารหนัก (anus) (ภาพที่ 1) บนแผ่นพื้นมีพินกลางเป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก พินข้างและพินขอบมีลักษณะคล้ายกันเป็นรูปสามเหลี่ยมที่มีส่วนฐานมน ส่วนปลายยอดค่อนข้างแหลม (ภาพที่ 2) มีสองเพศในตัวเดียวกัน (hermaphrodite) รูเปิดระบบสืบพันธุ์เพศผู้ อยู่บริเวณด้านหน้าสุดของลำตัว ใต้หนวดขวา ส่วนรูเปิดระบบสืบพันธุ์เพศเมียอยู่บริเวณกึ่งกลางของผังก้านท้องฝั่งขวา โดยสปีชีส์ที่พบได้บ่อยในประเทศไทย คือ *Valiguna siamensis* มีการแพร่กระจายทั่วประเทศ สามารถอาศัยอยู่ในถิ่นที่อยู่อาศัยหลากหลาย ทั้งในพื้นที่ธรรมชาติและชุมชนเมือง (จิรศักดิ์ สุจริต และคณะ, 2560; Gomes and Thomé, 2004)

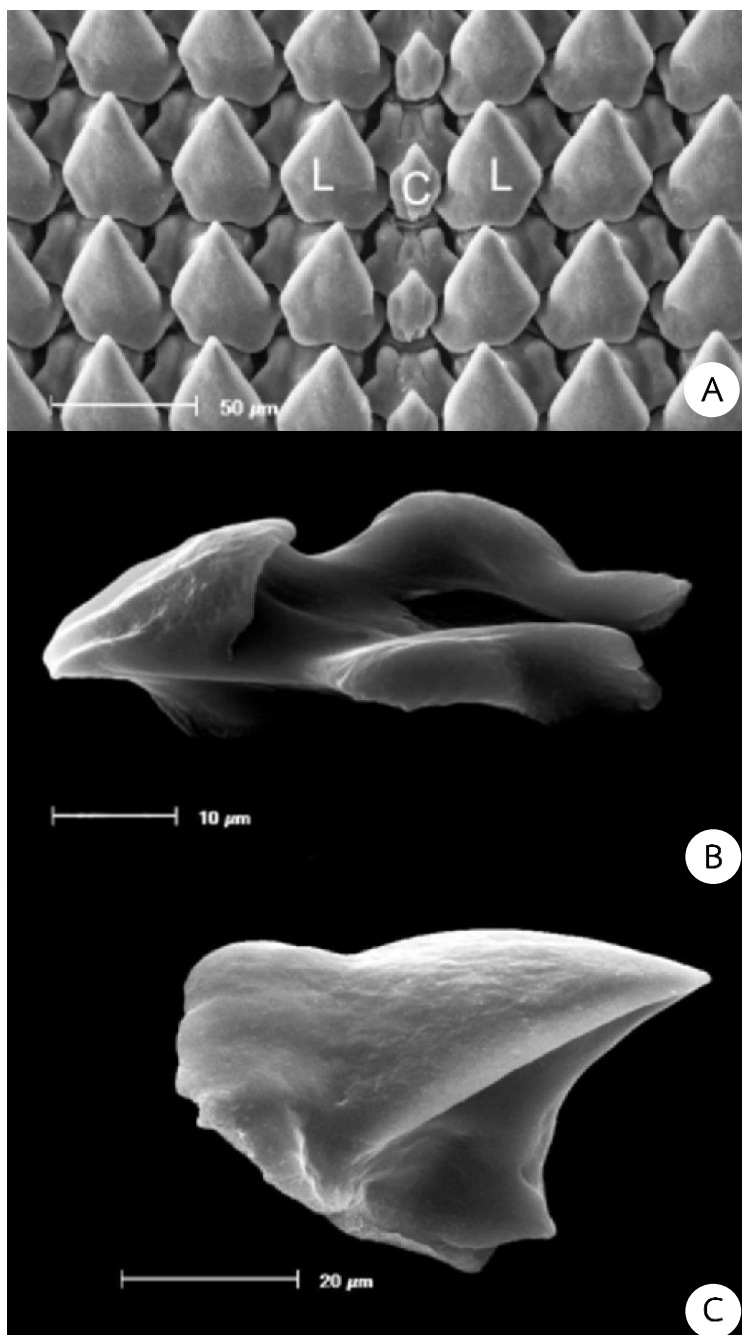
จากการศึกษาของ Gomes และ Thomé ในปี 2004 ได้ให้ข้อมูลว่าพบทากบกในวงศ์ Veronicellidae ในประเทศไทยมี 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Filicaulis bleekeri* (Keferstein, 1865) *Semperula maculata* (Templeton, 1858) *Semperula thailandensis* (Thomé et al., 1994) และ *Valiguna siamensis* (Martens, 1867)

ทากบกสปีชีส์ *Valiguna siamensis* (Martens, 1867) มีประวัติถูกย้ายสกุลจากสกุลที่ตั้งครั้งแรก *Vaginulus* เป็น *Semperula* (*Se. siamensis*) โดย Grimpe และ Hoffmann ในปี 1925 เนื่องจากมีลักษณะของเพนีสที่มีด้านที่นูนขึ้นเป็นลักษณะของสัน (crest) โดยในปีเดียวกันนี้ Grimpe และ Hoffmann ได้ตั้ง *Valiguna* เป็นสกุลย่อย (subgenus) ของสกุล *Semperula* ต่อมาในปี 1941 Hoffmann ได้ศึกษาตัวอย่างเพิ่มเติมและพิจารณาให้สกุลย่อย *Valiguna* ขึ้นมาเป็นสกุล เนื่องจากรูเปิดของ vas deferens ของทากในสกุลนี้ไม่ได้เปิดที่บริเวณส่วนปลาย (terminal) ของเพนีส เหมือนที่พบในทากบกสกุล *Sarasinula* ซึ่งเรียกรูปแบบเพนีสที่พบใน *Sarasinula* ว่า *acrocaulis* (ภาพที่ 3A) และรูเปิดไม่ได้เปิดที่บริเวณส่วนฐาน (base) ของเพนีสเหมือนที่พบในทากบกสกุล *Semperula* ซึ่งเป็นรูปแบบ *pleurocaulis* (ภาพที่ 3B) แต่เพนีสของ *Valiguna* นั้นเปิดที่บริเวณกึ่งกลางของเพนีส โดยเรียกรูปแบบของเพนีสที่มีรูเปิดของ vas deferens อยู่กึ่งกลางเพนีสนี้ว่า *acroplesurocaulis* หรือ *pseudopleurocaulis* (ภาพที่ 3C) จากงานนี้ก็ยังคงมีการใช้ชื่อ *Se. siamensis* เรื่อยมา จนกระทั่งปี 2004 Gomes และ Thomé ได้สนับสนุนงานวิจัยระดับสกุลของ Hoffman (1941) และได้ศึกษาสัณฐานวิทยาของระบบสืบพันธุ์เพศผู้เพิ่มเติม โดยใช้ลักษณะเพนีส

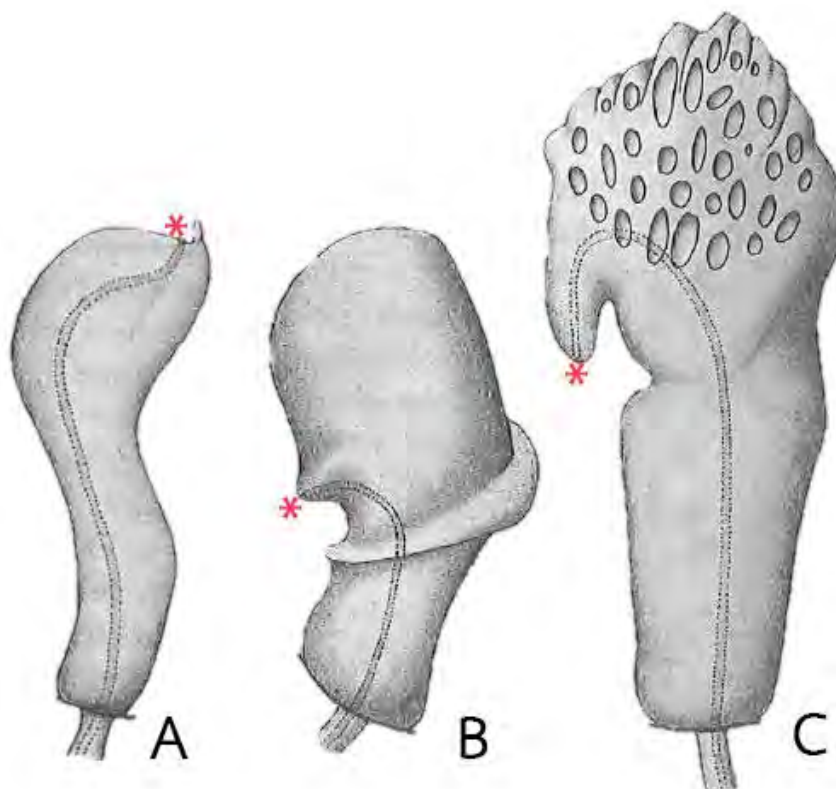
เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกในระดับสกุล ซึ่งจากการศึกษาอย่างละเอียดพบว่าลักษณะเพนีสในทากบกสปีชีส์ *Se. siamensis* นั้นมีรูเปิดที่บริเวณกึ่งกลางของเพนีส ที่เรียกว่า *acropleurocaulis* ซึ่งเป็นรูปแบบของสกุล *Valiguna* ตามคำบรรยายสกุลจากงานของ Hoffman (1941) จากหลักฐานนี้ จึงย้าย *Se. siamensis* จากสกุล *Semperula* เป็นสกุล *Valiguna* (*Val. siamensis*) และนอกจากนี้ยังพบว่า *Val. reticulatus* (Westerlund, 1883) ที่ถูกตั้งชื่อขึ้นนั้น มีลักษณะของเพนีสที่เหมือนกับ *Val. siamensis* (Martens, 1867) จึงให้เป็น synonym ของสปีชีส์นี้อีกด้วย จากการศึกษาจนถึงปัจจุบันทากบกสกุล *Valiguna* มีอยู่สองสปีชีส์ด้วยกันคือ *Val. flava* และ *Val. siamensis* โดย Gomes และ Thomé (2004) ได้ศึกษาการแพร่กระจายของทากบกทั้งสองสปีชีส์นี้ โดย *Val. flava* มีการแพร่กระจายในประเทศอินโดนีเซีย บริเวณเกาะบอร์เนียว (Borneo) และเกาะสุมาตรา (Sumatra) ส่วน *Val. siamensis* มีการแพร่กระจายบริเวณประเทศจีน ศรีลังกา และไทย ซึ่งทั้งสองสปีชีส์นี้มีการแพร่กระจายที่แบ่งแยกกันชัดเจน นอกจากนี้ยังมีลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ที่มีความแตกต่างกันคือ *Val. flava* มีส่วนฐานของเพนีสเป็นรูปทรงกระบอก และมีโครงสร้างเสริมบริเวณปลายเพนีสลักษณะคล้ายเลื่อย (dentate and serrated formations) (ภาพที่ 4A) ต่างจาก *Val. siamensis* ที่ฐานของเพนีสกว้างกว่า และโครงสร้างเสริมบริเวณปลายเพนีสมีลักษณะคล้ายรังผึ้ง (honeycomb formation) (ภาพที่ 4B)



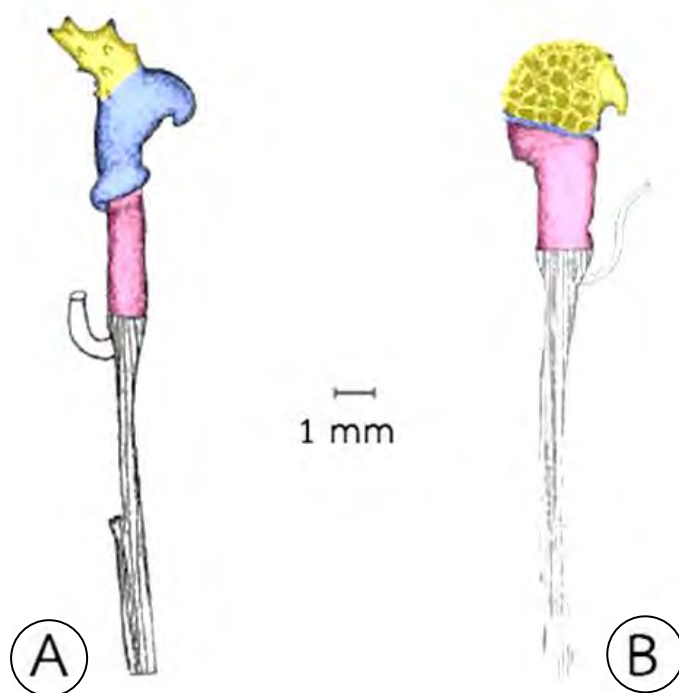
ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของทากบกวงศ์ Veronicellidae (ดัดแปลงจาก Caballero et al., 1991)



ภาพที่ 2 แผ่นฟันของทากบกวงศ์ Veronicellidae สปีชีส์ *Val. flava* A: แผ่นฟัน (C=central teeth, L=lateral teeth) B: lateral view ของ central teeth และ C: lateral view ของ lateral teeth (ดัดแปลงจาก Gomes et al., 2008)



ภาพที่ 3 รูปแบบเพนีสของทากบกแต่ละสกุล A: เพนีสรูปแบบ acrocaulis ของทากบกสกุล *Sarasinula* สปีชีส์ *Sa. plebeia* B: เพนีสรูปแบบ pleurocaulis ของทากบกสกุล *Semperula* สปีชีส์ *Se. maculata* C: เพนีสรูปแบบ acropleurocaulis ของทากบกสกุล *Valiguna* สปีชีส์ *Val. siamensis* * แสดงบริเวณรูเปิดของ vas deferens (ดัดแปลงจาก Grimpe and Hoffmann, 1925)



ภาพที่ 4 รูปแบบเพนีสของทากบก 2 สปีชีส์ A: เพนีสที่มีโครงสร้างเสริม ลักษณะคล้ายเลื่อย (dentate and serrated formations) ของทากบกสปีชีส์ *Val. flava* B: เพนีสที่มีโครงสร้างเสริม ลักษณะคล้ายรังผึ้ง (honeycomb formation) ของทากบกสปีชีส์ *Val. siamensis* *สีชมพูแสดงบริเวณส่วนฐาน (base) สีฟ้าแสดงส่วนปลาย (terminal) และสีเหลืองแสดงโครงสร้างเสริมส่วนปลายของเพนีส (ดัดแปลงจาก Gomes et al., 2008)

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน

3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายใน

3.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างของทากบกถูกเก็บจากพื้นที่เขาหินปูนในจังหวัดเพชรบุรี (ภาพที่ 5) สำหรับสปีชีส์ *Val. siamensis* ซึ่งเป็นพื้นที่สปีชีส์ต้นแบบ (type locality) จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยของ Martens ในปี 1867 โดยเก็บตัวอย่างที่เขาหลวง, วัดศรีวงค์, วัดเขากระจิว, วัดเขابันได และวัดถ้ำแจ่ม ในเดือนสิงหาคม ปี 2019 แสดงข้อมูลตัวอย่างในตารางที่ 1

3.1.2 การเก็บรักษาตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาทำให้ร่างกายเหี่ยวโดยตรงด้วยวิธี suffocation หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 70% สำหรับการศึกษาสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายใน และแอลกอฮอล์ 95% สำหรับการศึกษาลักษณะทางโมเลกุล

3.1.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก

- วัดขนาดความกว้างและความยาวของลำตัว ความกว้างของแผ่นเท้า (foot)
- บันทึกสีบนตัวโดยใช้โปรแกรม Photoshop CS6 x64 และถ่ายภาพก่อนที่ตัวอย่างจะถูกเก็บรักษาทั้งด้านหลัง (notum) และผนังด้านท้อง (hyponotum) (ภาพที่ 6)

3.1.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใน

- ผ่าตัดตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ โดยเฉพาะลักษณะของเพนีสที่ใช้จำแนกในระดับสกุล และระดับสปีชีส์ โดยนำมาศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอ (stereo microscope) และถ่ายภาพอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอซึ่งเชื่อมต่อกับอุปกรณ์และโปรแกรมจับภาพ Cell D

3.2 การศึกษาลักษณะทางโมเลกุล ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

3.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

ตัดชิ้นเนื้อของตัวอย่างส่วนแผ่นเท้า (foot) ขนาดประมาณ 0.5x0.5 ตารางเซนติเมตร นำไปสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel™) จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ในตำแหน่งจำเพาะ cytochrome c oxidase subunit 1 (CO I) ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของ Folmer และคณะ ปี 1994 (ตารางที่ 2)

การตรวจหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม สำหรับปฏิกิริยา PCR ด้วยการทำ PCR gradient โดยกำหนดอุณหภูมิ annealing ในช่วง 42 °C จนถึง 60 °C แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีการ gel electrophoresis ใน agarose gel เพื่อหาแถบ DNA ที่ชัดเจนที่สุดว่าตรงกับอุณหภูมิใด อุณหภูมินั้นจึงเหมาะกับการนำมาใช้ในปฏิกิริยา PCR

PCR condition ที่ใช้ในการศึกษา มีดังต่อไปนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C 2 นาที, denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, varies annealing ที่อุณหภูมิ 45-52 °C เป็นเวลา 90 วินาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที โดยขั้นตอน denaturation จนถึงขั้นตอน extension มีจำนวน 34 รอบ (cycles) และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที โดยดัดแปลงจากงานวิจัยของ Nantararat และคณะ ปี 2019

3.2.2 PCR product purification

มี 2 รูปแบบ ได้แก่

1) แบบน้ำ: ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ ปิเปต PCR product ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วจึงเติม BNL buffer ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร PCR product ลงในแต่ละหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปออร์เทกซ์ หลังจากนั้นปิเปตสารละลายแต่ละหลอด ลงในหลอดเก็บตัวอย่าง (collection tube) ที่ใส่คอลัมน์ไว้เรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 11,000 × g เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทของเหลวของแต่ละหลอดเก็บตัวอย่างทิ้ง ต่อมาเติม washing buffer ที่เติมเอทานอลเรียบร้อยแล้ว ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 11,000 × g เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทของเหลวของแต่ละหลอดเก็บตัวอย่างทิ้ง นำแต่ละหลอดไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้งที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้ย้ายแต่ละคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติม elution buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตรใส่ลงบริเวณกึ่งกลางคอลัมน์ของแต่ละหลอด แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที แยกส่วนคอลัมน์ออกเพื่อนำไปทิ้ง และเก็บ PCR product ที่อยู่ภายในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

2) แบบเจล (gel extraction): นำ PCR product แยกออกมาจาก agarose gel โดยใช้ MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ ตัดเจลบริเวณที่มี DNA ของแต่ละตัวอย่างด้วยมีดผ่าตัด จากนั้นย้ายไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ละลายเจลด้วยการเติม BNL buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด แล้วนำไปออร์เทกซ์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 5-10 นาที จนกระทั่งเจลละลายอย่างสมบูรณ์ นำแต่ละหลอดออกมาวางให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงปิเปตสารละลายแต่ละหลอด ลงในหลอดเก็บตัวอย่างที่ใส่คอลัมน์ไว้เรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 11,000 × g เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทของเหลวของแต่ละหลอดเก็บตัวอย่างทิ้ง ต่อมาเติม washing buffer ที่เติมเอทานอลเรียบร้อยแล้ว ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 11,000 × g เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทของเหลวของแต่ละหลอดเก็บตัวอย่างทิ้ง

นำแต่ละหลอดไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้งที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้ย้ายแต่ละคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติม elution buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตรใส่ลงบริเวณกึ่งกลางคอลัมน์ของแต่ละหลอด แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที แยกส่วนคอลัมน์ออกเพื่อนำไปทิ้ง และเก็บ PCR product ที่อยู่ภายในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

3.2.3 Agarose gel electrophoresis

นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของ DNA ภายใต้สนามไฟฟ้าด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งการเตรียม agarose gel มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ ชั่งผง agarose 0.8 กรัม ผสมกับ TBE 0.5 % (w/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ จากนั้นนำไปต้มในไมโครเวฟจนสารละลายใส ไม่มีวุ้น นำขวดรูปชมพู่ออกมา เติม SYBR safe ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน วางทิ้งไว้ให้อุณหภูมิของสารละลายลดลงจนสารละลายไม่ร้อนจนเกินไป จากนั้นเทสารละลายลงถาดเจลที่ใส่หวีเตรียมไว้ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 30 นาทีหรือจนเจลแข็งตัว เมื่อเจลแข็งตัวให้ดึงหวีออก แล้วนำเจลที่ได้ไปใส่ลงในกล่อง electrophoresis โดยให้หลุมใส่ตัวอย่างอยู่ทางซ้ายลบ จากนั้นเท TBE 0.5 % (w/v) จนท่วมเจลขึ้นมาเล็กน้อย

นำ DNA ตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบขนาด ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร บนแผ่นพาราฟินให้เข้ากัน จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารบนแผ่นพาราฟินใส่ลงในหลุมเจลที่เตรียมไว้ในตอนต้นจนครบทุกตัวอย่าง และในหลุมเจลสุดท้ายให้ใส่ DNA ladder เพื่อวัดขนาด DNA แล้วทำการตั้งค่าเครื่อง electrophoresis ให้รันเจลที่ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 135 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำเจลไปตรวจสอบขนาดภายใต้แสง UV

3.2.4 การวิเคราะห์หาลำดับของนิวคลีโอไทด์ (sequencing)

นำ PCR product ไปวิเคราะห์หาลำดับของนิวคลีโอไทด์ (sequencing) โดยส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท U2Bio Co., Ltd ประเทศเกาหลีใต้

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางโมเลกุล

3.3.1 การวิเคราะห์ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและภายใน

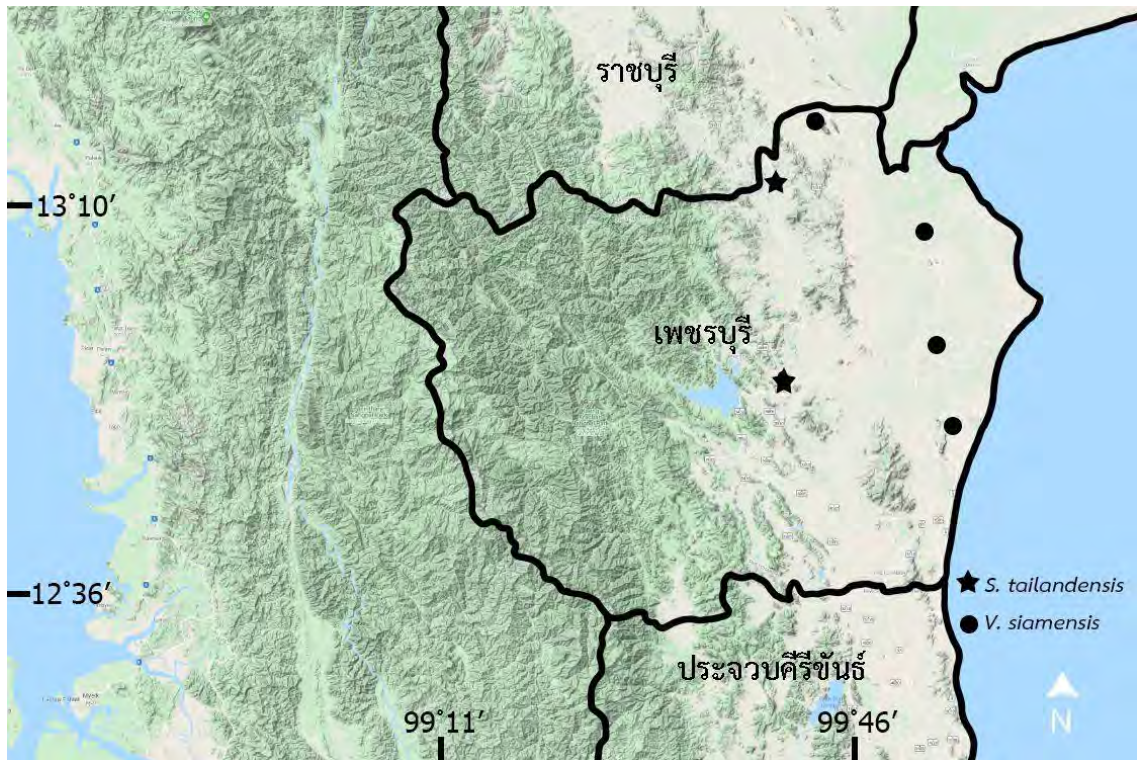
- ระบุสปีชีส์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและระบบสืบพันธุ์เพศผู้ โดยเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ เช่น ขนาดตัว ขนาดแผ่นเท้า สืบพันธุ์ เพนีส โดยเรียบเรียงและบรรยายลักษณะตามงานวิจัยของ Martens (1867) Grimpe และ Hoffmann (1925) และ Gomes และ Thomé (2004)

- เปรียบเทียบลักษณะของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ของตัวอย่างที่เก็บได้กับตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยซึ่งเก็บมาจากพื้นที่ต่าง ๆ เพื่อศึกษาการกระจายของ *Val. siamensis* ในประเทศไทย โดยหากทำการผ่าตัดตัวอย่างจากพิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยาแห่ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้วพบว่า มีลักษณะของเพนีสตรงกับรูปแบบที่พบในทากบกสปีชีส์ *Val. siamensis* แสดงว่า ทากบกสปีชีส์ *Val. siamensis* มีการกระจายตัวไปยังพื้นที่อื่น นอกจากจังหวัดเพชรบุรี

3.3.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางโมเลกุล

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างที่เก็บได้กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของฐานข้อมูล NCBI (GenBank) ของทากบกสกุลอื่นในวงศ์เดียวกัน เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของทากบกระหว่างประชากรในสปีชีส์เดียวกัน คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เพื่อนำมาวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง ระหว่างสกุลภายในวงศ์เดียวกัน และเปอร์เซ็นต์ความต่างระหว่างประชากรภายในสปีชีส์ โดยโปรแกรม MEGA X v10.1.7 (Kumar, S. et al., 2018) โดยเลือกทากบกสปีชีส์ *Onchidium melakense* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Onchidiidae เป็น outgroup ในการวิเคราะห์ข้อมูล (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 5 สถานที่เก็บตัวอย่างในจังหวัดเพชรบุรี (รูปดาวทึบ คือ สถานที่พบสปีชีส์ *Se. thailandensis* รูปวงกลมทึบ คือ สถานที่พบสปีชีส์ *Val. siamensis*)



ภาพที่ 6 ลักษณะภายนอกของตัวอย่างหาคบกที่เก็บได้จากจังหวัดเพชรบุรี

วัดเขابันโต อ.หนองหญ้าปล้อง A1: ด้าน dorsal A2: ด้าน ventral, วัดเขากระจิ๋ว อ.ท่ายาง B1: ด้าน dorsal
B2: ด้าน ventral, วัดถ้ำแจ่ม อ.ชะอำ C1: ด้าน dorsal C2: ด้าน ventral, บ้านโอบฟ้ารีสอร์ท อ.แก่งกระจาน
D: ด้าน dorsal, เขาหลวง อ.เมือง E: ด้าน dorsal และวัดศิรีวงค์ อ.เขาย้อย F: ด้าน dorsal

ตารางที่ 1 ข้อมูลตัวอย่างและสถานที่เก็บตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

รหัสตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จังหวัด	พิกัดทางภูมิศาสตร์
Phet1C	วัดเขابันได อ.หนองหญ้าปล้อง	เพชรบุรี	13°14'08" N 99°41'20" E
Phet2C	วัดเขابันได อ.หนองหญ้าปล้อง		13°14'08" N 99°41'20" E
Phet3C	วัดเขากระจุย อ.ท่ายาง		12°57'43" N 99°54'48" E
Phet4C	บ้านโอบฟ้ารีสอร์ท อ.แก่งกระจาน		12°53'54" N 99°38'55" E
Phet5C	บ้านโอบฟ้ารีสอร์ท อ.แก่งกระจาน		12°53'54" N 99°38'55" E
Phet6C	วัดถ้ำแจง อ.ชะอำ		12°49'37" N 99°56'22" E
Phet7C	เขาหลวง อ.เมือง		13°07'56" N 99°55'57" E
Phet8C	วัดคีรีวงก์ อ.เขาย้อย		13°20'02" N 99°45'22" E

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'	อ้างอิง
HCO2198	GGT CAA CAA TCA TAA AGA TAT TGG	Folmer et al. 1994
LCO1490	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT C	Folmer et al. 1994

ตารางที่ 3 ชนิดของทากบกจาก GenBank และ Accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้นำมาวิเคราะห์

NCBI (GenBank)			
<i>Laevicaulis alte</i>	เมืองวิชาขาปัตตนม รัฐอานธรประเทศ อินเดีย		KY774830
<i>Sarasinula plebeia</i>	รัฐฮาวาย สหรัฐอเมริกา		KM489499
<i>Semperula wallacei</i>	เกาะโอกินาวะ เมืองนาฮะ จังหวัดโอกินาวะ ญี่ปุ่น		LC415574
<i>Vaginulus taunaysii</i>	เมืองเตรซอปูลีส รัฐรีอูดีจาเนรู บราซิล		DQ648529
<i>Veronicella cubensis</i>	เมืองฮิล รัฐฮาวาย สหรัฐอเมริกา		DQ897672
Outgroup			
<i>Onchidium melakense</i>	มาเลเซีย		MN528062

บทที่ 4 ผลการศึกษา

4.1 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและลักษณะสัณฐานวิทยาภายใน

ลักษณะที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ความกว้างของลำตัว ความยาวของลำตัว ความกว้างของแผ่นเท้า และลักษณะของเพนีส จำนวนทั้งหมด 29 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดเพชรบุรี 8 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากพิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 21 ตัวอย่าง (ภาคผนวก, ตารางที่ 1A) ซึ่งลักษณะดังกล่าวในแต่ละลักษณะจะถูกนำมาเปรียบเทียบกันเพื่อระบุสปีชีส์ (ตารางที่ 4) นอกจากนี้ สืบค้นตัวจะถูกบันทึกด้วยโปรแกรม Photoshop CS6 x64 (ภาคผนวก, ตารางที่ 2A)

จากผลการศึกษาตัวอย่างจากพิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 21 ตัวอย่าง พบว่า

- รูปแบบเพนีสเป็น acropleurocaulis ตรงกับสปีชีส์ *Val. siamensis* จำนวน 19 ตัวอย่าง มีส่วนของโครงสร้างเสริมคล้ายกับรังผึ้ง (ภาพที่ 7 โดยเป็นภาพของตัวอย่างทากบก Chan1E ในตารางที่ 4) มีช่วงความกว้างของลำตัว 4.0-6.0 เซนติเมตร ช่วงความยาวของลำตัว 1.4-2.3 เซนติเมตร และช่วงความกว้างของแผ่นเท้า 0.3-0.5 เซนติเมตร
- รูปแบบเพนีสเป็น pleurocaulis ตรงกับสปีชีส์ *Se. thailandensis* จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยมีช่วงความกว้างของลำตัว 1.1-1.2 เซนติเมตร ช่วงความยาวของลำตัว 3.0-3.2 เซนติเมตร และความกว้างของแผ่นเท้า 0.2 เซนติเมตร

สำหรับผลการศึกษาตัวอย่างจังหวัดเพชรบุรี 8 ตัวอย่าง พบว่า

- รูปแบบเพนีสเป็น acropleurocaulis ตรงกับสปีชีส์ *Val. siamensis* จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ Phet1C, Phet2C, Phet4C และ Phet5C มีช่วงความกว้างของลำตัว 1.2-1.5 เซนติเมตร ช่วงความยาวของลำตัว 3.8-5.1 เซนติเมตร และช่วงความกว้างของแผ่นเท้า 0.2-0.4 เซนติเมตร
- รูปแบบเพนีสเป็น pleurocaulis ตรงกับสปีชีส์ *Se. thailandensis* จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ Phet3C, Phet6C, Phet7C และ Phet8C (ภาพที่ 8) โดยมีช่วงความกว้างของลำตัว 1.1-1.2 เซนติเมตร ช่วงความยาวของลำตัว 3.3-4.0 เซนติเมตร และช่วงความกว้างของแผ่นเท้า 0.2-0.3 เซนติเมตร

4.2 ผลการศึกษาข้อมูลทางโมเลกุล

ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้างแผนภูมิไฟโลเจเนติกส์ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (CO I) ด้วยวิธีความเป็นไปได้สูงสุด (maximum likelihood) ของตัวอย่างทากบกที่เก็บมาจากจังหวัดเพชรบุรีโดยการจัดจำแนกจากลักษณะของ

เพนีสกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของทากบกสปีชีส์อื่น และสกุลอื่นในวงศ์เดียวกันจากฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีค่าการสนับสนุน Bootstrap support ที่สูง เฉพาะด้านปลายของแผนภูมิเท่านั้น ส่วนความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในกิ่งที่ลึกเข้ามาด้านในแผนภูมิ (deep nodes) ยังมีค่าการสนับสนุน Bootstrap support ที่ต่ำอยู่มาก จึงสามารถแบ่งความสัมพันธ์ตามค่าการสนับสนุนของกิ่งในแผนภูมิได้เป็น 7 เคลด (clade) (ภาพที่ 9) ดังนี้

เคลดที่ 1 ประกอบด้วย ตัวอย่างทากบก Phet1C, Phet2C, Phet4C และ Phet5C ที่มีเพนีสรูปแบบ acropleurocaulis ตรงกับสปีชีส์ *Valiguna siamensis* (มีค่าการสนับสนุนที่ดีที่สุด Bootstrap support ที่ 95%)

เคลดที่ 2 ได้แก่ LC415574 *Semperula wallacei* มีเพนีสรูปแบบ pleurocaulis (ค่าการสนับสนุน Bootstrap support ที่จะรวมกับเคลดที่ 1 นั้นมีค่าต่ำมาก ที่ 47% ซึ่งต่ำกว่า 50% ดังนั้นจึงไม่สามารถรวม *Semperula wallacei* ไปอยู่กับเคลดที่ 1 ได้ และแยกออกมาเป็นเคลดที่ 2)

เคลดที่ 3 ได้แก่ ตัวอย่างทากบก Phet3C, Phet6C, Phet7C และ Phet8C มีเพนีสรูปแบบ pleurocaulis ตรงกับสปีชีส์ *Se. thailandensis* (มีค่าการสนับสนุนปานกลาง Bootstrap support ที่ 78%)

เคลดที่ 4 ได้แก่ DQ897672 *Veronicella cubensis*

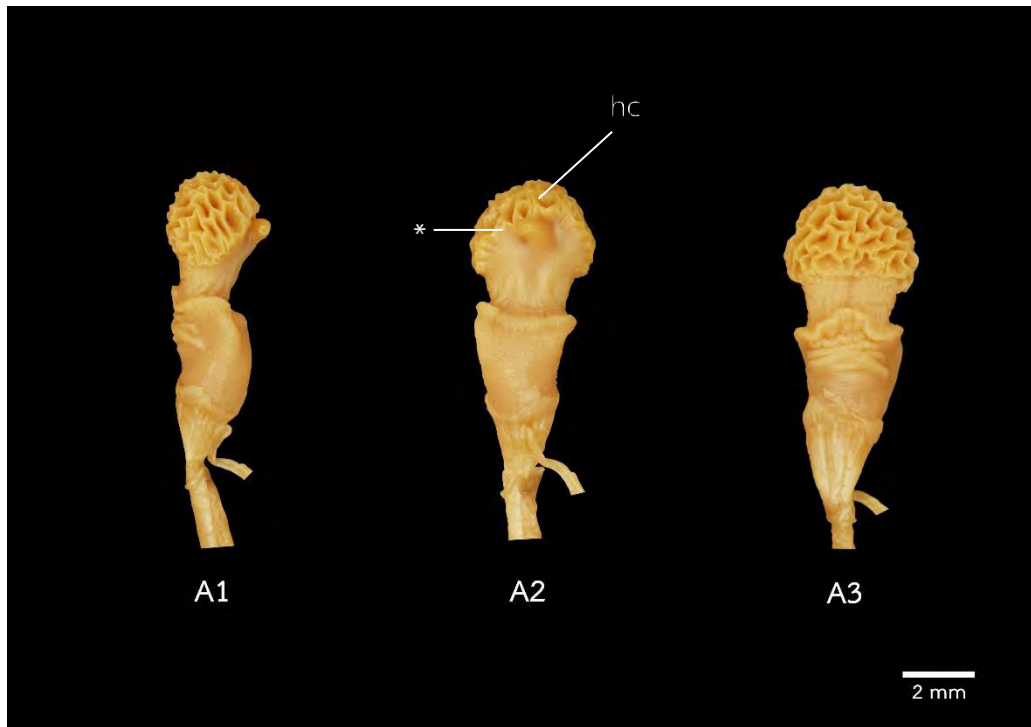
เคลดที่ 5 ได้แก่ DQ648529 *Vaginulus taunaysii*

เคลดที่ 6 ได้แก่ KM489499 *Sarasinula plebeia* (ค่าการสนับสนุน Bootstrap support ที่จะรวมกับเคลดที่ 5 นั้นมีค่าต่ำมาก ที่ 47% ซึ่งต่ำกว่า 50% ดังนั้นจึงไม่สามารถรวม *Sa. plebeia* ไปอยู่กับเคลดที่ 5 ได้ และแยกออกมาเป็นเคลดที่ 6)

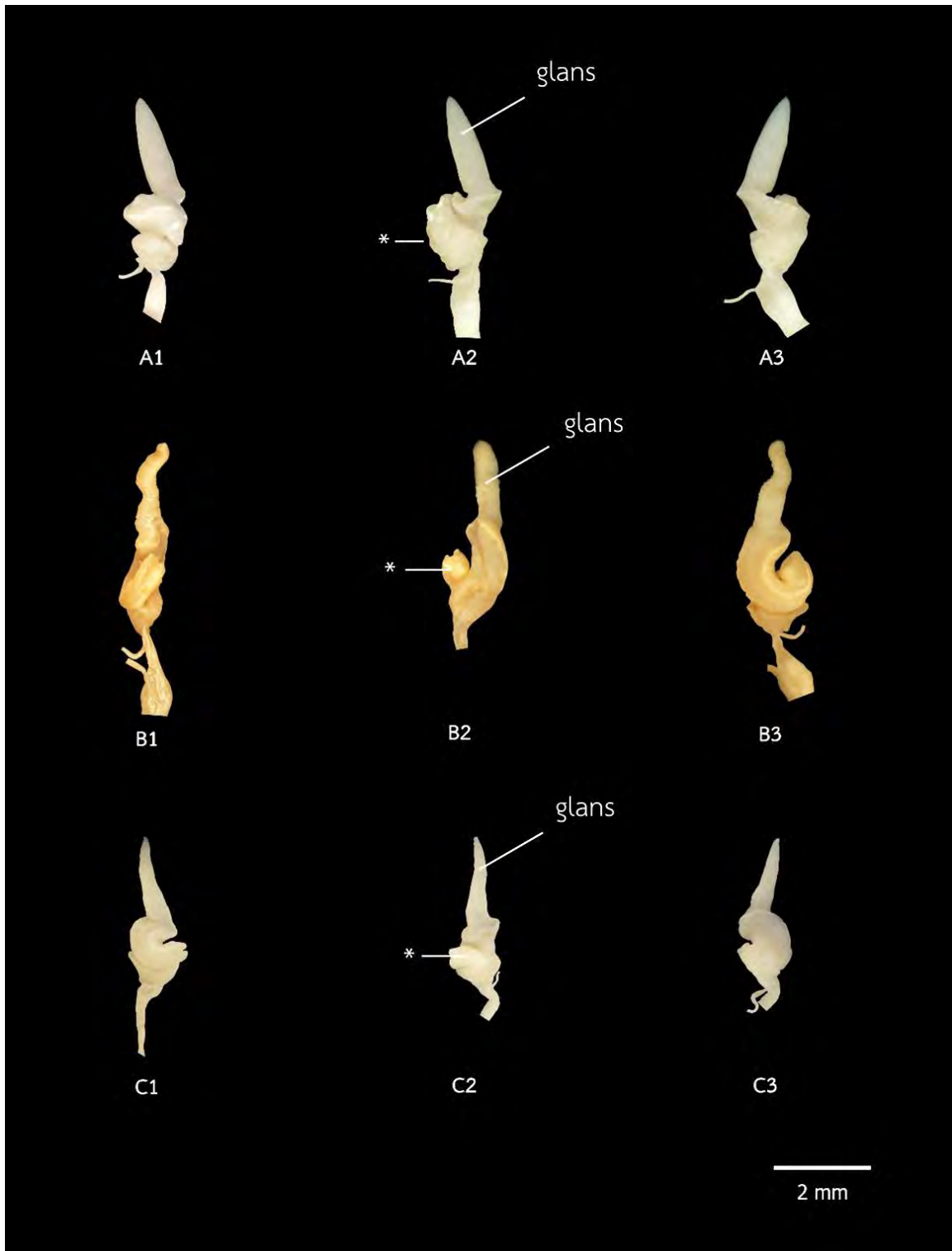
เคลดที่ 7 ได้แก่ KY774830 *Laevicaulis alte*

สำหรับ LC415574 *Se. wallacei*, DQ897672 *Ver. cubensis*, DQ648529 *Vag. taunaysii*, KM489499 *Sa. plebeia*, และ KY774830 *L. alte* คือ ทากบกสปีชีส์อื่น และสกุลอื่นในวงศ์เดียวกันจากฐานข้อมูล NCBI และ MN528062 *Onchidium melakense* เป็น outgroup ซึ่งเป็นทากในวงศ์ Onchidiidae

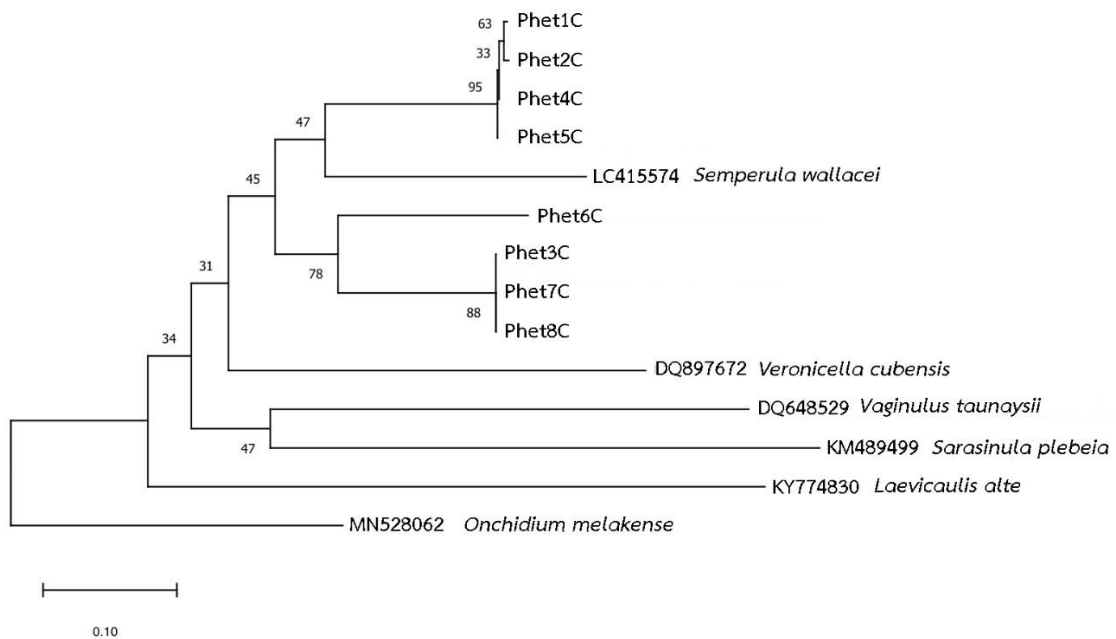
ผลการวิเคราะห์ค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทากบกที่เก็บมาจากจังหวัดเพชรบุรี กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของทากบกสปีชีส์อื่น และสกุลอื่นในวงศ์เดียวกันจากฐานข้อมูล NCBI พบว่า ในเคลดที่ 1 ตัวอย่างทากบกที่มีเพนีสรูปแบบ acropleurocaulis (Phet1C, Phet2C, Phet4C และ Phet5C) สปีชีส์ *Val. siamensis* มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์อยู่ระหว่าง 0.00%-0.30% ในเคลดที่ 3 ตัวอย่างทากบกที่มีเพนีสรูปแบบ pleurocaulis (Phet3C, Phet6C, Phet7C, Phet8C) สปีชีส์ *Se. thailandensis* มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์อยู่ระหว่าง 0.00%-12.18% เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างทากบกที่มีเพนีสรูปแบบ acropleurocaulis (เคลดที่ 1) กับตัวอย่างทากบกที่มีเพนีสรูปแบบ pleurocaulis (เคลดที่ 2 และ 3) พบว่าค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 14.04%-15.83% (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 7 ลักษณะเพนีสรูปแบบ acropleurocaulis ของตัวอย่างทากบก Chan1E ในทิศทางต่าง ๆ ซึ่งมี ส่วนของโครงสร้างเสริมคล้ายกับรังผึ้ง (honeycomb formation; hc) A1: ด้านซ้าย A2: ด้าน dorsal และ A3: ด้าน ventral (*= ตำแหน่งรูเปิดของ vas deferens)



ภาพที่ 8 ลักษณะเพนีสรูปแบบ pleurocaulis ในทิศทางต่าง ๆ A1-A3: เพนีสของตัวอย่างทากบก Phet3C (A1: ด้านซ้าย, A2: ด้าน dorsal, A3: ด้าน ventral) B1-B3: เพนีสของตัวอย่างทากบก Phet6C (B1: ด้านซ้าย, B2: ด้าน dorsal, B3: ด้าน ventral) C1-C3: เพนีสของตัวอย่างทากบก Phet8C (C1: ด้านซ้าย, C2: ด้าน dorsal, C3: ด้าน ventral) (*= ตำแหน่งรูเปิดของ vas deferens)



ภาพที่ 9 แผนภูมิไฟโลเจเนติกส์แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีความเป็นไปได้สูงสุด (maximum likelihood) ของตัวอย่างทากบกที่เก็บมาจากจังหวัดเพชรบุรีโดยการจัดจำแนกจากลักษณะของเพนีสกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของทากบกสปีชีส์อื่น และสกุลอื่นในวงศ์เดียวกันจากฐานข้อมูล NCBI โดยตัวเลขที่แสดงบนปม (node) คือ ค่าความเชื่อมั่นของแผนภูมิไฟโลเจเนติกส์ (bootstrap) ซึ่งค่าที่มากกว่า 70% จะถือว่าสนับสนุนการจัดกลุ่มประชากรนั้น ๆ

ตารางที่ 4 สปีชีส์ของตัวอย่างหากบกที่จำแนกได้จากลักษณะของเพนีส

รหัสตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	รูปแบบเพนีส	สปีชีส์
Chan1E	วัดแหลมเสด็จ จ.จันทบุรี	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Chan3E	วัดแหลมเสด็จ จ.จันทบุรี	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Chan4E	วัดแหลมเสด็จ จ.จันทบุรี	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
ChiangM1N	วัดถ้ำกลบ จ.เชียงใหม่	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
ChiangM2N	คุณใหม่บ้านสวน จ.เชียงใหม่	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
ChiangM3N	คุณใหม่บ้านสวน จ.เชียงใหม่	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
ChiangM4N	คุณใหม่บ้านสวน จ.เชียงใหม่	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
ChiangM5N	ถ้ำเชียงดาว จ.เชียงใหม่	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
ChiangM6N	ถ้ำเชียงดาว จ.เชียงใหม่	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
ChiangR1N	วัดถ้ำป่อม จ.เชียงราย	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
ChiangR3N	วัดถ้ำผาหมี จ.เชียงราย	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Karn1W	เขื่อนศรีนครินทร์ จ.กาญจนบุรี	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Karn4W	ช่องเขาขาด จ.กาญจนบุรี	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Karn5W	ปิ๊ลอก จ.กาญจนบุรี	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
KK1NE	มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Lampang1N	ศาลเจ้าพ่อประตูผา จ.ลำปาง	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Lampoon1N	วัดถ้ำป่าไผ่ จ.ลำพูน	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Lampoon2N	บ้านต่อ จ.ลำพูน	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Ranong1S	บ้านเชิงเขา จ.ระนอง	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Chon2E	เกาะสีชัง จ.ชลบุรี	pleurocaulis	<i>Se. thailandensis</i>
Karn3W	ภูไพรธารน้ำร้อน จ.กาญจนบุรี	pleurocaulis	<i>Se. thailandensis</i>
Phet1C	วัดเขานันไธ จ.เพชรบุรี	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Phet2C	วัดเขานันไธ จ.เพชรบุรี	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Phet3C	วัดเขากระฉิว จ.เพชรบุรี	pleurocaulis	<i>Se. thailandensis</i>
Phet4C	บ้านโอบฟ้า จ.เพชรบุรี	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Phet5C	บ้านโอบฟ้า จ.เพชรบุรี	acropoleurocaulis	<i>Val. siamensis</i>
Phet6C	วัดถ้ำแจรง จ.เพชรบุรี	pleurocaulis	<i>Se. thailandensis</i>
Phet7C	เขาหลวง จ.เพชรบุรี	pleurocaulis	<i>Se. thailandensis</i>
Phet8C	คีรีวงก์ จ.เพชรบุรี	pleurocaulis	<i>Se. thailandensis</i>

ตารางที่ 5 ตารางเปรียบเทียบค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (%) โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทากบกที่เก็บมาจากจังหวัดเพชรบุรีโดยการจัดจำแนกจากลักษณะของ Penis กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของทากบกสปีชีส์อื่น และสกุลอื่นในวงศ์เดียวกันจากฐานข้อมูล NCBI (GenBank)

รหัสตัวอย่าง	Phet1C	Phet2C	Phet3C	Phet4C	Phet5C	Phet6C	Phet7C	Phet8C	LC415574 <i>Semperula wallacei</i>	DQ897672 <i>Veronicella cubensis</i>	DQ648529 <i>Vaginulus taunaysii</i>	KM489499 <i>Sarasinula plebeia</i>	KY774830 <i>Laevicaulis alte</i>	MN528062 <i>Onchidium melakense</i>
Phet1C														
Phet2C	0.30													
Phet3C	14.46	14.76												
Phet4C	0.30	0.30	14.46											
Phet5C	0.30	0.30	14.46	0.00										
Phet6C	15.53	15.83	12.18	15.53	15.53									
Phet7C	14.46	14.76	0.00	14.46	14.46	12.18								
Phet8C	14.46	14.76	0.00	14.46	14.46	12.18	0.00							
LC415574 <i>Semperula wallacei</i>	14.47	14.47	16.38	14.04	14.04	15.11	16.38	16.38						
DQ897672 <i>Veronicella cubensis</i>	18.71	18.71	18.31	18.71	18.71	17.30	18.31	18.31	21.34					
DQ648529 <i>Vaginulus taunaysii</i>	21.27	21.07	22.47	20.87	20.87	24.25	22.47	22.47	23.40	21.93				
KM489499 <i>Sarasinula plebeia</i>	22.53	22.53	23.92	22.18	22.18	24.44	23.92	23.92	22.34	24.00	23.91			
KY774830 <i>Laevicaulis alte</i>	22.90	23.05	22.75	22.75	22.75	23.51	22.75	22.75	22.55	22.54	24.85	26.52		
MN528062 <i>Onchidium melakense</i>	20.96	21.31	20.62	20.96	20.96	21.82	20.62	20.62	21.06	24.35	26.38	23.67	24.05	

บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา

จากการศึกษาตัวอย่างตัวอย่างทากบกทั้ง 8 ตัวอย่างที่เก็บมาจากจังหวัดเพชรบุรี และตัวอย่างทากบกจากพิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 21 ตัวอย่าง พบว่า สันฐานวิทยาภายนอก ได้แก่ ความกว้างของลำตัว ความยาวของลำตัว ความกว้างของแผ่นเท้า และสีบนตัว ไม่สามารถนำมาจัดจำแนกทากบกในวงศ์ Veronicellidae ได้ เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากทั้ง 29 ตัวอย่าง เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันแล้วมีความใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน สำหรับสันฐานวิทยาภายใน ได้แก่ ลักษณะของเพนีส เป็นลักษณะที่สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกได้ โดยรูปแบบเพนีสที่พบในตัวอย่างของประเทศไทยที่มี ณ ปัจจุบัน มี 2 รูปแบบ คือ *acropleurocaulis* และ *pleurocaulis* โดยการกระจายตัวของตัวอย่างทากบกที่มีลักษณะเพนีสแบบ *acropleurocaulis* สปีชีส์ *Val. siamensis* มีการกระจายอยู่ทั่วทุกภาคในประเทศไทย สำหรับการกระจายตัวของตัวอย่างทากบกที่มีลักษณะเพนีสแบบ *pleurocaulis* สปีชีส์ *Se. thailandensis* พบว่ามีการกระจายอยู่ในภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก (ภาพที่ 10) ส่วนในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี พบว่ามีการกระจายตัวของลักษณะเพนีสทั้ง 2 รูปแบบ ซึ่งในการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่พบตัวอย่างทากบกที่มีเพนีสรูปแบบ *acrocaulis* ในประเทศไทยเลย ซึ่งสปีชีส์ที่มีเพนีสรูปแบบนี้คือ *Filicaulis bleekeri* ที่มีการรายงานพบในประเทศไทยไว้ในปี 2004 และจากการศึกษาของ Gomes และ Thomé ก็พบว่าประเทศไทยมีทากบกวงศ์ Veronicellidae จำนวน 3 สกุล 4 สปีชีส์ ได้แก่ *F. bleekeri* (Keferstein, 1865) *Se. maculata* (Templeton, 1858) *Se. thailandensis* (Thomé et al., 1994) และ *Val. siamensis* (Martens, 1867) (ตารางที่ 6) แต่การศึกษาจากตัวอย่างในครั้งนี้พบเพียงแค่ 2 สปีชีส์ ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการสำรวจเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลลักษณะการกระจายตัวของทากบกที่มีรูปแบบเพนีสแบบต่าง ๆ ที่ครอบคลุมมากขึ้น


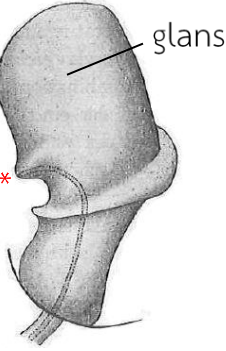
ส่วนการศึกษาด้วยลักษณะทางโมเลกุลของตัวอย่างทากบกที่เก็บมาจากจังหวัดเพชรบุรีโดยการจัดจำแนกจากลักษณะของเพนีส และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (CO I) เปรียบเทียบกับทากบอสปีชีส์อื่น และสกุลอื่นในวงศ์เดียวกันจากฐานข้อมูล NCBI นั้น พบว่าตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบุรีทั้งหมดมีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *Se. wallacei* มากที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างในสกุลอื่น ๆ ที่นำมาวิเคราะห์ร่วมกัน (ภาพที่ 9) ซึ่งในเคลดที่ 1 (เพนีสแบบ *acropleurocaulis* สปีชีส์ *Val. siamensis*) กับ เคลดที่ 2 และ 3 (เพนีสแบบ *pleurocaulis* ประกอบด้วย สปีชีส์ *Se. wallacei* และ สปีชีส์ *Se. thailandensis* ตามลำดับ) มีระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) อยู่ระหว่าง 14.04%-15.83% โดยค่าที่ได้นี้สามารถบ่งบอกถึงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสกุล *Valiguna* และ *Semperula* ใน CO I ยีนได้ และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างเคลดที่ 2 และ เคลดที่ 3 ซึ่งเป็น 2 สปีชีส์ในสกุล *Semperula* เหมือนกัน พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 15.11%-16.38% ซึ่งมีค่าโดยประมาณใกล้เคียงกับค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสกุลที่ได้กล่าวมาแล้ว จากผลการศึกษาในระดับโมเลกุลที่ได้มาเบื้องต้นนี้ทางผู้วิจัยยังคงต้องเพิ่มสปีชีส์อื่น ๆ ใน 2 สกุลนี้เพื่อให้เกิดความชัดเจนเรื่อง

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CO I ยีนในทากบกกลุ่มนี้ต่อไป เพราะจากแผนภูมิไฟโลเจเนติกส์ที่ได้วิเคราะห์มา ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในกิ่งที่ลึกเข้ามาด้านในแผนภูมิ (deep nodes) ยังมีค่าการสนับสนุน Bootstrap support ที่ต่ำอยู่มาก อีกทั้งการศึกษาในครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์ผลจากข้อมูลเพียงยีนเดียว คือยีน CO I ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Gomes และคณะ ในปี 2009 ที่ศึกษาในกลุ่มสกุลในประเทศอเมริกาใต้เป็นหลัก และนำสปีชีส์ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้คือ *Se. wallacei* เป็น outgroup และพบว่าผลการวิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมเฉลี่ยของยีนไมโทคอนเดรีย cytochrome c oxidase subunit 1 (CO I) และ 16S rDNA รวมถึงส่วน internal transcribed spacer 2 (ITS2) ในนิวเคลียสระหว่างสปีชีส์ของทากบกวงศ์นี้นั้น มีค่าประมาณ 6-10% และระหว่างสกุลมีค่าประมาณ 17-20% ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ดังนั้นในอนาคตควรจะต้องมีการศึกษาในยีนอื่น ๆ ของทากบกวงศ์ Veronicellidae ที่พบในประเทศไทยและประเทศในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เพิ่มเติม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและให้สามารถใช้ลักษณะทางโมเลกุลเข้ามาช่วยในการศึกษาวิวัฒนาการและการจัดจำแนกทากบกวงศ์นี้ให้ชัดเจนยิ่งขึ้น

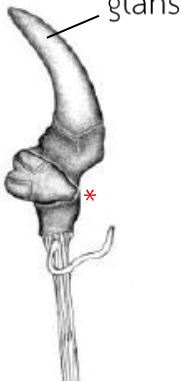
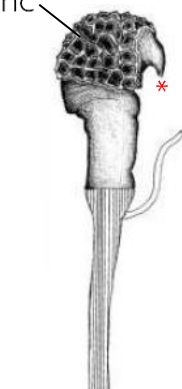


ภาพที่ 10 แผนที่การกระจายของตัวอย่างทากบก 29 ตัวอย่าง ในประเทศไทย

ตารางที่ 6 ตารางเปรียบเทียบลักษณะเพนีสของทากบกที่เคยมีรายงานจากเอกสารว่าพบในประเทศไทย

สปีชีส์	รูปเพนีส	ลักษณะของเพนีส	ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก
<i>Filicaulis bleekeri</i>	 <p>(Grimpe and Hoffmann, 1925)</p>	<p>-เพนีสรูปแบบ arocaulis -มีตำแหน่งรูเปิด (*) ของ vas deferens บริเวณส่วนปลายของเพนีส (Grimpe and Hoffmann, 1925)</p>	<p>-แผ่นลำตัวด้านหลัง (notum) สีน้ำตาล มีจุดสีเข้มขนาดเล็กกระจายเป็นจำนวนมาก (Grimpe and Hoffmann, 1925)</p>
<i>Semperula maculata</i>	 <p>(Grimpe and Hoffmann, 1925)</p>	<p>-เพนีสรูปแบบ pleurocaulis -มีตำแหน่งรูเปิด (*) ของ vas deferens บริเวณฐานของเพนีส -ส่วนของ glans กลมมน (Grimpe and Hoffmann, 1925)</p>	<p>-แผ่นลำตัวด้านหลัง (notum) สีน้ำตาลสว่าง มีจุดสีสว่างขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่ว อาจมีเส้นกลางหลังปรากฏ -แผ่นลำตัวด้านท้อง (hyponotum) สีน้ำตาลอ่อน (Gerlach, 1998)</p>

ตารางที่ 6 ตารางเปรียบเทียบลักษณะเพนีสของทากบกที่เคยมีรายงานจากเอกสารว่าพบในประเทศไทย (ต่อ)

สปีชีส์	รูปเพนีส	ลักษณะของเพนีส	ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก
<i>Semperula tailandensis</i>	 <p>(Gomes, 2007)</p>	<p>-เพนีสรูปแบบ pleurocaulis</p> <p>-มีตำแหน่งรูเปิด (*) ของ vas deferens บริเวณฐานของเพนีส</p> <p>-ฐานเพนีสเป็นทรงกระบอกยื่นมาทางด้านข้าง ล้อมตัวเพนีสและ socket</p> <p>-ส่วนของ glans เป็นทรงกระบอกเรียวยาว</p> <p>(Thomé et al., 1994)</p>	<p>-แผ่นลำตัวด้านหลัง (notum) สีน้ำตาลเข้ม มีจุดสีเข้มขนาดเล็กกระจายเป็นจำนวนมาก ทำให้มองเห็นเหมือนเป็นแถบตามยาวปรากฏอยู่ 2 แถบซ้าย-ขวา คั่นกลางด้วยเส้นกลางหลัง</p> <p>-แผ่นลำตัวด้านท้อง (hyponotum) สีน้ำตาลอ่อนกว่าด้านหลัง มีจุดสีเข้มขนาดเล็กกระจายอยู่เป็นแถบ 2 ข้างซ้าย-ขวาเช่นเดียวกับด้านหลัง</p> <p>(Thomé et al., 1994)</p>
<i>Valiguna siamensis</i>	 <p>(Gomes et al., 2008)</p>	<p>-เพนีสรูปแบบ acropleurocaulis</p> <p>-มีตำแหน่งรูเปิด (*) ของ vas deferens บริเวณฐานของเพนีส</p> <p>-ส่วนของโครงสร้างเสริมคล้ายกับรังผึ้ง (honeycomb formation; hc)</p> <p>(Gomes et al., 2008)</p>	<p>-แผ่นลำตัวด้านหลัง (notum) สีน้ำตาลอ่อนจนถึงเข้ม อาจมีจุดสีน้ำตาลประปราย</p> <p>-แผ่นลำตัวด้านท้อง (hyponotum) มักมีสีอ่อนกว่าด้านหลัง เป็นสีเหลืองอ่อน สีเทาอ่อน หรือ สีขาว (จิรศักดิ์ สุจริต และคณะ, 2551)</p>

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาตัวอย่างทากบกวงศ์ Veronicellidae ที่พบในประเทศไทย โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก ได้แก่ สี ความเข้มจางของสี ลวดลายบนตัว ความยาวและความกว้างของลำตัว ความกว้างของแผ่นเท้า (foot) และลักษณะสัณฐานวิทยาภายใน ซึ่งได้แก่ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้โดยเฉพาะลักษณะของเพนีส เพื่อนำมาใช้ในการจำแนกทากบก พบว่า ลักษณะของเพนีสสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกทากบกในวงศ์นี้ได้ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับข้อมูลทางโมเลกุล โดยในอนาคตอาจมีการศึกษา ลักษณะของเรคูลา (radula), ขากรรไกร (jaw), ตำแหน่งรูเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียในแนวตามขวาง (transverse position of female pore), ตำแหน่งของเส้นประสาทบริเวณเท้า (pedal nerves) และศึกษา ลักษณะทางโมเลกุลในยีนอื่น ๆ เช่น 16s DNA, 16s rDNA, ITS2 เพิ่มเติม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการจัดจำแนกทากบกในวงศ์นี้ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- จิรศักดิ์ สุจจริต, ปิโยรส ทองเกิด และ สมศักดิ์ ปัญหา. 2560. หอยทากบก ทรัพยากรชีวภาพที่ทรงคุณค่าแห่งราชอาณาจักรไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 288 หน้า.
- จิรศักดิ์ สุจจริต, และ สมศักดิ์ ปัญหา. 2551. หอยทากบกในอุทยานแห่งชาติเขานัน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์กรุงเทพ. 112 หน้า.
- Caballero, R., Thomé, J.W., Andrews, K.L. and Rueda, A. 1991. Babosas de Honduras (Soleolifera: Veronicellidae): Biología, Ecología, Distribución, Descripción, Importancia Económica, y Claves para su Identificación. Ceiba. 32(2): 107-126.
- Douglas, M.R. and Tooker, J.F. 2012. Slug (Mollusca: Agriolimacidae, Arionidae) ecology and management in No-Till field crops, with an emphasis on the mid-atlantic region. Journal of Integrated Pest Management. 3(1): 1-9.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research. 32: 1792-1797.
- 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: 294-299.
- Gerlach, J. 1998. The shell-less slugs of Seychelles (Veronicellidae and Urocyclidae). Argonauta 11: 56-64.
- Gomes, S.R. and Thomé, J.W. 2004. Diversity and distribution of the Veronicellidae (Gastropoda: Soleolifera) in the oriental and Australian biogeographical regions. Memoirs of the Queensland Museum. 49(2): 589-601.
- Gomes, S.R. 2007. Filogenia morfológica de Veronicellidae, filogenia molecular de *Phyllocaulis* Colosi e descrição de uma nova espécie para a família (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). (Tese apresentada ao programa de pós-graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul). (Thesis) 175 pp.
- Gomes, S.R., Picanco, J.B., Schilthuizen, M. and Thomé, J.W. 2008. *Valiguna flava* (Heynemann, 1885) from Indonesia and Malaysia: redescription and comparison with *Valiguna siamensis* (Martens, 1867) (Gastropoda: Soleolifera: Veronicellidae). The Veliger. 50(3): 163-170.
- Gomes, S.R., Britto Da Silva, F., Mendes, I.L.V., Thomé, J.W. and Bonatto, S.L. 2009. Molecular phylogeny of the South American land slug *Phyllocaulis* (Mollusca, Soleolifera, Veronicellidae). Zoologica Scripta. 39(2): 177-186.






















- Grimpe, G. and Hoffmann, H. 1925. Versuch einer revision der indischen, Indo-Und polynesischen Vaginuliden (Gastrop. Pulm.). Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie. 124(1): 1-50.
- Hoffmann, H. 1941. Über einige Vaginuliden auf Grund bisher für verschollen gehaltener Typstücke. Zoologischer Anzeiger. 136: 229-242.
- Martens, E.von. 1867. Die Preussische expedition nach Ost-Asien: nach amtlichen quellen. Zoologischer Theil. II Band. Berlin: Verlag der Königlichen geheimen ober-hofbuchdruckerei. 447 pp.
- Morera, P. 1971. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 22(5): 613-621.
- Nantararat, N., Sutcharit, J., Tongkerd, P., Wade, C. M., Naggs, F. and Panha, S. 2019. Phylogenetics and species delimitations of the operculated land snail (Gastropoda: Cyclophoridae) reveal cryptic diversity and new species in Thailand. Scientific Reports. 9: 7041.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution. 35(6): 1547–1549.
- Thomé, J.W., Brites, A.B. and Oliveira-Bonetti, V. C. B. D. 1994. Nova espécie de *Semperula* Grimpe & Hoffmann para a Tailândia (Gastropoda, Veronicellidae). Revista Brasileira de Zoologia. 114: 597-604.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1A ความกว้างของลำตัว ความยาวของลำตัว และความกว้างของแผ่นเท้าของตัวอย่างทากบกทั้ง 29 ตัวอย่าง

รหัสตัวอย่าง	ความยาวของลำตัว (cm)	ความกว้างของ ลำตัว (cm)	ความกว้างของแผ่นเท้า (cm)	รูปแบบเพนีส
Chan1E	4.7	1.7	0.3	acropleurocaulis
Chan3E	4.0	1.5	0.3	acropleurocaulis
Chan4E	4.9	1.7	0.5	acropleurocaulis
ChiangM1N	4.0	1.6	0.4	acropleurocaulis
ChiangM2N	5.7	1.7	0.5	acropleurocaulis
ChiangM3N	6.0	2.1	0.5	acropleurocaulis
ChiangM4N	5.5	2.1	0.5	acropleurocaulis
ChiangM5N	5.0	2.1	0.4	acropleurocaulis
ChiangM6N	4.5	1.8	0.4	acropleurocaulis
ChiangR1N	4.6	1.8	0.4	acropleurocaulis
ChiangR3N	5.4	2.1	0.4	acropleurocaulis
Karn1W	4.5	1.6	0.5	acropleurocaulis
Karn4W	4.7	1.4	0.3	acropleurocaulis
Karn5W	5.6	2.1	0.4	acropleurocaulis
KK1NE	4.5	1.8	0.4	acropleurocaulis
Lampang1N	5.4	2.0	0.3	acropleurocaulis
Lampoon1N	5.4	2.0	0.5	acropleurocaulis
Lampoon2N	4.8	1.5	0.5	acropleurocaulis
Ranong1S	5.3	2.3	0.4	acropleurocaulis
Chon2E	3.2	1.1	0.2	pleurocaulis
Karn3W	3.0	1.2	0.2	pleurocaulis
Phet1C	4.0	1.5	0.4	acropleurocaulis
Phet2C	3.8	1.2	0.3	acropleurocaulis
Phet3C	3.7	1.2	0.2	pleurocaulis
Phet4C	4.7	1.3	0.3	acropleurocaulis
Phet5C	5.1	1.5	0.2	acropleurocaulis
Phet6C	3.3	1.1	0.3	pleurocaulis
Phet7C	3.8	1.1	0.2	pleurocaulis
Phet8C	4.0	1.1	0.2	pleurocaulis

ตารางที่ 2A สีของทาบกบจากแต่ละสถานที่

สถานที่เก็บตัวอย่าง	PANTONE และรหัสสีบน ตัวด้านหลัง (notum)	PANTONE และรหัสสีจุด บนตัว	PANTONE และรหัสสีเส้น กลางหลัง	PANTONE และรหัสสีบนตัว ด้านท้อง (hyponotum)	PANTONE และรหัสสีแผ่นเท้า
วัดเขานันได อ.หนองหญ้าปล้อง	 PANTONE 7567C #864c27	 PANTONE 476C #432c1a	 PANTONE 729 C #b1784d	 PANTONE 7504C #a27e5c	 PANTONE 7515C #c0875c
วัดเขากระจิว อ.ท่ายาง	 PANTONE 728 C #d9a67b	 PANTONE 1545 C #71431f	 PANTONE 727 C #d2af85	 PANTONE 7521 C #b3987b	 PANTONE 4655 C #c59d79
บ้านโอบฟ้ารีสอร์ท อ.แก่งกระจาน	-	-	-	-	-
วัดถ้ำแจ่ง อ.ชะอำ	 PANTONE 7574C #a56f43	 PANTONE 4625C #361d07	 PANTONE 7572 C #ba7844	 PANTONE 4635C #9a6a44	 PANTONE 4645C #b67f58
เขาหลวง อ.เมือง	 PANTONE 728 C #cc9c76	 PANTONE 7533 C #4b3a2a	 PANTONE 472 C #d88f62	-	-
วัดคีรีวงก์ อ.เขาย้อย	 PANTONE 7567 C #8c5439	 PANTONE 732 C #5b2e11	 PANTONE 7591 C #c57d55	-	-