การวิเคราะห์พันธุกรรมของทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ *Parmarion martensi* ในประเทศไทย โดยใช้ยีนไซโทโครมซีออกซิเดสหน่วยย่อยที่หนึ่ง

ศุภกร วงษ์เรืองพิบูล[1*], วิชาญ วรรธนะไกวัล[1], ทัสดาว เกตุเนตร[1] และ สมเกียรติ กล้าแข็ง[1]

[1]กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
*Suphakornwong@gmail.com

บทคัดย่อ

ทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ (*Parmarion martensi*) มีความสำคัญต่อมนุษย์ในเชิงการเกษตรและสาธารณะสุข เนื่องจากเป็นสัตว์ศัตรูพืชของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดในประเทศ และเป็นพาหะของพยาธิ *Angiostrongylus cantonensis* ซึ่งสามารถก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดอีโอซิโนฟิลิก เพื่อที่จะทราบถึงโครงสร้างพันธุกรรมการศึกษานี้จึงใช้ทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ 66 ตัวอย่างทั่วประเทศไทย ทำการเพิ่มปริมาณยีน COI จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์พบค่าความหลากหลายของแฮปโพลไทฟ์ที่สูง และ ความหลากหลายทางนิวคลีโอไทด์ที่ต่ำ (เท่ากับ 0.9120 และ 0.0218 ตามลำดับ) ประกอบกับแผนภูมิ Nested clade analysis ที่มีรูปแบบการจัดกลุ่มที่คล้ายกับมีการกระจายออกจากจุดศูนย์กลางสามารถทำนายได้ว่าประชากรทากเล็บมือนางได้มีการขยายตัวอย่างรวดเร็วหลังจากผ่านปรากฏการณ์คอขวดในอดีต และจากการที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของประชากรทากแต่ละจังหวัดที่ผสมปนเปกันในแผนภูมิ nested clade analysis การวิเคราะห์ Mantel test ที่พบการไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมและระยะห่างทางภูมิศาสตร์ของประชากร (R^2 = -0.00001) รวมถึงการวิเคราะห์ SAMOVA ที่พบความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างทากเล็บมือนางแต่ละตัวภายในประชากรเดียวกันต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง (*p*-value = 0.0000) แต่ไม่พบความแปรผันทางพันธุกรรมเกิดขึ้นระหว่างประชากรที่อยู่ต่างกลุ่มกัน (*p*-value = 0.11046) เป็นหลักฐานที่ชี้บอกได้ดีว่าพันธุกรรมของประชากรทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ในประเทศไทยไม่ได้ขึ้นอยู่กับระยะทาง

คำสำคัญ: ทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ การวิเคราะห์พันธุกรรม ประเทศไทย ไซโทโครมซีออกซิเดสหน่วยย่อยที่หนึ่ง

Genetic analysis of Marten's semi-slug (*Parmarion martensi*) in Thailand using cytochrome C oxidase subunit I Gene

Suphakorn Wongruengpibool[1*], Vichan Watthanakaiwan[1], Thasdow Katenate[1] and Somkiat Klakhaeng[1]

[1]Agricultural zoology research unit, Entomology and Zoology group, Plant Protection Research and Development Office

*Suphakornwong@gmail.com

Abstract

Marten's semi-slug (*Parmarion martensi*) is an important terrestrial gastropod species in agriculture and public health. It is a major economic pest and a vector of the parasite named *Angiostrongylus cantonensis* (rat lungworm), which can cause eosinophilic meningitis in humans. To understand the genetic data of these semi-slugs, 66 samples of *P. martensi* from Thailand were used for amplifying COI nucleotides. Our results found that high haplotype diversity (*h*=0.9120) and low nucleotide diversity (π=0.0218) values were presented, as well as a star-like grouping pattern in the nested clade analysis, suggested that there was a populational expansionof semi-slugs after a bottleneck effect in the past. The results showed mixture of populations in the nested clade analysis, i.e., a non-relationship between genetic distance and geographical distance of Marten's semi-slug populations (R^2=-0.00001). Moreover, significant genetic variation among individuals within each population (*p*-value = 0.0000), including non-significant semi-slug genetic variation of two groups of populations in SAMOVA analysis (*p*-value=0.11046), suggested that the trend of genetic distance of *P. martensi* in Thai populations does not depend on geographical distance.

Keywords: *Parmarion martensi*, Genetic analysis, Thailand, COI gene

1. บทนำ

ทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ *Parmarion martensi* เป็นสัตว์ในกลุ่มหอยฝาเดียว (Gastropoda) ที่อาศัยอยู่บนบกและหายใจด้วยปอด มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญได้แก่ ส่วนเปลือกจะลดรูปกลายเป็นแผ่นเกล็ดสีเหลืองทองอมน้ำตาล รูปร่างคล้ายเล็บมือติดอยู่ที่ด้านบนของตัวทาก โดยจะมีเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิลปกคลุมและเลื่อนเปิด-ปิด ส่วนของเปลือกดังกล่าวได้ ส่วนของลำตัวมีความหลากหลายของสีสันพบได้ตั้งแต่ สีขาวนวล สีเหลือง สีเหลืองอมน้ำตาล น้ำตาลอมดำ ไปจนถึงสีดำสนิท [1] การสืบพันธุ์ทากเล็บมือนางมีสองเพศในตัวเดียวหรือกะเทยเพศ (Hermaphrodite) แต่ไม่สามารถผสมพันธุ์กับตัวเองได้ ต้องจับคู่ทากตัวอื่นเพื่อสืบพันธุ์ จากการศึกษาชีววิทยาทากเล็บมือนาง *Parmarion* ที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันตกของประเทศไทยพบว่า ทากดังกล่าววางไข่เป็นกลุ่มประมาณ 13-69 ฟอง ไข่มีลักษณะรี

และค่อนข้างโปร่งใส เปลือกไข่นิ่มและมักเกาะติดกันเป็นกลุ่ม ใช้เวลาประมาณ 10-17 วันในการฟักตัว อัตราการฟักไข่เฉลี่ยอยู่ที่ 62.6% จากการทดลองเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการทากเล็บมือนางใช้เวลาประมาณ 4 เดือนในการเจริญเติบโตและสืบพันธุ์ได้ มีอัตราการอยู่รอดหลังจากฟักไข่จนถึงโตเต็มวัยเฉลี่ยเท่ากับ 22.95% [2] ทากเล็บมือนางมาร์เทนส์เป็นสัตว์ประจำถิ่นในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่ปัจจุบันกลายเป็นชนิดต่างถิ่นรุกราน (Alien species) สำหรับบางภูมิภาคของโลก โดยพบเป็นศัตรูที่สำคัญของผักตระกูลกะหล่ำ และมะละกอในมลรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศฟิจิ [3] ถิ่นอาศัยของทากชนิดดังกล่าวสามารถพบเจอได้บ่อยในแปลงปลูกพืชที่มีความชื้นสูง พื้นที่เกษตรพืชติดชายป่า รวมถึงเรือนเพาะชำซึ่งมักจะมีความชื้นมาก สามารถพบได้ทั้งในแปลงปลูกกล้วย ไม้ผล และพืชผักหลาย ๆ ชนิด มีการรายงานเกี่ยวกับทากเล็บมือนางสกุล *Parmarion* เป็นศัตรูพืชที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดที่ปลูกในโรงเรือน ได้แก่ ส้มเขียวหวาน หน้าวัว เบญจมาศ กล้วยไม้ และผักชีฝรั่ง [4] เมื่อปี 2555 มีการรายงานการเข้าทำลายพืชสวนกล้วยไม้ แปลงผัก และสวนผลไม้ต่าง ๆ ในภาคกลางและภาคตะวันตกของประเทศไทย [2] และเมื่อปี 2559 กรมวิชาการเกษตร โดยสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชรายงานการพบทากเล็บมือนางอย่างน้อยสองชนิดที่เป็นศัตรูที่สำคัญของกล้วย ได้แก่ *P. setchaunensis* และ *P. siamensis* โดยมีการเข้ากัดกินส่วนใบและหน่อเป็นหลัก [5] นอกจากความสำคัญในเชิงเกษตรกรรมยังพบว่าทากเล็บมือนางมาร์เทนส์มีความสำคัญในเชิงการแพทย์เนื่องจากเป็นพาหะของพยาธิ *Angiostrongylus cantonensis* หรือพยาธิปอดหนูซึ่งสามารถก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดอีโอซิโนฟิลิกในมนุษย์ [6] จากข้อมูลที่กล่าวมาแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ต่อมนุษย์ทั้งในเชิงการเกษตรและการแพทย์แต่อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์ยังขาดข้อมูลทางพันธุกรรมของทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ รวมถึงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ใน GenBank หรือ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ที่มีเฉพาะยีน COI เพียงแค่ลำดับเดียวเท่านั้นซึ่งถือว่าน้อยมาก ดังนั้นเพื่อที่จะทราบลักษณะทางพันธุกรรมรวมถึงสถานภาพของประชากรทากเล็บมือนาง จึงจำเป็นต้องดำเนินการศึกษาผ่านการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมทากชนิดดังกล่าวเพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญในด้านการเกษตรรวมถึงป้องกันและกำจัดในอนาคต

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างทากเล็บมือนางจากจำนวน 66 ตัวอย่างจากพื้นที่อาศัยของทากได้แก่ พื้นที่สวนป่าใกล้ที่อยู่อาศัย แปลงเกษตร จาก 6 จังหวัดทั่วประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดแพร่ที่ตำบลบ้านกลาง อำเภอสอง จำนวน 8 ตัวอย่าง จังหวัดเลยที่ตำบลนาดอกคำ อำเภอนาด้วง จำนวน 12 ตัวอย่าง จังหวัดเพชรบูรณ์ที่ตำบลนาเกาะ อำเภอหล่มเก่า จำนวน 16 ตัวอย่าง จังหวัดนครราชสีมาที่ตำบลหนองสาหร่าย อำเภอปากช่อง จำนวน 9 ตัวอย่าง จังหวัดตราดที่ตำบลด่านชุมพล อำเภอบ่อไร่ จำนวน 9 ตัวอย่าง และจังหวัดพังงาที่ตำบลกระโสม อำเภอตะกั่วป่า จำนวน 12 ตัวอย่าง ตามตารางที่ 1 และภาพที่ 1

ตารางที่ 1 ชื่อพื้นที่การเก็บตัวอย่างทากเล็บมือนาง *Parmarion martensi* ทั้งหมด 6 จังหวัดทั่วประเทศ

ลำดับที่	สถานที่ (ตำบล อำเภอ จังหวัด)	ลักษณะสถานที่	Latitude/Longitude	จำนวน
1	Pare (ต.บ้านกลาง อ.สอง จ.แพร่)	สวนกล้วยติดที่อยู่อาศัย	18.4832, 100.1851	8
2	Loei (ต.นาดอกคำ อ.นาด้วง จ.เลย)	โรงเรือนเพาะเห็ดขอน	17.6230, 101.9625	12
3	Phetchabun (ต.นาเกาะ อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์)	สวนป่าติดที่อยู่อาศัย	16.8324, 101.1848	16
4	Nakhon Ratchasima / Korat (ต.หนองสาหร่าย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา)	ใต้ต้นกล้วยบริเวณโรงเรือนเพาะชำ	14.7733, 101.5174	9
5	Trat (ต.ด่านชุมพล อ.บ่อไร่ จ.ตราด)	สวนป่าติดที่อยู่อาศัย	12.4738, 102.6841	9
6	Phangnga (ต.กระโสม อ.ตะกั่วทุ่ง จ.พังงา)	สวนป่าติดที่อยู่อาศัย	8.4014, 98.4535	12

ภาพที่ 1 (A) แผนที่การเก็บตัวอย่างทากเล็บมือนาง *Parmarion martensi* ทั้งหมด 6 จังหวัด (B) สภาพโรงเรือนเพาะเห็ดขอนหลังฤดูกาลเก็บเกี่ยว ต.นาดอกคำ อ.นาด้วง จ.เลย ซึ่งจะพบทากเล็บมือนางซ่อนตัวอยู่ในถุงก้อนเชื้อเห็ดขอน (C) สภาพสวนป่าติดที่อยู่อาศัยที่พบทากเล็บมือนางใต้ต้นผักขี้นากที่ ต.นาเกาะ อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์ (D) ทากเล็บมือนางที่อาศัยอยู่บนต้นกล้วยที่ ต.ด่านชุมพล อ.บ่อไร่ จ.ตราด

2.2 การสกัดดีเอนเอและการเพิ่มปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์

ดำเนินการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เนื้อเยื่อส่วนเท้า (foot) ของทาก โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Purification Kit ยี่ห้อ Thermo Fisher Scientific เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอของทากที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่ง Cytochrome C oxidase subunit I หรือ COI โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ฟอร์เวิร์ด COI-

1490(5'--- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G ---3') และรีเวิร์ส COI-2198 (5'--- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AATCA ---3') [7] สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ ใช้สารเคมีต่อไปนี้ PCR Master Mix 2X ยี่ห้อ DreamTaq PCR Master Mix, Thermo Scientific ปริมาตร 12.5 µl COI-1490 ปริมาตร 1.5 COI-2198 ปริมาตร 1.5 µl ดีเอ็นเอแม่แบบของทากเล็บมือนาง 2.5 µl น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส 7 µl รวมทั้งหมดได้ปริมาตร 25 µl นำสารเคมีที่กล่าวมาผสมลงในหลอดพีซีอาร์ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง thermocycler ภายใต้การตั้งค่าอุณหภูมิที่มีเงื่อนไขดังนี้ 1.ลำดับขั้น Initial Denaturation ตั้งค่าอุณหภูมิเท่ากับ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที 2.ลำดับขั้น Denaturation ตั้งค่าอุณหภูมิเท่ากับ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 3.ลำดับขั้น Annealing ตั้งค่าอุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 4.ลำดับขั้น Extension ตั้งค่าอุณหภูมิเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ-ขั้นตอนสุดท้าย 5.ลำดับขั้น Final Extension ตั้งค่าอุณหภูมิเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ขั้นตอนที่ 2-4 (Denaturation Annealing และ Extension) ทำซ้ำ 35 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน COI ซึ่งมีความยาวประมาณ 650-700 คู่เบสปรากฏอยู่หรือไม่ ใช้อะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1.5% ต่อ TBE buffer 1X จ่ายกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ผ่านอะกาโรสเจลเป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีเพื่อเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ด้วยเครื่อง Gel Documentation นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated sequencer ที่ให้บริการโดยบริษัทเอกชน นำข้อมูลลำดับที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับทางพันธุกรรมยีน COI ของตัวอย่างทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ *Parmarion martensi* (Accession number: FJ481180) จากไต้หวันที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) สำหรับนิวคลีโอไทด์

2.3 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของทากเล็บมือนางมาร์เทนส์

การเตรียมไฟล์สำหรับการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของทากเล็บมือนางเริ่มจากรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดเข้าด้วยกันเป็นไฟล์เดียวเป็นรูปแบบไฟล์นามสกุล "Fasta file (.fasta)" และ "NEXUS file (.nexus)" และทำการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ก่อนนำไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม ClastalX2 [8] ดำเนินการหาค่าความห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละเส้นสาย (genetic distance) โดยการวิเคราะห์แบบ pairwise distance โดยใช้โปรแกรม MEGA version 11 [9] จากนั้นดำเนินการนำเข้า Fasta file สู่โปรแกรม DNA sequences polymorphism (DNAsp) version 5.10.01 [10] เพื่อแบ่งทากเล็บมือนางเป็นประชากรต่าง ๆ รวมทั้งสร้าง "ARP file (.arp)" พร้อมกับ "HAP file (.hap)" ซึ่งเป็นรูปแบบไฟล์ที่จะนำไปวิเคราะห์ต่อในโปรแกรม ARLEQUIN program version 3.5.1.2 [11] เพื่อวิเคราะห์หาค่า haplotype diversity Nucleotide diversity หาค่า F_{st} เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์แผนภูมิ Isolate by distance (IBD) หรือ Mantel test จากนั้นนำไฟล์ "NEXUS file" ไปทำการวิเคราะห์สร้างแผนภูมิ Nested clade phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม TCS version 1.2.1 [12] และใช้ ARP file และ GEO file วิเคราะห์ SAMOVA หรือ Spatial Analysis of MOlecular Variance โดยใช้โปรแกม SAMOVA version 2.0 [13]

3. ผลการศึกษา

3.1 การศึกษาดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรม

ในการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนิยมใช้ค่า haplotype diversity (*h*) nucleotide diversity ($\boldsymbol{\pi}$), ค่า mean number of pairwise differences ซึ่งแสดงในตารางที่ 2 พบว่าประชากรทากเล็บมือนางจากจังหวัดตราดมีค่าดัชนี *h,* $\boldsymbol{\pi}$ และ mean number of pairwise differences สูงที่สุด (*h* = 1.00, $\boldsymbol{\pi}$ = 0.199 และ mean number of pairwise differences = 20.277) โดยพบ haplotypes ทั้งหมด 9 haplotypes จากตัวอย่างทาก 9 ตัวอย่าง สำหรับประชากรทากเล็บมือนางที่มีดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยที่สุดได้แก่ ประชากรจากจังหวัดนครราชสีมา โดยมีค่าดัชนี *h,* $\boldsymbol{\pi}$ และ mean number of pairwise differences เท่ากับ 0.416 0.017 และ 1.777 ตามลำดับ โดยพบ

haplotype ทั้งหมดเพียง 3 haplotypes จากตัวอย่างทาก 9 ตัวอย่าง ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ดัชนีดังกล่าวรวมทุกประชากรในประเทศไทยพบว่ามีดัชนีค่า haplotype diversity ค่อนข้างสูง (0.912) ค่า nucleotide diversity ค่อนข้างต่ำ (0.0218) และค่า mean number of pairwise differences อยู่ที่ 7.7335

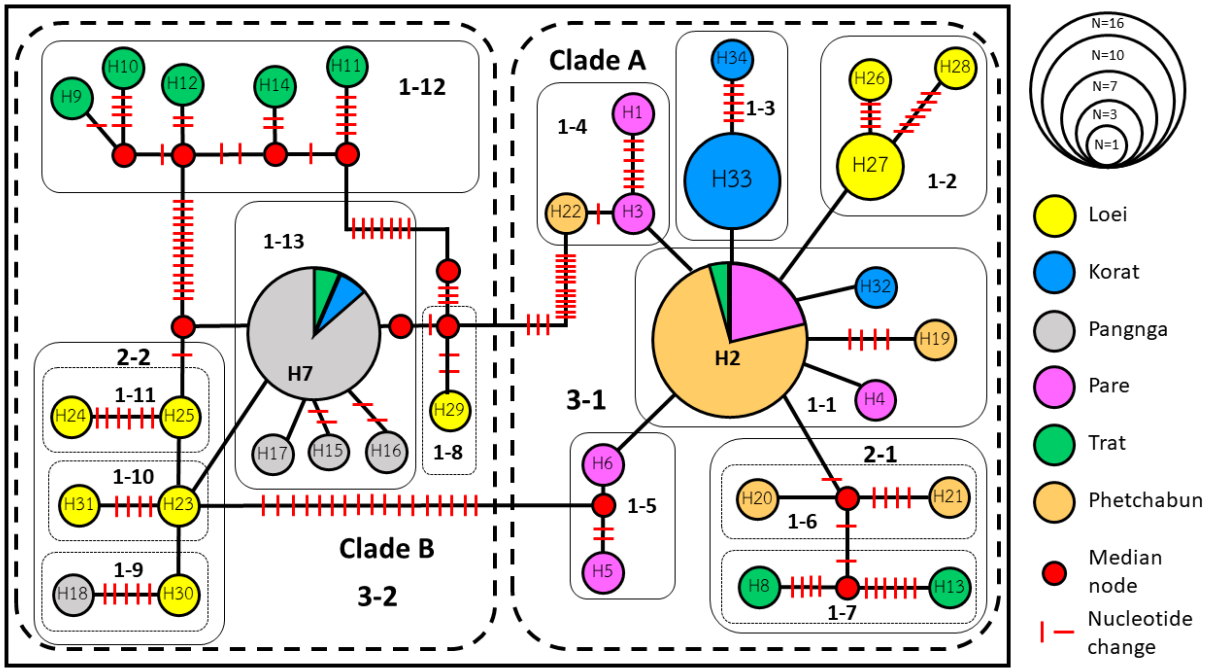
ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่าง ชื่อ Haplotype ที่พบ ค่า Mean pairwise differences Haplotype diversity และ Nucleotide diversity ของประชากรทากเล็บมือนางในแต่ละจังหวัด

ชื่อประชากร (จังหวัด)	จำนวนตัวอย่าง	Haplotype	Mean pairwise differences	Haplotype diversity	Nucleotide diversity
Pare	8	H1 H2 H3 H4 H5 H6	3.857±2.164	0.8929±0.111	0.038±0.024
Loei	12	H7 H23 H24 H25 H26 H27 H28 H29 H30 H31	16.090±7.725	0.9545±0.057	0.158±0.085
Phetchabun	16	H2 H19 H20 H21 H22	1.958±1.169	0.4500±0.151	0.019±0.013
Nakhon Ratchasima (Korat)	9	H32 H33 H34	1.777±1.131	0.4167±0.191	0.017±0.013
Trat	9	H7 H8 H9 H10 H11 H12 H13 H14	20.277±9.913	1.0000±0.052	0.199±0.110
Phangnga	12	H7 H15 H16 H17 H18	2.439±1.419	0.5758±0.163	0.024±0.016
ค่าเฉลี่ย			7.73355	0.9120	0.0218

3.2 การสร้างแผนภูมิ Nested clade analysis

จากการสร้างแผนภูมิ Nested clade analysis โดยใช้ลำดับทางพันธุกรรมยีน COI ของทากเล็บมือนางจำนวน 66 ลำดับ สามารถจัดจำแนกออกได้เป็น 34 haplotypes (ภาพที่ 2) โดย haplotypes ของทากเล็บมือนางมีการแบ่งตัวออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ Clade A ประกอบไปด้วยสมาชิกทากเล็บมือนางทั้งหมด 5 จังหวัด ได้แก่ เลย (5 ตัวอย่าง) นครราชสีมา (9 ตัวอย่าง) แพร่ (8 ตัวอย่าง) ตราด (3 ตัวอย่าง) และเพชรบูรณ์ (16 ตัวอย่าง) โดยพบ haplotype 2 (H2) เป็นจำนวนมากที่สุด (มี 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ และคาดว่า haplotype ดังกล่าวน่าจะเป็นบรรพบุรุษของทากเล็บมือนางในประเทศไทย สำหรับ Clade B ประกอบไปด้วยสมาชิกทากเล็บมือนางทั้งหมด 3 จังหวัด ได้แก่ เลย (7 ตัวอย่าง) พังงา (12 ตัวอย่าง) และตราด (6 ตัวอย่าง) โดยพบ haplotype 7 (H7) เป็นจำนวนมากที่สุดของ clade B (มี 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์) ซึ่งส่วนใหญ่มาจากประชากรของจังหวัดพังงา เพื่อพิจารณาในมุมมองภาพรวมของกลุ่มใหญ่ (Clade A และ Clade B) พบกว่า haplotypes ของทากเล็บมือนางในประเทศไทยมีแนวโน้มที่ลักษณะทางพันธุกรรมค่อนข้างผสมปนเปกัน อย่างไรก็ตามสามารถพบเห็นการแบ่งแยกของประชากรเกิดขึ้นเล็กน้อยภายใน clade เล็ก ๆ ยกตัวอย่างเช่น Clade ย่อย 1-7 และ 1-12 เป็นทากที่มาจากประชากรจังหวัดตราดเท่านั้น Clade ย่อย 1-2 1-10 1-11 เป็นประชากรที่มาจากจังหวัดเลย Clade ย่อย 1-3 เป็นประชากรจากจังหวัดนครราชสีมาและ Clade ย่อย 1-5 เป็นประชากรจากจังหวัดแพร่เท่านั้น นอกจากนี้แผนภูมิ Nested clade analysis ลักษณะของ haplotype ทากเล็บมือนางมีรูปแบบการ

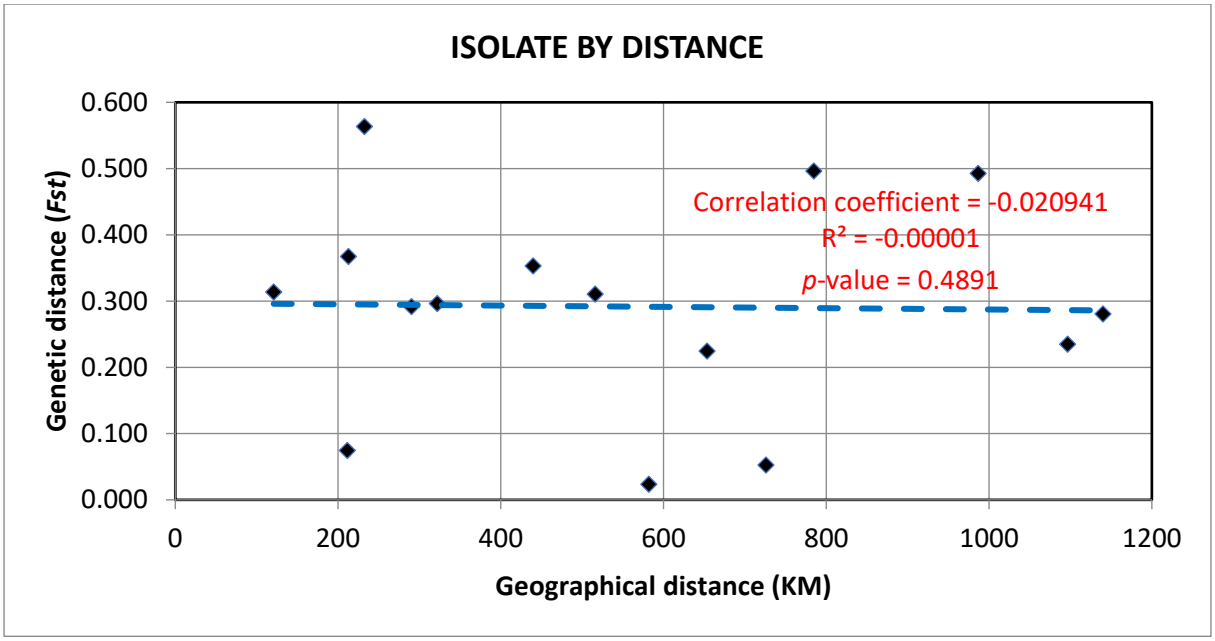
จัดกลุ่มที่คล้ายกับมีการกระจายออกจากจุดศูนย์กลางขนาดใหญ่หรือที่เรียกว่า star-like grouping pattern ออกมาจาก haplotype ที่ 2 และ haplotype ที่ 7



ภาพที่ 2 แผนภาพ Nested clade analysis ที่สร้างจากลำดับพันธุกรรมยีน COI ของทากเล็บมือนาง *P. martensi* ที่มีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย

3.3 การสร้างแผนภูมิ Mantel test (Isolate by distance)

จากภาพที่ 2 แผนภูมิ Isolate by distance (IBD) หรือ Mantel test ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางพันธุกรรมหรือ Genetic distance (ค่า F_{st}) ในแกน Y และระยะห่างทางภูมิศาสตร์ระหว่างประชากรทากเล็บมือนาง (geographical distance) ในแกน X พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์หรือ Pearson correlation value ในภาพที่ 2 เป็นลบ สามารถตีความได้ว่าระยะห่างทางพันธุกรรมของทากเล็บมือนางมีแนวโน้มไม่แปรผันตามระยะห่างทางภูมิศาสตร์ นอกจากนี้กราฟดังกล่าวพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนดที่ใกล้ศูนย์ (r^2 = -0.00001) แสดงให้เห็นถึงความไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างความห่างทางพันธุกรรมและระยะห่างทางภูมิศาสตร์ของทากเล็บมือนาง รวมถึงค่า *p*-value ที่มากกว่า 0.05 ได้สนับสนุนสมมุติฐานว่าง (null hypothesis) ที่ว่าระยะห่างระหว่างประชากรกับความแตกต่างทางพันธุกรรมนั้นไม่ได้มีความสัมพันธ์กันในรูปแบบเส้นตรง



ภาพที่ 2 แผนภูมิ IBD (Isolate by distance) ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยางทางและค่าความห่างทางพันธุกรรม (genetic distance; F_{st}) ของทากเล็บมือนาง *P. martensi* ที่พบในประเทศไทย

3.4 การวิเคราะห์ SAMOVA (Spatial Analysis of MOlecular VAriance)

การวิเคราะห์ SAMOVA เป็นการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรม 3 ระดับ ได้แก่ ระดับสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวภายในประชากรเดียวกัน ระดับระหว่างประชากรภายในกลุ่มประชากรที่โปรแกรมจัดกลุ่มขึ้นมา และระดับระหว่างกลุ่มประชากร เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ AMOVA แต่จะมีความแตกต่างที่สำคัญนั่นคือการวิเคราะห์ AMOVA ผู้วิเคราะห์จะต้องกำหนดกลุ่มประชากรหรือแบ่งภูมิภาคด้วยตนเอง แต่สำหรับ SAMOVA โปรแกรมจะดำเนินการจัดกลุ่มประชากรที่มีพันธุกรรมความคล้ายคลึงกันมารวมไว้ในกลุ่มเดียวกันโดยอัตโนมัติ จากผลการวิเคราะห์ SAMOVA ได้จัดกลุ่มประชากรทากเล็บมือนางออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ประชากร ประกอบด้วยกลุ่มที่ 1 เป็นประชากรจากจังหวัดตราด พังงา และเลย และกลุ่มที่ 2 เป็นประชากรจากจังหวัดแพร่ เพชรบูรณ์ และนครราชสีมา อย่างไรก็ตามพันธุกรรมของทั้งสองกลุ่มประชากร (Among group) ไม่แตกต่างทางสถิติ (percentage of variation = 42.27; *p*-value = 0.11046) แต่เมื่อพิจารณาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรที่ถูกจับอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (Among populations within group) กลับพบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (percentage of variation = 15.75; *p*-value = 0.0000) รวมถึงความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของทากแต่ละตัวอย่างภายในประชากรเดียวกัน (Within populations) ยังคงมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน (percentage of variation = 37.98; *p*-value = 0.0000)

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ SAMOVA เปรียบเทียบความแปรผันทางพันธุกรรมของทากในประเทศไทยระหว่าง 2 กลุ่ม * ประชากรที่ถูกจัดกลุ่มโดยโปรแกรม SAMOVA 2.0 ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มาจากตราด พังงา เลย และกลุ่มที่ 2 มาจากแพร่ เพชรบูรณ์ นครราชสีมา

Source of variation	d.f.	Sum of square	Variance components	Percentage of variation
Among group *	1	170.923	4.52288 Va	42.27 ^{ns}
Among populations within group	4	80.514	1.53903 Vb	15.75 **
Within populations	60	222.734	3.71223 Vc	37.98 **
Total	65	474.170	9.77414	

** Significant (p-value < 0.01); ^{ns} non-significant (p-value > 0.05)

4. อภิปรายผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ค่าดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรมของทากเล็บมือนางในประเทศไทยพบว่ามีค่า haplotype diversity ที่สูง (0.912) และมีค่า nucleotide diversity ที่ต่ำ (0.0218) สามารถอธิบายได้ว่าประชากรทากเล็บมือนางมาร์เทนส์นั้นกำลังขยายตัวอย่างรวดเร็วและเริ่มสะสมความแปรผันทางพันธุกรรมหลังจากผ่านปรากฏการณ์คอขวด (Bottleneck effect) มาแล้วในอดีต [14] นอกจากนี้ลักษณะการจัดกลุ่มของ haplotype ทากเล็บมือนางใน Nested clade analysis ที่คล้ายกับมีการกระจายออกมาจาก haplotype เดียว (จาก haplotype 2 และ haplotype 7) รูปแบบดังกล่าวเรียกว่า star-like grouping pattern เป็นสิ่งที่ชี้บอกเหตุการณ์ในอดีตว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของประชากรทากเล็บมือนางมาร์เทนส์หลังจากผ่านปรากฏการณ์คอขวดเช่นกัน แนวโน้มของค่าดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรมดังกล่าวรวมถึงรูปแบบแผนผัง Haplotype network หรือ Nested clade analysis ที่เป็นแบบ star-like grouping pattern สามารถพบได้ในการรายงานเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์ชนิดอื่น ๆ เช่น การศึกษาพันธุกรรมประชากรหอยดัดดาน (*Sarika siamensis*) ในประเทศไทย [15] ส่วนของยีน COI มีค่า haplotype diversity ที่สูง (0.8609±0.0271) และ nucleotide diversity ที่ต่ำ (0.0180±0.0092) การรายงานเกี่ยวกับพันธุกรรมยีน COI ของประชากรหอยเชอรี่ *Pomacea canaliculata* ในเอเชีย (h = 0.656±0.012, $\boldsymbol{\pi}$ = 0.026±0.013) [16] รวมถึงงานวิจัยเกี่ยวกับพันธุกรรมยีน COI ของประชากรกั้งกระดาน *Thenus indicus* และ *Thenus unimaculatus* ในประเทศไทย [17,18] กั้งกระดานดังกล่าวมีค่า haplotype diversity ที่สูง (*T. indicus* = 0.945±0.013, *T. unimaculatus* = 0.961±0.013) และ nucleotide diversity ที่ต่ำ (*T. indicus* = 0.0034±0.0022 & *T. unimaculatus* = 0.005±0.003)

สำหรับสาเหตุที่ทำให้ประชากรมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังผ่านปรากฏการณ์คอขวดนั้นแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ ยกตัวอย่างเช่น ในประชากรกั้งกระดานสกุล *Thenus* มีสาเหตุการลดลงของระดับน้ำทะเลในอ่าวไทยและทะเลอันดามันอย่างรวดเร็วถึง 130-150 เมตร จากระดับน้ำทะเลในปัจจุบันอันเนื่องมาจากเหตุการณ์ยุคน้ำแข็งใหญ่สุดครั้งสุดท้าย (Last Glacial Maximum) เมื่อประมาณ 20,000 ถึง 15,000 ปีที่แล้วส่งผลให้กั้งกระดานที่มีถิ่นอาศัยอยู่ที่พื้นทะเลในระดับความลึกที่จำเพาะมีที่อยู่อาศัยลดลง [19] ในกลุ่มสัตว์ศัตรูพืช เช่น ประชากรด้วงถั่วเหลือง *Callosobruchus chinensis* ในประเทศจีนที่ผ่านปรากฏการณ์คอขวดอันเนื่องมาจากหลายสาเหตุ ได้แก่ สิ่งกีดขวางทางธรณีวิทยา ความแปรปรวนของสภาพอากาศและการทำการเกษตร [20] ประชากรหอยเชอรี่ในทวีปเอเชียที่ผ่านปรากฏการณ์คอขวดมีสาเหตุมาจากกิจกรรมทางด้านการเกษตรของมนุษย์รวมถึงการใช้สารเคมีกำจัดหอยศัตรูพืช (Molluscicide) ก็มีส่วนทำให้มีการสูญเสียความแปรผันของนิวคลีโอไทด์ในประชากร [16] ดังนั้นการที่ประชากรทากเล็บมือนางในประเทศไทยซึ่งคาดว่าเคยผ่านปรากฏการณ์คอขวดใน

อดีตจึงน่าจะได้รับผลกระทบจากกิจกรรมทางการเกษตรรวมถึงการใช้สารเคมีรุนแรงส่งผลให้ความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรสูญเสียไป

ผลการสร้างแผนภูมิ Nested clade analysis พันธุกรรมของแต่ละประชากรส่วนใหญ่มีแนวโน้มปนกันเนื่องจากไม่มีประชากรจากจังหวัดใดที่จัดกลุ่มแยกตัวออกมาอย่างเด่นชัด (ยกเว้น clade ย่อ 1-12 ซึ่งมีแต่ประชากรจังหวัดตราด) นอกจากนี้การสร้างแผนภูมิ Mantel test หรือ Isolate by distance ถึงแม้ว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของทากจะมีแนวโน้มแปรผันตามระยะห่างทางภูมิศาสตร์ระหว่างประชากร (ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นบวก) แต่ปัจจัยทั้งสองนั้นมีปฏิสัมพันธ์ค่อนข้างน้อย (r square มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0 ถึง 0.49) รวมถึงจากการวิเคราะห์ SAMOVA ที่พบความแปรผันทางพันธุกรรมทากเล็บมือนางแต่ละตัวภายในประชากรเดียวกันเกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Within populations variation = 37.98%; *p*-value=0.0000) มากกว่าความแปรผันที่เกิดขึ้นระหว่างประชากรภายในกลุ่มเดียวกัน (Among populations within group variation = 15.75%; *p*-value=0.0000) นอกจากนี้ความแปรผันระหว่างกลุ่มประชากรยังเกิดขึ้นไม่มากจนมีนัยสำคัญทางสถิติ (Among group variation = 46.27%; *p*-value=0.11046) สามารถบอกได้ว่าระยะห่างทางภูมิศาสตร์อาจไม่ใช่สิ่งที่แบ่งแยกประชากรทากเล็บมือนางแต่ละพื้นที่ออกจากกัน ผลการศึกษาดังกล่าวขัดแย้งกับธรรมชาติของทากเล็บมือนางเนื่องจากเป็นสัตว์ที่เคลื่อนที่ได้ช้า ดังนั้นจึงน่าจะมีบางอย่างเป็นตัวนำพาตัวทากเล็บมือนางให้มีการกระจายพันธุ์ไปตามสถานที่ต่าง ๆ ทั่วประเทศ

มีการศึกษาหลายงานวิจัยที่ได้กล่าวถึงปัจจัยที่จะส่งผลให้เกิดการถ่ายเทเคลื่อนย้ายยีน (gene flow) ของสัตว์ศัตรูพืชมักมีความเกี่ยวข้องกับมนุษย์ ยกตัวอย่างเช่นการเกิดการถ่ายทอดยีนและการตั้งถิ่นฐานใหม่ (colonization) ของประชากรหอยดักดานซึ่งเป็นหอยทากศัตรูพืชเป็นผลจากกิจกรรมการเกษตรของมนุษย์ [21] การศึกษาของ Dumidae *et* al., เมื่อปี 2020 กล่าวว่าน้ำ ลม และปัจจัยทางธรรมชาติอื่น ๆ ส่งผลต่อการกระจายพันธุ์ของหอยดักดาน แต่กิจกรรมของมนุษย์เป็นปัจจัยที่มีผลมากที่สุด [15] แต่ก็มีการรายงานเกี่ยวกับหอยฝาเดียวบางชนิดในบางพื้นที่ก็ไม่ได้พึ่งพามนุษย์เป็นหลักในการกระจายตัวยกตัวอย่างจากการรายงานเกี่ยวกับประชากรหอยอำพันถิ่นเดียว (*Succinea caduca*) วงศ์ Succineidae ที่พบในมลรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่มีการกระจายตัวมาจากสภาวะการเชื่อมต่อระหว่างหมู่เกาะฮาวาย (land-bridge) เมื่อระดับน้ำทะเลลดลงในยุคสมัย Pleistocene รวมถึงปัจจัยจากพายุเฮอริเคน [22] นอกจากนี้สัตว์จำพวกนกก็ยังเป็นปัจจัยสำคัญในการการจายตัวของหอยฝาเดียวในรูปแบบไข่หรือตัวหอยขนาดเล็กโดยเฉพาะหอยในวงศ์ Succineidae อีกด้วย [23] สำหรับสัตว์ศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ เช่นด้วง hemp flea beetle ชนิด *Psylliodes attenuate* ในประเทศจีนซึ่งเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของกัญชามีการกระจายตัวเป็นระยะทางมากกว่า 1,000 กิโลเมตร เนื่องมาจากปัจจัยการเดินทางและการค้าขายของมนุษย์ [24] ซึ่งเป็นระยะทางมากกว่าปัจจัยการบินหรือถูกพัดพาไปด้วยลมพายุ

5. สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมยีน COI ของทากเล็บมือนางจำนวน 66 ตัวอย่างจาก 6 จังหวัดในประเทศไทยพบว่าประชากรทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ในประเทศไทยมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากผ่านปรากฏการณ์คอขวดในอดีต และประชากรทากยังมีพันธุกรรมที่ผสมปนเปกัน นอกจากนี้ปัจจัยระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมและระยะห่างระหว่างประชากรนั้นไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ลักษณะทางพันธุกรรมดังกล่าวคาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากกิจกรรมทางการเกษตรของมนุษย์ การใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์รุนแรงในการกำจัดหอย รวมถึงการขนส่งทางการเกษตร [15, 16, 20, 21] ที่ส่งผลให้ทากเล็บมือนางซึ่งเป็นหนึ่งในสัตว์ศัตรูพืชมีโอกาสกระจายพันธุ์ไปยังพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วประเทศไทย

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณข้าราชการ พนักงานราชการ พนักงานจ้างเหมาทุกท่านในกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตรที่คอยสนับสนุนการทำงานวิจัยของข้าพเจ้าสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอบคุณ ดร. กรวัฒน์ อรรถโสภา จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้คำแนะนำ

เกี่ยวกับการเขียนบทความ และขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยชิ้นนี้

7. เอกสารอ้างอิง

[1] Jirasak Sujarit Piyoros Thongkerd Somsak Panha. (2017). Land snail: the invaluable bio-resources for k ingdom of Thailand. Bangkok: The Thailand Research Fund (TRF). (pp. 165-250). (In Thai)

[2] Piyanee Nukarn Daraporn Rintaruk Chumpoonuch Janyapard. (2010). Biological studies of slug *Parmarion siamensis* (Cockerell, 1891). Annual report of 2010. Plant Protection Research and Development Office. Department of Agriculture. (4th Ed.) pp. 2502-2509. (In Thai)

[3] Brodie, G., & Barker, G. M. (2012). *Parmarion martensi* Simroth, 1893. Family Ariophantidae. 'USP Introduced Land Snails of the Fiji Islands Fact Sheet Series.

[4] Prasarttong promkerd Piyanee Nukarn Daraporn Rintaruk Somkiat Klakhaeng Songtap Keawta. (2011). Species diversity and population of land snail and slug in barn Annual report of 2011. Plant Protection Research and Development Office. Department of Agriculture. (4th Ed.) pp.2502-2509. (In Thai)

[5] Plant Protection Research and Development Office. (2016). *List of insects, mite and other zoological pests of economic plant in Thailand.* Department of Agriculture: Ministry of Agriculture and Cooperatives.

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

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

[8] 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. & Higgins, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. (2007). *Bioinformatics* (23th Ed.) pp. 2947-2948.

[9] Tamura K., Stecher G., & Kumar S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* (38th Ed.) pp. 3022-3027.

[10] Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* (25th Ed.) pp. 1451-1452.

[11] Excoffier, L., & Lischer, H.E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* (10th Ed.) pp. 564-567.

[12] Clement, M., Posada D., & K. A. Crandall. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* (9th Ed.) pp. 1657-1660.

[13] Dupanloup, I., Schneider, S., & Excoffier, L. (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* (11th Ed.) pp. 2571-81.

[14] Grant, W., & Bowen, B. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* (pp. 415-426).

[15] Dumidae, A., Janthu, P., Subkrasae C., Pumidonming, W., Dekumyoy, P., Thanwisai, A., & Vitta, A. (2020). Genetic analysis of *Cryptozona siamensis* (Stylommatophora, Ariophantidae) populations in Thailand using the mitochondrial 16S rRNA and COI sequences. *PLOS ONE* (15th Ed.). e0239264.

[16] Zhao, B., Luo, M., Zhang, J., Liu, Y., Deng, Z., & Gong, X. (2022) Genetic Diversity of Two Globally Invasive Snails in Asia and Americas in Relation with Agricultural Habitats and Climate Factors. *Diversity* (14th Ed.) pp. 1069.

[17] Apinan Iamsuwansuk. (2011). *Genetic diversity of shovel-nosed lobster of the Genus Thenus in Thailand using cytochrome C oxidase subunit I gene.* [Master of Science]. Chulalongkorn University. (In Thai)

[18] Suphakorn Wongruengpibool. (2013). *Genetic diversity of purple-legged shovel-nosed lobster Thenus unimaculatus in Thailand by Mitochondrial gene analysis.* [Master of Science]. Chulalongkorn University. (In Thai)

[19] Tzeng, T. D. (2007). Population structure of the sword prawn (*Parapenaeopsis hardwickii*) (Decapoda: Penaeidae) in the East China Sea and waters adjacent to Taiwan inferred from the mitochondrial control region. *Zoological Studies* (46th Ed.) pp. 561-568.

[20] Wang, F., Li, M., Zheng, H., Dong, T., & Zhang, X. (2022). A Phylogeographical Analysis of the Beetle Pest Species *Callosobruchus chinensis* (Linnaeus, 1758) in China. *Insects*.

[21] Prasankok, P., & Panha, S. (2011). Genetic structure of the common terrestrial pulmonate snail, *Cryptozona siamensis* (Pfeiffer, 1856), in Thailand. *Biochemical Systematics and Ecology* (39th Ed.) pp. 449–457.

[22] Holland, B. S., & Cowie, R. H. (2007). A geographic mosaic of passive dispersal: population structure in the endemic Hawaiian amber snail *Succinea caduca* (Mighels, 1845). *Molecular Ecology* (16th Ed.) pp. 2422–2435.

[23] Gittenberger, E., Groenberg, D. S. J., Kokshoom, B., & Preece, R. C. (2006) Molecular trails from hitch-hiking snails. *Nature*. (pp 439-409).

[24] Guo, L., Gao, F., Cheng, Y., Gao, C., Chen, J., Li, Z., Wang, & T., Xu, J. (2020). Mitochondrial COI Sequence Variations within and among Geographic Samples of the Hemp Pest *Psylliodes attenuata* from China. *Insects* (1st Ed.) pp. 370.