

Analisis Filogenetik *Parmarion martensi* Simroth, 1893 (Gastropoda, Ariophantidae) Dari Pulau Jawa Koleksi Museum Zoologicum Bogoriense Berdasarkan Gen Cox1
(The Phylogenetic Analysis of *Parmarion Martensi* Simroth, 1893 Collections Of The Museum Zoologicum Bogoriense From Java Based On Cox1 Gene)

Ahmad Ghifari Prasetya^{1,2*}, Wawan Hermawan¹, Ayu Savitri Nurinsiyah^{2,3}

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat, 45363, Indonesia

²Masyarakat Moluska Indonesia / Indonesian Malacological Society, Indonesia

³Pusat Riset Biosistemika dan Evolusi, BRIN, Kabupaten Cibinong, Jawa Barat, 16911, Indonesia

*Koresponden authors: ghifariprasetya18@gmail.com

Submit : 1 Maret 2025 Revisi : 3 Februari 2025 Diterima : 24 Maret 2025

ABSTRACT

Parmarion martensi Simroth, 1893, is a snail with a reduced shell, often known as a semi-slug. The species distributed from Southeast Asia to the Hawaiian Archipelago. In Java, two species of *Parmarion* have been identified, distinguished primarily by their genitalia morphology. The study aimed to determine the phylogenetic relationships and genetic distance of *P. martensi* in Java using the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene. Phylogenetic analyses were conducted using Kimura 2-parameter (K2P) genetic pairwise distance, Bayesian Inference (MrBayes), and Maximum Likelihood (IQtree). The specimens studied were obtained from the scientific collections of the Museum Zoologicum Bogoriense. Additionally, four sequences from GenBank and one sequence from BOLD were incorporated for comparison, along with three outgroup taxa. The phylogenetic analysis revealed two clades: Clade A, contains *P. martensi* from Java and Taiwan which confirms the monophyly of *P. martensi*; Clade B, contains *Microparmarion* from Borneo representing other semi-slug taxa. The analysis confirmed the monophyly of *P. martensi*. The genetic distance analysis of *P. martensi* indicates a wide genetic divergence (0 - 10.18%). The genetic distance between *P. martensi* populations in Java and Taiwan is high, ranging from 5.89% to 10.18%. Meanwhile, the genetic distance among *P. martensi* populations within Java suggests that geographic distance does not influence genetic divergence.

Key words: COX1, genetic distance, semi-slug, stylommatophora, land snail.

ABSTRAK

Parmarion martensi Simroth, 1893 adalah siput dengan cangkang tereduksi dan umum dikenal sebagai semi-slug. Distribusi *P. martensi* tersebar dari Asia tenggara hingga kepulauan Hawaii. Sejauh ini, hanya dua spesies *Parmarion* yang teridentifikasi di Pulau Jawa dengan karakter pembeda berdasarkan morfologi genitalia. Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap kekerabatan filogenetik dan jarak genetik *P. martensi* di Jawa berdasarkan gen *mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I* (COX1). Analisis filogenetik menggunakan analisis Kimura 2-parameter (K2P) *genetic pairwise distance*, *Bayesian inference* (MrBayes), dan *maximum likelihood* (IQTree). Spesimen yang ditelaah menggunakan koleksi ilmiah dari Museum Zoologicum Bogoriense (MZB). Selain itu, empat sekuen dari GenBank, dan satu sekuen dari BOLD digunakan untuk komparasi, ditambah dengan tiga taksa outgroup. Berdasarkan hasil rekonstruksi filogenetik, terdapat dua klad yang terbentuk, yaitu klad A yang terdiri dari *P. martensi* dari Jawa dan Taiwan yang menkonfirmasi hubungan monofiletik *P. martensi*; klad B, yang terdiri dari *Microparmarion* dari Borneo sebagai *outgroup semi-slug*. Hasil analisis jarak genetik *P. martensi* menunjukkan jarak genetik yang jauh (0 – 10,18 %). Jarak genetik antara *P. martensi* Jawa dan Taiwan tinggi, berkisar antara 5,89 hingga 10,18%. Sementara itu, jarak genetik *P. martensi* di Jawa menunjukkan bahwa jarak geografis tidak memengaruhi jarak genetik.

Kata kunci: COX1, jarak genetik, semi-slug, stylommatophora, keong darat.

PENDAHULUAN

Keong darat dapat dibagi menjadi tiga kelompok berdasarkan keberadaan cangkangnya. Kelompok pertama adalah keong darat yang memiliki cangkang penuh sehingga badan lunak dari keong dapat masuk sepenuhnya ke dalam cangkang (keong/*snail*). Kelompok kedua yaitu keong darat yang memiliki cangkang tereduksi sehingga badan lunak tidak sepenuhnya terlindungi oleh cangkang (*semi-slug*), dan yang ketiga adalah keong darat yang tidak memiliki cangkang sama sekali (siput/*slug*) (Marwoto *et al.*, 2020).

Parmarion martensi (Gastropoda, Stylommatophora, Ariophantidae) merupakan *semi-slug* yang termasuk ke dalam subfamili Ostracolethinae dengan cangkang kecil tereduksi dan tertutup mantel (Cowie *et al.*, 2018). *P. martensi* memiliki persebaran yang luas mulai dari Kamboja, Malaysia, Vietnam, Taiwan, Sumatra, Kalimantan, Jawa, Taiwan, Singapura, Samoa Amerika, hingga kepulauan Hawaii (Jutting, 1950; Minato, 1975; Minato dan Okubo, 1991; Ho, 1995; Cowie, 1998; Asato *et al.*, 2004; Hollingsworth *et al.*, 2007; Cowie *et al.*, 2018). Spesies ini endemik Asia Tenggara dan keong pendatang di kawasan pasifik dan kepulauan Hawaii (Hollingsworth *et al.*, 2007). *P. martensi* berperan sebagai inang nematoda *Angiostrongylus cantonensis* (Hollingsworth *et al.*, 2007; Cowie *et al.*, 2018) dan menjadi hama pada tanaman *Cucurbitaceae*, *Brassicaceae*, *Asteraceae*, dan *Araceae* (Una dan Wahyuni, 2019).

Terdapat 2 spesies *Parmarion* di Pulau Jawa, yaitu *Parmarion pupillaris* Humbert, 1864 dan *P. martensi* Simroth, 1893. Determinasi kedua spesies tersebut menggunakan morfologi dan berdasarkan anatomi ukuran panjang genitalia jantan (Jutting, 1950). Belum ada studi filogenetik *Parmarion martensi* dari Pulau Jawa hingga saat ini. DNA barkoding terutama dengan menggunakan COX1 telah digunakan untuk mengungkap filogenetik Gastropoda, termasuk filogenetik Ariophantidae (*Euplecta*, *Parmarion*, *Marcrochlamys*, *Janbinmorpha*, *Ariophanta*, *Hemiplecta*, dan lainnya) (Hebert *et al.*, 2003; Schilthuizen *et al.*, 2018; Pholyotha *et al.*, 2024). Namun terdapat permasalahan pada ambang batas diversitas genetik intraspesies Stylommatophora dengan menggunakan COX1 yang umumnya berkisar 3-4%, sedangkan pada beberapa kasus Stylommatophora memiliki ambang batas intraspesies berkisar 10–30% (Davison *et al.*, 2009). Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengungkap filogenetik dan diversitas genetik *Parmarion martensi* dari Pulau Jawa berdasarkan spesimen koleksi yang disimpan di Museum Zoologicum Bogoriense menggunakan region gen COX1.



Gambar 1. Siput *Parmarion martensi* Simroth, 1893

MATERI DAN METODE

Sampel, Ekstraksi DNA, dan Amplifikasi PCR

Penelitian ini dilakukan pada Juli – September 2024 di Pusat Riset Biosistemika dan Evolusi, Kawasan Sains dan Teknologi Dr. (HC) Soekarno, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). Spesimen *Parmarion martensi* yang digunakan merupakan koleksi ilmiah dari Pulau Jawa yang disimpan di Museum Zoologicum Bogoriense (MZB) BRIN. Terdapat enam sampel *P. martensi* yang berasal dari Jawa Barat dan Jawa Timur serta 8 *reference sequences* yang diperoleh dari GenBank (Tabel 1). Sampel diawetkan berdasarkan Protokol Sokolov (2000) dengan menggunakan sampel kaki yang disimpan dalam isopropanol 96% pada suhu – 20°C (Sokolov, 2000) sebelum dilakukan ekstraksi DNA.

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan DNeasy Kit Blood and Tissue berdasarkan Protokol Qiagen *Spin column* (Qiagen, 2023). Hasil ekstraksi dielusi menggunakan buffer AE 100 µl dan disimpan pada suhu – 20°C sebelum diamplifikasi PCR.

Gen parsial COX1 diamplifikasi menggunakan universal primer HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') dan LCO1490 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al. 1994) di dalam 25 µl PCR Mix yang mengandung: 12,5 µl Mytaq Red mix (*Bioline*), 1 µl HCO2198, 1 µl LCO1490, 9,5 µl NFW, dan 1 µl DNA template pada kondisi PCR sesuai dengan Neiber dan Hausdorf (2022). Hasil positif PCR dikirim ke No. Genetika Science untuk dilakukan DNA sekuensing menggunakan *Sanger Sequencing* (Sanger et al., 1977).

Tabel 1. Sekuen COX1 *Parmarion martensi* yang digunakan pada penelitian

No.	Spesies	Lokasi	MZB Voucher	Kode akses
1	<i>Parmarion martensi</i> ^s	Jawa Barat, Kab. Cianjur, Kecamatan Cipanas, Desa Sindangjaya, Cibogo dekat taman sakura S 06°44'20.11" E 107°00'29.43" 1231 mdpl	MZB.Gst.24193	PV176515
2	<i>Parmarion martensi</i> ^s	Pintu Tiga S 06°44'23.72" E 107°00'46.94" dengan ketinggian 1290 m dpl	MZB.Gst.24194	PV176516
3	<i>Parmarion martensi</i> ^a	Jawa Barat, Kab. Bandung, Cagar Alam Kamojang, Kawah Manuk S 07°08'17.39" E 107°48'00.41" 1672 mdpl	MZB.Gst.24195	PV176517
4	<i>Parmarion martensi</i> ^s	Jawa Barat, Kab. Garut, Kec. Bungbulang, Desa Sinarjaya, Gunung Papandayan S 07°18'13.12" E 107°44'45.95" 1848 m dpl	MZB.Gst.24196	PV176520
5	<i>Parmarion martensi</i> ^s	Jawa Barat, Kabupaten Cianjur, Kecamatan Pacet, Taman Nasional Gunung Gede Pangrango Pos Buntut Lutung (Pos 3) S 06°46'34.55" E 106°59'35.30" 2265 mdpl	MZB.Gst.24197	PV176519
6	<i>Parmarion martensi</i> ^s	Jawa Timur, Kab. Banyuwangi, Kec. Licin, Desa Tamansari, Gantasan, Gunung Ijen, S 08°07'40.31" E 114°14'51.95" 959 mdpl	MZB.Gst.24198	PV176518
7	<i>Parmarion martensi</i> ^s	Taiwan	-	FJ481180.1 ¹
8	<i>Parmarion cf martensi</i> ^s	New Taipei City, Wulai District, Taiwan	-	KCAS058-14 ²
9	<i>Microparmarion basifixus</i> ^s	Borneo, Malaysia	-	PP582551 ¹
10	<i>Microparmarion simrothi</i> ^s	Borneo, Malaysia	-	PP582538 ¹
11	<i>Microparmarion pollonerae</i> ^s	Borneo, Malaysia	-	PP582537 ¹
12	<i>Euplecta pingoungensis</i> [*]	Myanmar	-	PQ008994 ¹
13	<i>Macroclamys</i> sp1 [*]	Laos	-	PQ008996 ¹
14	<i>Hemiplecta thailandica</i> [*]	Thailand	-	MT654615 ¹

Keterangan: ^{*}outgroup, ^ssemi-slug, ^kkeong, ¹Genbank, dan ²BOLD,

Analisis Molekuler

Gen parsial COX1 sepanjang 601 *base pair* (bp) dijajarkan (*alignment*) dan dipangkas (*trim*) menggunakan software MEGA 11 dengan program *Clustal W*. Hasil penjajaran diekspor ke dalam format FASTA (.*fas*) untuk analisis filogenetik dan format MEG (.*meg*) untuk analisis jarak genetik K2P.

A. Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan analisis *Maximum Likelihood* (ML) dan *Bayesian Inference* (BI). Analisis ML dilakukan dengan program IQTree v2.4.6 dengan model (kodon pertama F81+F; kodon kedua GTR + F + G4; dan kodon ketiga HKY + F + G4) berdasarkan rekomendasi Model Finder (Minh et al., 2022). Nilai dukungan dihitung dengan *bootstrap* 1000x.

Analisis BI dijalankan dengan program MrBayes v3.2.7 Windows edition (Ronquist et al., 2020). Proses pencarian *Metropolis Couple Monte Carlo Markov Chain* (MC³) dijalankan dalam 500.000 generasi dengan *prior default*, sampel pohon diambil setiap 1000 generasi dengan model evolusi berdasarkan rekomendasi ModelFinder (kodon pertama F81+F; kodon kedua GTR + F + G4; dan kodon ketiga HKY + F + G4) (Minh et al). Hasil analisis ML dan BI dipetakan pada *Bayesian 50% majority rule consensus tree* dengan program Sumtrees v4.6.1 (Sukumaran and Holder, 2012). Nilai dukungan PP ≥ 50 and BS ≥ 50 divisualisasikan dengan Figtree v.1.4.4.

B. Analisis Jarak Genetik

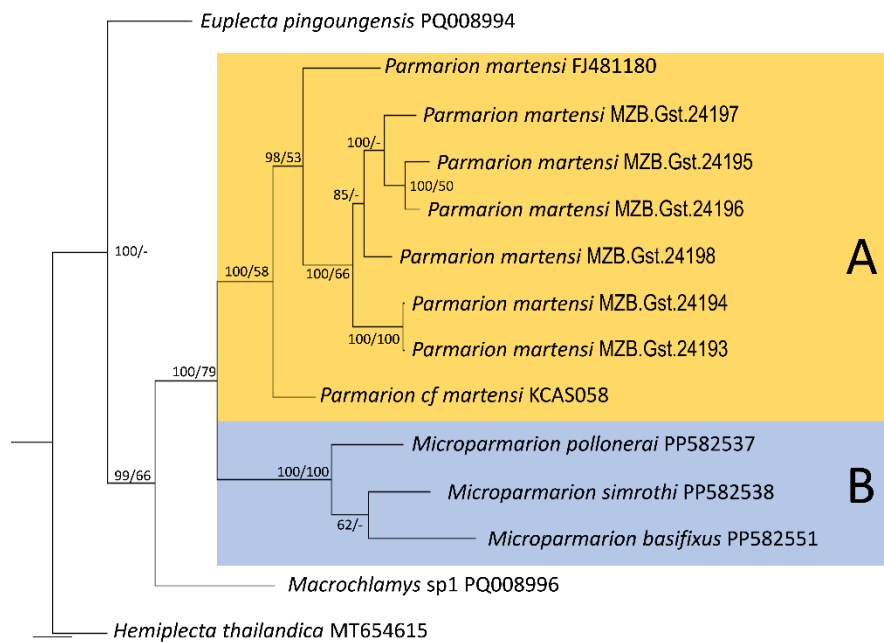
Jarak genetik dianalisis menggunakan program MEGA 11: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11* (Tamura et al., 2021). Analisis jarak genetik dengan program *genetic pairwise distance* dan model yang digunakan Kimura 2-Parameter (K2P) (Davison et al., 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Filogenetik

Berdasarkan hasil analisis filogenetik BI dan ML *Parmarion martensi*, didapatkan 2 klad utama (Gambar 1), yaitu klad A dan klad B. Klad A terdiri dari *Parmarion martensi* yang berasal dari Jawa hasil koleksi MZB dan Taiwan. Klad ini membentuk monofiletik antara 8 sampel tersebut dengan *statistical support* PP = 100 dan BS = 53. *P. martensi* Cibodas (MZB.Gst.24193 dan MZB.Gst.24194) terpisah dengan *P. martensi* Jawa Barat lainnya, yaitu yang berasal dari Garut (MZB.Gst.24195 dan MZB.Gst.24196) dan Gunung Gede Pangrango (MZB.Gst.24197) dengan *statistical support* PP = 100 dan BS = 66. Sedangkan, *P. martensi* yang berasal dari Garut dan Gunung Gede Pangrango berkerabat lebih dekat dengan *P. martensi* Jawa Timur (MZB.Gst.24198) dengan *statistical support* PP = 85 dan BS = -. Kemudian, *P. martensi* Taiwan (PP = 98, BS = 53) dan *P. cf martensi* Taiwan (PP = 100, BS = 58) berkerabat jauh dengan *P. martensi* Jawa namun masih berada dalam klad yang sama. Terdapat kemungkinan *P. cf martensi* Taiwan adalah *P. martensi* karena satu klad dengan *P. martensi*. Kemudian, topologi dalam penelitian Schilthuizen et al. (2019) menunjukkan bahwa filogenetik antara *Parmarion martensi* Taiwan dan *P. cf martensi* berkerabat dekat.

Klad B membentuk monofiletik tiga spesies *Microparmarion* Borneo yaitu *M. pollonerai*, *M. simrothi*, *M. basifixuds*. *M. simrothi* berkerabat dekat dengan *M. basifixus* dengan *statistical support* PP = 62 dan BS = -. Sedangkan, *M. pollonerai* terpisah secara filogenetik dengan kedua spesies *Microparmarion* Borneo dengan *statistical support maximum* (PP = 100; BS = 100) yang mendukung kredibilitas topologi.



Gambar 1. Bayesian 50% Majority-rule consensus tree. Nilai pada node: posterior probability dari analisis BI (Kiri); bootstrap support dari analisis ML (kanan).

Analisis Jarak Genetik

Jarak genetik *Parmarion martensi* berdasarkan analisis K2P *genetic pairwise distance* dengan software MEGA 11 menunjukkan jarak genetik yang jauh. Spesimen *P. martensi* asal Jawa Barat (MZB.Gst.2193 – MZB.Gst.2197) memiliki jarak genetik berkisar 0 – 4.82 %. Sedangkan, jika dibandingkan jarak genetik dengan spesimen *P. martensi* Jawa Timur (MZB.Gst.2198), ditemukan diversitas genetik berkisar 3.59 – 4.83%. Meskipun *P. martensi* Jawa Timur terpisah secara geografis dengan Jawa Barat, diversitas genetik tersebut masih lebih dekat dengan *P. martensi* dari Garut dan Gunung Gede Pangrango (MZB.Gst.2195 – MZB.Gst.2197) berkisar 3.59 – 4.82 %. Spesimen *P. martensi* yang berasal dari Cibodas (MZB.Gst.2193 dan MZB.Gst.2194) hanya identik dari lokasi yang sama dan memiliki jarak genetik yang lebih jauh dengan spesimen yang berasal dari Jawa Barat lainnya, yaitu berkisar 4.64 – 4.82%. Jarak genetik *P. martensi* Taiwan dan *P. cf martensi* sebesar 7.9%. Jika dibandingkan dengan spesimen Jawa, jarak genetik *P. martensi* Taiwan berkisar 5.89 – 10.18%.

Tabel 2. Jarak Genetik K2P *genetic pairwise distance* *Parmarion martensi* berdasarkan gen COX1

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	<i>Parmarion martensi</i> MZB.Gst.23193													
2	<i>Parmarion martensi</i> MZB.Gst.23194	0.00%												
3	<i>Parmarion martensi</i> MZB.Gst.23195	4.82%	4.82%											
4	<i>Parmarion martensi</i> MZB.Gst.23198	4.83%	4.83%	4.50%										
5	<i>Parmarion martensi</i> MZB.Gst.23197	4.64%	4.64%	3.60%	4.49%									
6	<i>Parmarion martensi</i> MZB.Gst.23196	4.64%	4.64%	2.20%	3.59%	3.42%								
7	<i>Parmarion martensi</i> FJ481180	8.64%	8.64%	10.18%	8.27%	9.22%	8.84%							
8	<i>Parmarion cf martensi</i> KCAS058	7.15%	7.15%	6.61%	6.98%	6.79%	5.89%	7.90%						
9	<i>Microparmarion basifux</i> PP582551	14.05%	14.05%	13.85%	13.85%	14.05%	13.05%	17.13%	13.45%					
10	<i>Microparmarion simrothi</i> PP582538	13.05%	13.05%	13.86%	12.66%	14.86%	12.66%	16.09%	13.65%	10.76%				
11	<i>Microparmarion pollonerai</i> PP582537	13.05%	13.05%	13.86%	13.26%	13.65%	13.45%	13.65%	12.27%	10.73%	9.04%			
12	<i>Euplecta pingoungensis</i> PQ008994	11.50%	11.50%	12.07%	12.66%	12.46%	11.88%	13.06%	9.57%	14.26%	15.70%	15.07%		
13	<i>Macrochlamys</i> sp1 PQ008996	11.87%	11.87%	14.45%	14.25%	13.45%	13.85%	13.26%	12.27%	17.13%	16.50%	16.09%	11.88%	
14	<i>Hemiplecta thailandica</i> MT654615	11.88%	11.88%	12.86%	13.45%	13.45%	12.46%	12.86%	12.07%	16.91%	13.85%	14.65%	9.76%	11.88%

Microparmarion seluruhnya berasal dari Borneo dan termasuk ke dalam subfamili Ostracolethinae. Jarak genetik antar spesies pada genus *Microparmarion* yaitu *M. basifux*, *M. simrothi*, dan *M. pollonerai* berkisar 9.04 – 10.76%. Sedangkan, jarak genetik antara genus *Microparmarion* dan *Parmarion* berkisar 12.27 – 16.09%.

Jarak genetik *Parmarion martensi* melebihi ambang batas yang mengacu pada Davison et al. (2009) yaitu berkisar $2.6\% \pm 5.5\%$ SD, meskipun pada beberapa kasus *Stylommatophora* ditemukan kasus ambang batas yang jauh berkisar 10 – 30 % pada intra spesies. Jarak genetik antar spesies pada genus *Microparmarion* berada di dalam ambang batas ($11.8\% \pm 7.6\%$ SD) (Davidson et al., 2009). Hal ini menunjukkan bahwa *P. martensi* memiliki jarak genetik yang jauh yaitu berkisar 6.61 – 10.18% dan tidak dipengaruhi oleh jarak geografis. Hasil analisis haplotipe *isolate by distance* (IBD) yang dilakukan oleh Wongruengpibool et al. (2023) menunjukkan bahwa jarak antar populasi dan diferensiasi genetik tidak berhubungan, serta analisis *Spasial Varians Molecular* (SAMOVA) yang menunjukkan terjadi signifikansi diversitas genetik di dalam populasi.

Meskipun penelitian ini menunjukkan hasil yang monofiletik, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membandingkan karakter morfologi, anatomi, dan penambahan region gen lain yang lebih terkonservasi secara komprehensif (contoh: gen 16s rRNA) untuk membandingkan *P. martensi* yang ditemukan di pulau Jawa dengan *P. martensi* Taiwan karena *P. martensi* Jawa terpisah secara filogenetik dengan *P. martensi* Taiwan.

Tingginya diversitas genetik pada siput Ostracolethinae dengan jarak genetik K2P intraspesies *Parmarion martensi* (0 – 10.18%), interspesies genus *Microparmarion* (9.04 – 10.76%), dan intergenus *Parmarion* dan *Microparmarion* (12.27 – 16.09%) menunjukkan bahwa gen COX1 memiliki laju evolusi molekuler yang tinggi. Hal ini mendukung penelitian-penelitian terdahulu pada kasus laju evolusi gen COX1 *Stylommatophora* yang tinggi dan memiliki diversitas genetik yang jauh pada intra spesies, termasuk spesies *Parmarion martensi* (Davison et al., 2009; Wongruengpibool et al., 2023; Davison et al. 2024).

KESIMPULAN

Penelitian kami mengungkapkan bahwa filogenetik *Parmarion martensi* membentuk hubungan monofiletik dan memiliki diversitas genetik yang jauh dengan menggunakan region gen COX1, berkisar 0 – 10.18%. Region gen COX1 pada *P. martensi* Jawa memiliki laju evolusi molekuler yang tinggi dan tidak dipengaruhi oleh jarak geografis. Penelitian lebih lanjut dengan membandingkan karakter morfologi, anatomi, dan penambahan region gen lain diperlukan untuk mengungkap filogenetik dan diversitas genetik *P. martensi* secara lebih jelas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Kelompok Riset Moluska dan Invertebrata Lain, BRIN yang telah membantu selama proses penelitian ini.

DEKLARASI

Penulis mendeklarasikan bahwa penulis tidak memiliki konflik kepentingan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Asato, R., Taira, K., Nakamura, M., Kudaka, J., Itokazu, K., Kawanaka, M. (2004). Laboratory and epidemiology communications: Changing epidemiology of *Angiostrongylus cantonensis* in Okinawa Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 57: 184–186.
- Cowie, R. H. (1997). Catalog and bibliography of the nonindigenous nonmarine snails and slugs of the Hawaiian Islands. *Bishop Museum Occasional Papers*, 50: 1–66.
- Cowie, R. H., Hayes, K. A., Kim, J. Y., Bustamente, K. M., Yeung, N. W. (2018). *Parmarion martensi* Simroth, 1893 (Gastropoda: Ariophantidae), an intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* (rat lungworm), on Maui. *Bishop Museum Occasional Paper*, 123.
- Davison, A., Blackie, R. L. E., Scothern, G. P. (2009). DNA barcoding of stylommatophoran land snails: A test of existing sequences. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1092–1101. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02559.x>
- Davison, A., Chowdhury, M., Johansen, M., Programme, W. S. I. T. O. L., Uliano-Silva, M., & Blaxter, M. (2024). High heteroplasmy is associated with low mitochondrial copy number and selection against non-synonymous mutations in the snail *Cepaea nemoralis*. *BMC Genomics*, 25, 596. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10505-w>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 270, 313–321.
- Ho, W. H. (1995). A review of the land-snail fauna of Singapore. *Raffles Bulletin of Zoology*, 43: 91–113.
- Hollingsworth, R. G., Kaneta, R., Sullivan, J. J., Bishop, H. S., Qvarnstrom, Y., da Silva, A. J., Robinson, D. G. (2007). Distribution of *Parmarion* cf. *martensi* (Pulmonata: Helicarionidae), a new semi-slug pest on Hawai'i Island, and its potential as a vector for human angiostrongyliasis. *Pacific Science*, 6(4): 457–467. [https://doi.org/10.2984/1534-6188\(2007\)61\[457:DOPCMP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2984/1534-6188(2007)61[457:DOPCMP]2.0.CO;2)
- Marwoto, R. M., Heryanto, Isnainingsih, N. R., Mujiono, N., Prihandini, R. (2020). Moluska Jawa. IPB Press. Bogor. 8-11 pp.
- Minato, H. (1975). A new record of *Parmarion martensi* from Ishigaki Island, the Southern Ryukyus, Japan. *Venus*, 34(3–4): 109–111. https://doi.org/10.1894/venusijm.34.3-4_109

- Minato, H., Okubo, K. (1991). A record of *Parmarion martensi* Simroth, 1893 (Pulmonata: Helicarionidae) collected from Taiwan. *The Chiribotan*, 22: 3–4.
- Minh, B. Q., Lanfear, R., Ly-Trong, N., Trifinopoulos, J., Schrempf, D., Schmidt, H. A. (2022). IQ-Tree version 2.2.0: Tutorial and manual phylogenomic software by maximum likelihood. <http://www.iqtree.org>.
- Neiber, M., & Hausdorf, B. (2022). Origin of the introduced German population of *Micropontica caucasica* (A. Schmidt, 1868) and phylogenetic relationships within the genus (Gastropoda: Clausiliidae). *Archiv für Molluskenkunde*, 151(2):141–152.
- Pholyotha, A., Sutcharit, C., Panha, S., Tongkerd, P. (2024). Reassessment and phylogenetic position of the overlooked limacoid land snail *Trochomorpha sculpticarina* Martens, 1883 (Eupulmonata, Ariophantidae) with the description of a new genus. *Zoosystematics and Evolution*, 100(3):1135–1154. <https://doi.org/10.3897/zse.100.129455>.
- Qiagen. (2023). *DNeasy® Blood & Tissue Handbook*. Hilden: Qiagen.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J., Mark, P. V., Teslenko, M., Zhang, C. (2020). MrBayes version 3.2 manual: Tutorials and model summaries. <https://nbisweden.github.io/MrBayes/download.html>.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463–5467.
- Schilthuizen, M., Clavera, A. P., Khoo, M. S., Bondar, C. A., Elder, C. H. S., Bouma, A. M., Eddington, T. D., Reisinger, C., Cosentino, E., Rossato, M., Delledonne, M. (2019). Bringing the lab to the field: A new lowland *Microparmarion* semi-slug (Gastropoda: Ariophantidae) described and DNA-barcoded in the forest. *Journal of Molluscan Studies*, 85: 35–40. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyy052>.
- Sokolov, E. P. (2000). An improved method for DNA isolation from mucopolysaccharide-rich molluscan tissue. *Journal of Molluscan Studies*, 66, 573–575.
- Sukumaran, J., Holder, M. T. (2021). SumTrees: Phylogenetic tree summarization and annotation. <https://jeetsukumaran.github.io/DendroPy/programs/sumtrees.html>.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38: 3022–3027.
- Una, S. S., & Wahyuni, S. (2019). Aktivitas formulasi pestisida nabati pada siput setengah telanjang *Parmarion martensi* (Gastropoda: Ariophantidae). *Agrica*, 12(1):1–11.
- Wongruengpibool, S., Watthanakaiwan, V., Katenate, T., Klakhaeng, S. (2023). Genetic analysis of Marten's semi-slug (*Parmarion martensi*) in Thailand using cytochrome C oxidase subunit I gene. *Proceedings of the 15th NPRU National Academic Conference*, 50