



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การสืบค้นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในส่วนไมโทคอนเดรียไลต์
และเครื่องหมายที่จำเพาะต่อชนิดของหอยเป๋าฮื้อ: พันธุศาสตร์เชิงประชากร
สำหรับการปรับปรุงประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยง

โดย ดร. ศิราวุธ กถินบุหงา และคณะ

31 สิงหาคม 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การสืบค้นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในส่วนไมโครแซทเทลไลต์
และเครื่องหมายที่จำเพาะต่อชนิดของหอยเป่าฮือ: พันธุศาสตร์เชิงประชากร
สำหรับการปรับปรุงประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยง

คณะผู้วิจัย

1. ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา

2. รศ. ดร. อัญชลี ทัศนากจร

สังกัด

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และ
ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทาง
ทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สำนักงานประสานงานวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมเกษตร พืชและสัตว์น้ำ

Executive summary

Project Title: Identification of microsatellite and species-specific markers of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in Thailand: population genetic bases for improving its culture efficiency

Principal investigator: Dr. Sirawut Klinbunga

Position: Researcher 3

Address: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120 and

Center of Excellence for Marine Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10400

Telephone: 02-2185279 Telefax: 02-2547680

e-mail: sirawut@biotec.or.th

Co-investigator: Dr. Anchalee Tassanakajon

Position: Associate Professor

Address: Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

Telephone: 02-2185439 Telefax: 02-2185436

e-mail: Anchalee.K@chula.ac.th

Objectives

To select microsatellite markers which are useful for selective breeding programmes and to identify population- and species-specific RAPD markers of *H. asinina* in Thailand.

Methodology

I. Identification of population- and species-specific markers and determination of genetic diversity of *H. asinina*.

- Selection of RAPD primers illustrating species-specific markers and those suitable for examination of genetic diversity of *H. asinina*.
- Determination of genetic variation levels of abalone (*H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia*) in Thailand using RAPD-PCR and PCR-RFLP of 16S and 18S rDNA.
- Cloning and characterisation of 16S rDNA of representative individuals showing composite haplotypes found in *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia*
- Cloning and characterisation of population-specific (*H. asinina*), region-specific (*H. ovina*) and species-specific RAPD fragments (*H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia*).
- Designation of primer and optimisation of PCR conditions.
- Examination of species-specificity and sensitivity of designed primers.
- Identification species-origin of *H. asinina*-specific primers using DNA template from fresh, frozen, ethanole-preserved, dried and boiled specimens for practical application of primers.

Determination of genetic diversity of the tropical abalone (*H. asinina*) using microsatellites.

- Construction of partial genomic library and selection of recombinant microsatellite clones.
- Determination of microsatellite sequences and designation of primers.
- Optimisation of appropriate PCR conditions for each microsatellite locus.
- Examination of genetic variation levels including sizes, numbers, and frequencies of alleles and heterozygosity of each microsatellite locus in natural populations of *H. asinina* in coastal Thai waters.
- Analysis of data to identify whether population differentiation of *H. asinina* in Thailand is existent and to evaluate the possibility to utilise microsatellite polymorphism in selective breeding programmes of *H. asinina*.

Outputs from the projects

1. Knowledge about genetic diversity and population differentiation of *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* based on 16S and 18S rDNA and RAPD-PCR analyses.
2. Knowledge about genetic diversity and population differentiation of *H. asinina* in coastal Thai waters based on microsatellite analysis.

3. Microsatellite primers that can be applied for breeding programmes of *H. asinina*.
4. Species-specific markers of *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* based on PCR-RFLP of 16S rDNA.
5. Species-specific markers of *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* based on RAPD analysis.
6. DNA markers (PCR-RFLP of 16S rDNA and RAPD-PCR) for differentiation of *H. ovina* originating from the Andaman Sea and the Gulf of Thailand.
7. Simplified species-specific PCR for identification of *H. asinina* and *H. varia* based on 16S rDNA polymorphism.
8. Simplified species-specific PCR for identification of *H. asinina* and *H. varia* using RAPD-derived markers (SCAR markers).
9. Six international papers, 2 international presentations (1 oral and 1 poster presentations) and 4 national presentations (1 oral and 3 poster presentations).

บทคัดย่อ

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าชื่อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ด้วยวิธี PCR-RFLP ของยีน 18S rDNA และ 16S rDNA ซึ่งจากการตัด 18S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I, *Taq* I และ *Hae* III และ 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III และ *Alu* I พบรูปแบบการตัด 12 และ 13 แบบตามลำดับ โดยพบ composite haplotypes ทั้งหมด 49 รูปแบบ และพบว่า composite haplotypes ของ 16S rDNA สามารถตรวจสอบชนิดของหอยเป่าชื่อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้ยังสามารถใช้ composite haplotypes ของ 16S rDNA จำแนกหอยเป่าชื่อ *H. ovina* ที่มาจากทะเลอันดามัน (ABBB) และอ่าวไทย (AAAB และ AABB) ได้อีกด้วย

แผนภูมิ UPGMA ที่สร้างระหว่างระยะห่างทางพันธุกรรมของ composite haplotypes แสดงให้เห็นการแบ่งแยกของ gene pool หอยเป่าชื่อชนิดต่างๆ โดย *H. asinina* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *H. ovina* มากกว่า *H. varia* จากการวิเคราะห์ geographic heterogeneity และ F_{ST} พบโครงสร้างประชากรของหอยเป่าชื่อ *H. ovina* ที่มาจากทะเลอันดามันและอ่าวไทย ($P < 0.0001$) และพบความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *H. asinina* ที่มาจากฟิลิปปินส์และกลุ่มตัวอย่างอื่นๆ ที่ทำการศึกษา

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างของประชากรของ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ด้วยวิธี RAPD-PCR ซึ่งพบว่าหอยเป่าชื่อดังกล่าวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงในทั้ง 3 ชนิด โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมภายใน *H. varia* มีค่าสูงกว่า *H. ovina* และ *H. asinina* ตามลำดับ และไพรเมอร์ OPB01, UBC101, UBC195, UBC197 และ UBC271 แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *H. asinina* ชลรชาติที่มาจากทะเลอันดามัน (HATRAW) และฝั่งอ่าวไทย (HACAME และ HASAME) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$)

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ด้วยไมโครแซเทลไลต์นั้น ได้ทำการสร้างห้องสมุดยีน 3 แบบ ห้องสมุดแรกได้จากการตัดดีเอ็นเอของหอยเป่าชื่อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I ห้องสมุดยีนแบบที่สองได้จากการทำดีเอ็นเอของหอยให้ขาดด้วยการ vortex และ sonication ห้องสมุดยีนแบบที่สามได้จากการตัดดีเอ็นเอของหอยโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะรวมกันสามชนิดคือ *Alu* I, *Rsa* I และ *Hinc* II เมื่อตรวจหาไมโครแซเทลไลต์ด้วยตัวตรวจสอบ (GT)₁₅ พบโคลนที่ให้ผลบวกเท่ากับ 0.2% 0.43% และ 1.46% ตามลำดับ โดยมีไมโครแซเทลไลต์ชนิด perfect, imperfect และ compound ในอัตราส่วนที่เท่ากัน จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไมโครแซเทลไลต์ที่ค้นพบจำนวน 33 ตำแหน่ง สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ได้ 10 คู่ เมื่อทดสอบความหลากหลายของไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 10 ตำแหน่ง (Has1 - 10) จำนวนอัลลีลที่พบอยู่ในช่วง 3 - 26 อัลลีล ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่พบ (observed heterozygosity, H_o) และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่คาดคะเน (expected heterozygosity, H_e) มีค่าอยู่ในช่วง 0.24 - 0.93

ในการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* จำนวน 6 แหล่ง ซึ่งแบ่งเป็นจากธรรมชาติ 3 แหล่ง คือ หอยเป่าฮื้อจากทะเลอันดามันซึ่งเก็บตัวอย่างจากบริเวณเกาะตะลิ่ง จังหวัดตรัง (HATRAW) หอยเป่าฮื้อจากอ่าวไทยซึ่งเก็บตัวอย่างจากบริเวณเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง (HASAME) และจากประเทศกัมพูชา (HACAME) และตัวอย่างหอยเป่าฮื้อจากโรงเพาะเลี้ยง 3 แห่ง ซึ่งมีพ่อแม่พันธุ์มาจากบริเวณเกาะเสม็ดจังหวัดระยอง (HASAMHE) จากประเทศกัมพูชา (HACAMHE) และจากประเทศฟิลิปปินส์ (HAPHIE) โดยใช้ไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาได้ 3 ตำแหน่ง คือ Has2, Has3 และ Has8 พบว่าค่าเฉลี่ยของ effective number of alleles (n_e) และเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o) ของตัวอย่างหอยเป่าฮื้อธรรมชาติจากอ่าวไทย (HASAME = 7.66, 0.78 และ 0.86 และ HACAME = 9.37, 0.62 และ 0.88) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงกว่าหอยเป่าฮื้อธรรมชาติจากทะเลอันดามัน (HATRAW = 6.04, 0.58 และ 0.62)

เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อตรวจสอบโครงสร้างประชากรของ *H. asinina* ไม่พบความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญของกลุ่มตัวอย่างหอยเป่าฮื้อภายในอ่าวไทย ($P > 0.0027$) แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างหอยเป่าฮื้อธรรมชาติจากอ่าวไทย (HASAME และ HACAME) และทะเลอันดามัน (HATRAW)

ทำการพัฒนาเครื่องหมายที่จำเพาะต่อชนิดของหอยเป่าฮื้อ โดยนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอของตัวแทนหอยเป่าฮื้อที่มี composite haplotype AAAA และ AAAB ซึ่งพบใน *H. asinina* AAAB, AABB และ ABBB ซึ่งพบใน *H. ovina* และ AABC, BABC, BABD, BABF และ BABG ซึ่งพบใน *H. varia* มาโคลน ลำดับนิวคลีโอไทด์ และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ ซึ่งสามารถพัฒนา species-specific PCR ใน *H. asinina* และ *H. varia* โดยมีความไวของการตรวจสอบประมาณ 25 pg และ 50 pg ของดีเอ็นเอต้นแบบจาก *H. asinina* และ *H. varia* ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์พันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าฮื้อด้วยวิธี RAPD-PCR พบเครื่องหมาย RAPD ที่จำเพาะต่อชนิดจำนวน 15 เครื่องหมาย เครื่องหมาย RAPD ที่จำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างจำนวน 6 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย RAPD ขนาด 1650 bp ที่จำเพาะต่อ *H. ovina* ที่มาจากอ่าวไทย จึงทำการพัฒนาเครื่องหมาย SCARs โดยการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย RAPD ดังกล่าว ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 20 คู่ และทำการตรวจสอบความจำเพาะเบื้องต้น ($N = 12$ และ 4 สำหรับตรวจสอบ target species และ non-target species ตามลำดับ)

ซึ่งพบว่าไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ (CUHA1, CUHA2, CUHA4, CUHA11, CUHA12, CUHA13 และ CUHA14) แสดงความจำเพาะต่อ *H. asinina* ในขณะที่ CUHO3 และ CUHV1 แสดงความจำเพาะต่อ *H. ovina* และ *H. varia* ตามลำดับ จึงตรวจสอบความจำเพาะของ CUHA2, CUHA12, CUHA13, CUHO3 และ CUHV1 กับตัวอย่างจำนวนมาก ($N = 111, 73$ และ 32 สำหรับ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ตามลำดับ) ซึ่งผลการศึกษาพบความจำเพาะของเครื่องหมาย SCARs ที่พัฒนาขึ้นใน *H. asinina*

(CUHA2, CUHA12 และ CUHA13) และ *H. varia* (CUHV1) ซึ่งมีความไวของการตรวจสอบที่ดี (20 pg ของดีเอ็นเอต้นแบบจาก *H. asinina* และ *H. varia* สำหรับ CUHA12 และ CUHV1 และ 100 pg สำหรับCUHA2) เครื่องหมายSCARs ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์แบบต่างๆของ *H. asinina* ได้อย่างถูกต้อง

ABSTRACT

Genetic diversity of abalone in Thailand; *Haliotis asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* were analysed by PCR-RFLP of 18S and 16S rDNAs. Restriction analysis of 18S (nuclear) rDNA with *Alu* I, *Taq* I and *Hae* III and 16S (mitochondrial) rDNA with *Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III and *Alu* I gave 12 and 13 digestion patterns, respectively. A total of 49 composite haplotypes were found. Composite haplotypes of 16S rDNA could differentiate *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* unambiguously. In addition, differentiation of *H. ovina* from the Andaman Sea (ABBB) and the Gulf of Thailand (AAAB and AABB) could also be carried out by PCR-RFLP of 16S rDNA.

A UPGMA dendrogram constructed from genetic distance between pairs of composite haplotypes revealed reproductively isolated gene pools of these abalone and indicated that *H. asinina* and *H. ovina* are genetically closer than *H. varia*. Disregarding *H. varia* due to small sample sizes, geographic heterogeneity analysis and F_{ST} estimate indicated clear genetic differentiation between *H. ovina* originating from the Andaman Sea (west) and the Gulf of Thailand (east, $P < 0.0001$) whereas partial differentiation was observed between the Philippines and the remaining *H. asinina* samples ($P < 0.0021$).

Genetic diversity and population differentiation of the tropical abalone (*H. asinina*) were also analysed RAPD-PCR. Based on restriction analysis, a lack of population differentiation was observed between natural *H. asinina* samples in coastal Thai waters ($P > 0.0083$). Conversely, RAPD analysis using primers OPB11, UBC101, UBC195, UBC197 and UBC271 illustrated significant differentiation between natural *H. asinina* from the Andaman Sea (HATRAW) and the Gulf of Thailand (HASAME and HACAME) ($P < 0.0001$).

Three partial genomic libraries were constructed from *Alu* I-digested, vortexed/sonicated and mixed enzyme (*Alu* I, *Hinc* II and *Rsa* I) digested genomic DNA of *H. asinina* and yielded the percentage of microsatellite containing clones of 0.20%, 0.42% and 1.46%, respectively. Eleven clones each of perfect, imperfect and compound microsatellites were isolated. Ten locus-specific primer pairs (Has1 - Has10) were analyzed to evaluate their polymorphic levels.

The numbers of alleles per locus, observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity were 3 - 26 alleles, 0.27 - 0.85 and 0.24 - 0.93, respectively. Three microsatellite loci (Has2, Has3 and Has8) were further used for examination of genetic diversity and differentiation of natural *H. asinina* in coastal waters of Thailand. The effective number of alleles (n_e), H_o and H_e of HACAME (9.37, 0.62 and 0.88) and HASAME (7.66, 0.78 and 0.86) from the Gulf of Thailand were greater than those of HATRAW (6.04, 0.58 and 0.62)

from the Andaman Sea. Genetic heterogeneity and F_{ST} analyses indicated intraspecific population differentiation between natural *H. asinina* from the Gulf of Thailand (HASAME and HACAME) and the Andaman Sea (HATRAW) samples ($P < 0.0001$).

For development of species-specific markers, the amplified 16S rDNA of individuals representing composite haplotypes found in this study (AAAA, AAAE in *H. asinina*; AAAB, AABB and ABBB in *H. ovina* and AABC, BABC, BABD, BABF and BABG in *H. varia*) was cloned and sequenced. A neighbor-joining tree constructed from sequence divergence of 16S rDNA allocated those sequences according to species origins of abalone accurately. Species-specific PCR based on 16S rDNA polymorphism was successfully developed in *H. asinina* and *H. varia* but not in *H. ovina*. The sensitivity of detection was approximately 25 pg and 50 pg for DNA template of *H. asinina* and *H. varia*, respectively.

Species- and population-specific markers of abalone; *Haliotis asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* in Thai waters were also identified based on RAPD analysis. Fifteen species-specific and six population-specific RAPD markers and a 1650 bp band (UBC195) restricted to *H. ovina* from the Gulf of Thailand (east) was found. All specific RAPD markers were cloned and sequenced.

Twenty pairs of primers were designed and specificity-tested ($N = 12$ and 4 for target and non-target species, respectively). Seven primer pairs (CUHA1, CUHA2, CUHA4, CUHA11, CUHA12, CUHA13 and CUHA14) were specifically amplified *H. asinina* DNA whereas a single pair of primers showed specificity with *H. ovina* (CUHO3) and *H. varia* (CUHV1), respectively.

Five primer pairs including CUHA2, CUHA12, CUHA13, CUHO3 and CUHV1 were further examined against 216 individuals of abalone ($N = 111$, 73 and 32, respectively). Results indicated species-specific nature of all except CUHO3 with the sensitivity of detection of 100 pg and 20 pg of the target DNA template for CUHA2 and CUHA12 and CUHV1, respectively. The species-origin of frozen, ethanol-preserved, dried and boiled *H. asinina* specimens could be successfully identified by CUHA2, CUHA12 and CUHA13.

รายละเอียดผลการดำเนินงาน

โครงการ: การสืบค้นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในส่วนไมโทคอนเดรียและ
เครื่องหมายที่จำเพาะต่อชนิดของหอยเป่าชื่อ: พันธุศาสตร์เชิงประชากรสำหรับการ
ปรับปรุงประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยง

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีประโยชน์ต่อ โปรแกรมคัดเลือกเพื่อการผสมพันธุ์
และเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะกับหอยเป่าชื่อชนิด *H. asinina*

แนวทางการวิจัย

-การศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของหอยเป่าชื่อชนิด *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia*

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของหอยเป่าชื่อชนิด *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ด้วยวิธี PCR-RFLP
2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของหอยเป่าชื่อชนิด *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ด้วยวิธี RAPD-PCR
3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของหอยเป่าชื่อชนิด *H. asinina* ด้วย microsatellites

-การพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อหอยเป่าชื่อชนิด *H. asinina* และ *H. varia*

4. การพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อหอยเป่าชื่อชนิด *H. asinina* และ *H. varia* จาก 16S rDNA polymorphism
5. การพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อหอยเป่าชื่อชนิด *H. asinina* และ *H. varia* แบบ SCAR markers

1. การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าฮือ *Haliotis asinina*, *Haliotis ovina* และ *Haliotis varia* ด้วยวิธี PCR-RFLP

1.1 วิธีดำเนินการทดลอง

1.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างหอยเป่าฮือจากธรรมชาติ จากฟาร์มเพาะเลี้ยง และติดต่อสั่งซื้อจากชาวประมงท้องถิ่น ได้จำนวนรวมทั้งสิ้น 331 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นชนิด *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* จำนวน 163, 135 และ 33 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 1.1)

สำหรับหอยเป่าฮือจากธรรมชาติ เก็บตัวอย่างโดยการใช้อุปกรณ์ดำน้ำแบบ SCUBA บริเวณชายฝั่งของเกาะต่าง ๆ ของประเทศไทยทั้งฝั่งอันดามันและอ่าวไทย (รูปที่ 1.1) โดยหอยเป่าฮือชนิด *H. asinina* พบได้ในบริเวณชอกปะการัง ใต้แผ่นปะการังตาย และบริเวณกองหินใต้น้ำที่ไม่ลึกมากนัก หอยเป่าฮือชนิด *H. ovina* มักพบบริเวณชอกปะการังโขด ปะการังเขากวาง ส่วนหอยเป่าฮือชนิด *H. varia* จะพบบริเวณชอกหินบริเวณชายฝั่งระดับน้ำขึ้น-น้ำลง โดย *H. varia* มีรายงานว่าพบเฉพาะในทะเลฝั่งอันดามันเท่านั้น

เมื่อดำน้ำสำรวจพบหอยเป่าฮือแล้วจะค่อย ๆ ใช้ spatula ซึ่งเป็นแผ่นสแตนเลสบางมีด้ามจับ และหอยเป่าฮือให้หลุดออกจากวัสดุที่ยึดเกาะอย่างรวดเร็ว มิฉะนั้นหอยเป่าฮือจะเดินหลบเข้าไปในชอกที่ลึกยิ่งขึ้น หรือเกาะติดกับก้อนปะการังหรือก้อนหินนั้นแน่นมากขึ้น อาจทำให้สูญเสียชีวิตหรือได้ตัวอย่างที่บาดเจ็บในการพยายามจับหอยเป่าฮือออกจากวัสดุนั้น รวบรวมหอยเป่าฮือที่ได้ใส่ถุงอวน และนำมาแขวนเลี้ยงไว้ในทะเลจนกว่าจะนำกลับมายังโรงเพาะเลี้ยง โดยเลี้ยงในภาชนะที่มีน้ำทะเลความเค็มเท่ากับแหล่งที่เก็บมาให้ไหลผ่านตลอดเวลา และให้อาหารธรรมชาติ (สาหร่ายทะเลขนาดใหญ่) หรืออาหารสำเร็จวันละหนึ่งครั้ง ให้อากาศระดับปานกลาง

หอยเป่าฮือชนิด *H. asinina* จากฟาร์มเพาะเลี้ยง ได้ความอนุเคราะห์จากฟาร์มวิจัยโครงการพัฒนาการผลิตหอยเป่าฮือในระบบการทำฟาร์มบนบก (สกว.) ณ สถานีวิจัยสัตว์ทะเลอ่อนศิลา จ. ชลบุรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดย รศ.ดร.เผด็จศักดิ์ จารยะพันธุ์ และภูเก็ตอะบาโลนีฟาร์ม เกาะสิเหร่ จ. ภูเก็ต โดย น.สพ. สิทธิศักดิ์ เหมืองสิน ซึ่งตัวอย่างที่ได้เป็นลูกหอยเป่าฮือจากการเพาะฟักโดยมีพ่อแม่พันธุ์จาก 2 แหล่ง ได้แก่ เกาะเสม็ด จ. ระยอง และเกาะกง ประเทศกัมพูชา นอกจากนี้ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2543 หัวหน้าโครงการได้เดินทางไปประเทศฟิลิปปินส์ จึงเก็บตัวอย่าง *H. asinina* จาก โรงเพาะเลี้ยงที่ Southeast Asian Fisheries Department Center (SEAFDEC) ซึ่งเป็น F₁ โดยมีพ่อแม่พันธุ์ ($N = 200$) ของประเทศฟิลิปปินส์

ตารางที่ 1.1 สถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนเก็บตัวอย่างหอยเป่าชื่อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้

ชนิดของหอยเป่าชื่อและสถานที่เก็บตัวอย่าง	ชื่อกลุ่มตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่เก็บ (จำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษาค้างด้วยวิธี PCR-RFLP)
<i>H. asinina</i>		
โรงเพาะเลี้ยง (พ่อแม่พันธุ์เกาะเสม็ด จ. ระยอง)	HASAMHE	28 (19)
โรงเพาะเลี้ยง (พ่อแม่พันธุ์กัมพูชา)	HACAMHE	15 (15)
เกาะตะลิงบึง จ. ตรัง	HATRAW	28 (28)
เกาะเสม็ด จ. ระยอง	HASAME	19 (12)
กัมพูชา	HACAME	23 (21)
ฟิลิปปินส์	HAPHIE	30 (20)
อินโดนีเซีย	HAINDW	20 (-)
ตัวอย่าง <i>H. asinina</i>		143 (115)
<i>H. ovina</i>		
เกาะค้างคาว อ. เกาะสี่ช้าง จ. ชลบุรี	HOCHOE	29 (24)
เกาะเสม็ด จ. ระยอง	HOSAME	43 (18)
เกาะเชือก จ. ตรัง	HOTRAW	47 (18)
เกาะสิมิลัน จ. พังงา	HOPHAW	16 (11)
ตัวอย่าง <i>H. ovina</i>		135 (71)
<i>H. varia</i>		
เกาะแอล จ. ภูเก็ต	HVPHUW	29 (21)
เกาะสิมิลัน จ. พังงา	HVPHAW	4 (2)
ตัวอย่าง <i>H. varia</i>		33 (23)
รวมตัวอย่างทั้งหมด		331 (209)

1.1.2 การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างหอยเป่าชื่อ

สกัด โครโมโซมดีเอ็นเอจากเนื้อส่วนเท้าหรือจากเลือดของหอยเป่าชื่อด้วยวิธี Phenol/chloroform โดยมีวิธีการพอสังเขปดังนี้ นำเนื้อส่วนเท้า (foot tissue) ของตัวอย่างหอยเป่าชื่อที่เก็บได้ตัดเป็นชิ้นเล็ก (ขนาดประมาณ $1 \times 1 \times 5 \text{ mm}^3$) บดให้ละเอียดในสารละลาย TEN



รูปที่ 1.1 แผนที่ประเทศไทย แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* , *H. ovina* และ *H. varia* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จุดกลมแสดงสถานที่ทางภูมิศาสตร์ของแหล่งที่เก็บตัวอย่าง (ไม่รวมตัวอย่างจากประเทศฟิลิปปินส์) หมายเหตุ เกาะเสม็ด(SAM) อยู่ในจังหวัดระยอง (RAY)

ตารางที่ 1.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR-RFLP

Primer	Sequences
18S rDNA	F : 5' TGG ATC CGG GCA AGT CTG GTG CC 3' R : 5' TGA AGT CAA GGG CAT CAC AGA CC 3'
16S rDNA (16S _{F1} +16S _{R1})	F ₁ : 5' CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT 3' R ₁ : 5' CCG GTC TGA ACT CAG ATC ATG T 3'
16S rDNA (16S _{F1} +16S _{R2})	F ₁ : 5' CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT 3' R ₂ : 5' GGT CTG AAC TCA GAT CAG ATC ACG T 3'
16S rDNA (16S _{F1} +16S _{R3})	F ₁ : 5' CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT 3' R ₃ : 5' CCG GTC TGA ACT CAG ATC AGA TCA CGT 3'
CO I-II	F : 5' TTG ATT TTT TGG TCA TCC AGA AGT 3' R : 5' CCA CAA ATT TCT GAA CAT TGA CC 3'
COI	F : 5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3' R : 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'

buffer ทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลาย 10% SDS ทำลาย RNA ด้วยเอนไซม์ RNase A โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ Proteinase K โดยบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมง สกัดโปรตีนออกด้วยฟีนอล คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล

ทำการวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และ mini-gel electrophoresis โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

1.1.3 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR-RFLP

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ โดยการใช้ไพรเมอร์ต่างๆ ที่สังเคราะห์ขึ้น (ตารางที่ 1.2) ทำการปรับสภาพต่าง ๆ ในปฏิกิริยาเพื่อให้เหมาะสมกับแต่ละคู่ของไพรเมอร์ เช่น ความเข้มข้นของ MgCl₂, ความเข้มข้น dNTPs, ปริมาณไพรเมอร์, ปริมาณเอนไซม์ Taq polymerase, ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ หรืออุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis

1.1.4 ทหาความแตกต่างของซันดีเอ็นเอโดยใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มาย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ แล้วแยกซันดีเอ็นเอที่ ถูกย่อยบน agarose gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการย่อย ซันดีเอ็นเอมีจำนวน 24 เอนไซม์ ได้แก่ *Alu I*, *Hin fI*, *Dra I*, *Taq I*, *Bam HI*, *Hind III*, *Eco RI*, *Rsa I*, *Mbo I*, *Hae III*, *Dde I*, *Acs I*, *Bfr I*, *Swa I*, *Bgl II*, *Nde I*, *Ssp I*, *Cla I*, *Sal I*, *Pst I*, *Kpn I*, *Sma I*, *Bst EII*, และ *Vsp I*

1.1.5 การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าฮื้อ

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮื้อ 3 ชนิด (*H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia*) ด้วยวิธี PCR-RFLP ของ ยีน 18S rDNA โดยย่อยยีน 18S rDNA ด้วยเอนไซม์ *Alu I*, *Taq I* และ *Hae III* และยีน 16S rDNA ด้วย *Alu I*, *Bam HI*, *Eco RI* และ *Hae III* จากนั้นจึงสร้าง composite haplotypes ของหอยเป่าฮื้อแต่ละตัวจากยีน 18S rDNA ที่ย่อยด้วย *Alu I*, *Taq I* และ *Hae III* และยีน 16S rDNA ที่ย่อยด้วย *Bam HI*, *Eco RI*, *Hae III* และ *Alu I* ตามลำดับ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลดังกล่าวโดยคำนวณหาค่า genetic distance (d) ระหว่าง haplotypes โดยใช้โปรแกรม REAP version 4.0 (McElroy และคณะ 1992) นำค่า genetic distance ที่ได้มาทำการสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี UPGMA ด้วย PHYLIP version 3.56 (Felsenstein, 1993) ตรวจสอบ geographic heterogeneity ระหว่างกลุ่มตัวอย่างของหอยเป่าฮื้อด้วย Monte Carlo simulation (Roff และ Bentzen, 1989) ในโปรแกรม REAP 4.0 (McElroy และคณะ 1991) และ F_{ST} statistics (Weir และ Cockerham, 1984) ระหว่างกลุ่มตัวอย่างและชนิดของหอยเป่าฮื้อ โดยใช้โปรแกรม GENEPOP (Raymond และ Rousset, 1995) เพื่อตรวจสอบโครงสร้างประชากรของหอยเป่าฮื้อ

1.2 ผลการทดลองการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าชื่อชนิด *H. asinina* , *H. ovina* และ *H. varia* ด้วยวิธี PCR-RFLP

1.2.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าชื่อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia*

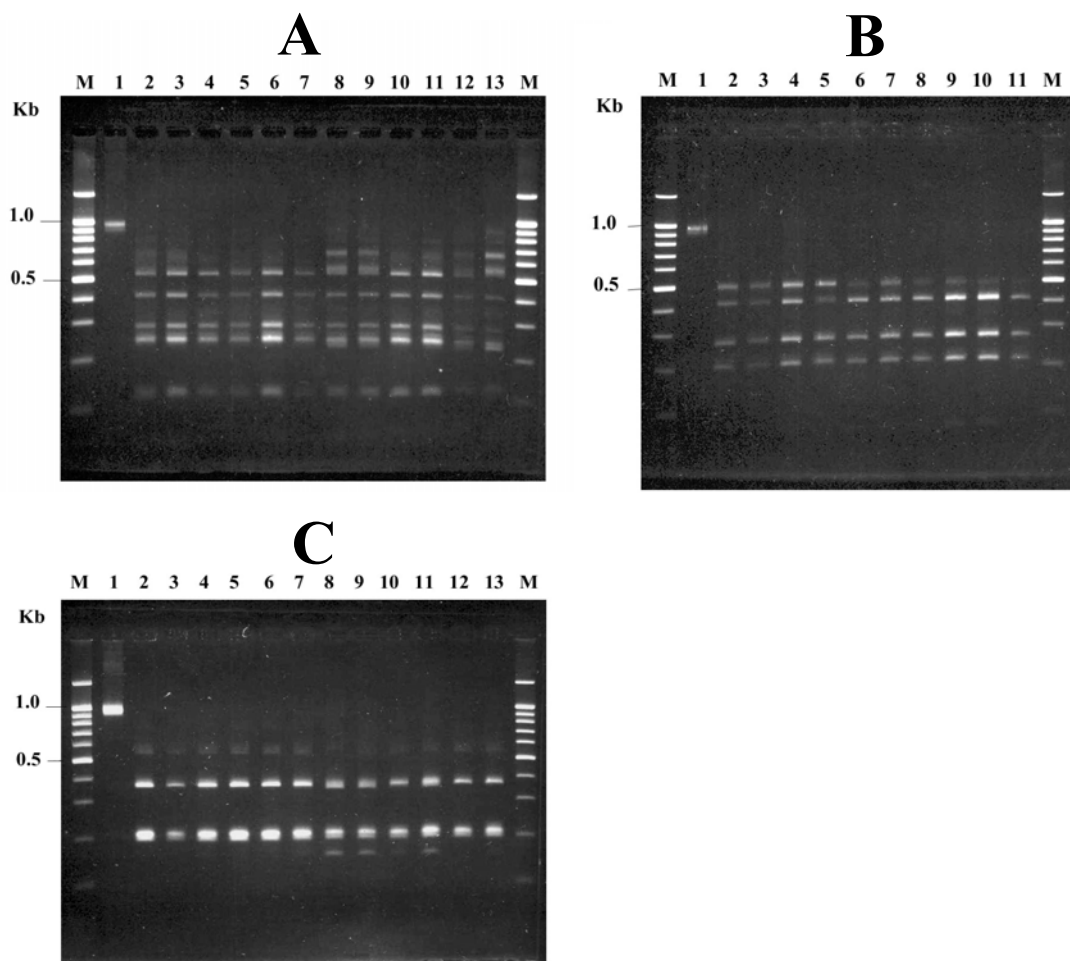
จากการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มจำนวน 18S rDNA (นิวเคลียดีเอ็นเอ) และ 16S rDNA (ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ) ในหอยเป่าชื่อทั้ง 3 ชนิด (*H. asinina* , *H. ovina* และ *H. varia*) โดยตัวอย่างทั้งหมดที่ศึกษาสามารถเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ 18S_F+18S_R และ 16S_{F1}+16S_{R1} ในขณะที่ไพรเมอร์ 16S rDNA คู่อื่น (16S_{F1}+16S_{R2} และ 16S_{F1}+16S_{R3}) ให้ผลเทียบเคียงกัน จึงเลือกใช้ไพรเมอร์ 16S_{F1}+16S_{R1} สำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าชื่อ สำหรับ COI และ COI-COII นั้นไม่สามารถใช้เพิ่มขยายจีนีนดังกล่าวในหอยเป่าชื่อได้

ผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนใน 16S rDNA มีขนาดประมาณ 580 คู่เบส ในขณะที่ผลผลิตของ 18S rDNA มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส และโดยปกติแล้ว จะมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ไม่จำเพาะถูกเพิ่มจำนวนมาด้วย โดยเฉพาะใน *H. ovina* เพราะฉะนั้นจึงนำผลผลิตที่ได้จากมาทำ electrophoresis และทำการชะ ดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างจากเจล ก่อนจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

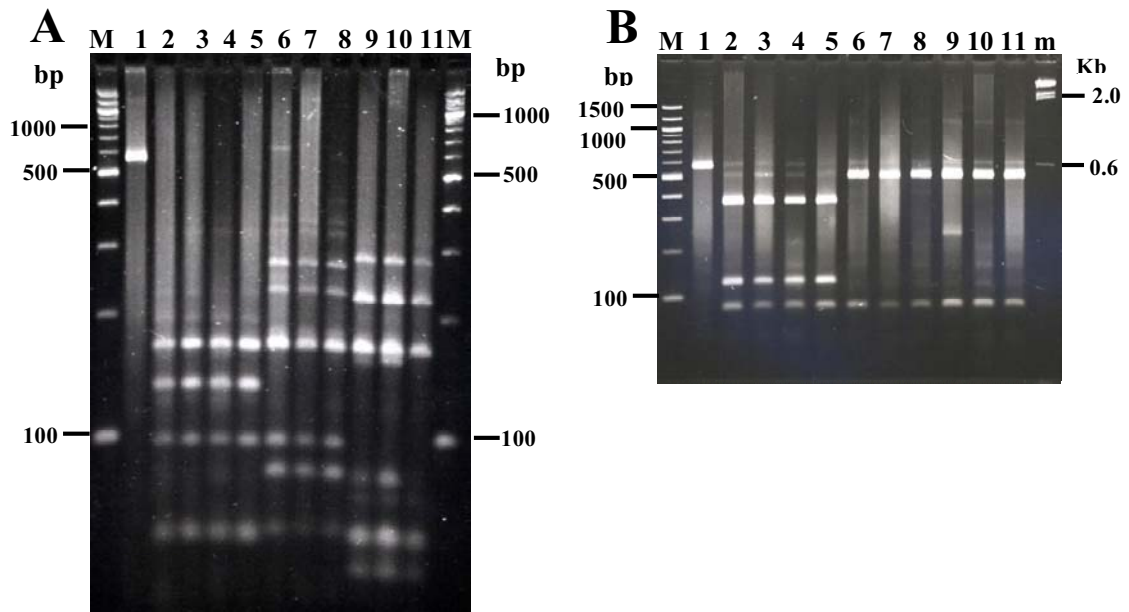
เมื่อนำ 18S และ 16S rDNAs ของ *H. asinina* , *H. ovina* และ *H. varia* มาทดสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 24 เอนไซม์ พบเอนไซม์ 3 ชนิด (*Alu I*, *Taq I* และ *Hae III*) ที่ให้ผล polymorphism ใน 18S rDNA (รูปที่ 1.2) และพบ เอนไซม์ 4 ชนิด (*Bam HI*, *Eco RI*, *Hae III* และ *Alu I*) ที่ให้ผล polymorphism ใน 16S rDNA (รูปที่ 1.3 และ 1.4)

จากการวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างหอยเป่าชื่อจำนวน 209 ตัวอย่าง พบรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 25 รูปแบบ ซึ่งมาจากจากการตัด 18S rDNA ด้วยเอนไซม์ *Alu I*, *Taq I* และ *Hae III* จำนวน 12 รูปแบบ และจากการตัด 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ *Bam HI*, *Eco RI*, *Hae III* และ *Alu I* จำนวน 13 รูปแบบ (ตารางที่ 1.2)

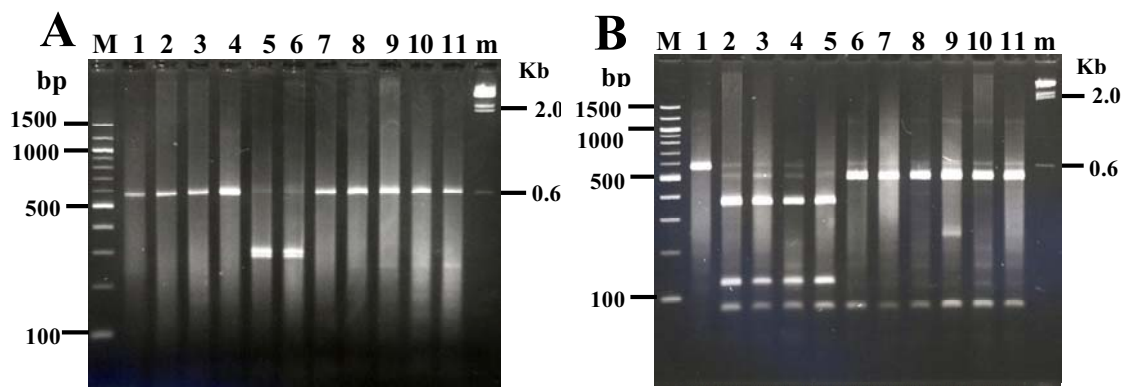
ผลการตัด 18S rDNA ด้วยเอนไซม์ *Alu I* พบ รูปแบบการตัดจำนวน 6 รูปแบบ (A, B, C, D, E และ F) ซึ่งรูปแบบที่ได้จากการตัดในหอยเป่าชื่อ *H. asinina* เกือบทั้งหมดเป็นรูปแบบ B (66.96%) ในขณะที่ตัวอย่างส่วนใหญ่ของ *H. ovina* และ *H. varia* เป็นรูปแบบ A (83.09% และ 43.48% ตามลำดับ) เมื่อตัด 18S rDNA ด้วยเอนไซม์ *Taq I* พบ รูปแบบการตัดจำนวน 4 รูปแบบ (A, B, C และ D) โดยรูปแบบที่พบมากที่สุด ใน *H. asinina* คือรูปแบบ A (75.65%) โดยรูปแบบ B (33.80%) และ C (49.29%) พบมากใน *H. ovina* และรูปแบบ B จะพบมากที่สุด ใน *H. varia* (82.61%) จากการตัด 18S rDNA ด้วยเอนไซม์ *Hae III* พบรูปแบบการตัดจำนวน 2 รูปแบบ โดยรูปแบบ



รูปที่ 1.2 รูปแบบที่ได้จากการตัด 18S rDNA ด้วยเอนไซม์ *Alu* I (รูป A), *Taq* I (รูป B) และ *Hae* III (รูป C) ใน *H. asinina* (ช่อง 2 – 5), *H. ovina* (ช่อง 6 - 9) และ *H. varia* (ช่อง 10 - 13) ช่อง M และ 1 คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 100 คู่เบส และยีน 18 S rDNA ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ (ความยาวประมาณ 900 คู่เบส) ตามลำดับ



รูปที่ 1.3 รูปแบบของการตัดยีน 16S rDNA ของ *H. asinina* (ช่องที่ 2 - 5) *H. ovina* (ช่องที่ 6 - 8) และ *H. varia* (ช่องที่ 9 - 11) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I (A) และ *Hae* III (B) ช่อง M = ดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 100 คู่เบส ช่อง m = แลมด้าดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *Hind* III ช่องที่ 1 = 16 S rDNA ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์



รูปที่ 1.4 รูปแบบของการตัดยีน 16S rDNA ของ *H. asinina* (ช่องที่ 2 - 4) *H. ovina* (ช่องที่ 5 - 6) และ *H. varia* (ช่องที่ 7 - 11) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI (A) และ *Eco* RI (B) ช่อง M = ดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 100 คู่เบส ช่อง m = แลมด้าดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *Hind* III ช่องที่ 1 = 16 S rDNA ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์

ตารางที่ 1.3 รูปแบบของ 18S rDNA และ 16S rDNA ของหอยเป่าอื้อทั้ง 3 ชนิด (*H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia*) ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ

เอนไซม์	รูปแบบ (bp)
18S rDNA	
<i>Alu I</i>	A: 680, 520, 410, 350, 290, 250, 240, 110
	B: 520, 410, 290, 250, 110, 110
	C: 680, 520, 410, 290, 250, 110
	D: 650, 520, 410, 350, 290, 250, 240, 110
	E: 520, 410, 350, 290, 250, 240, 110
	F: 520, 410, 350, 290, 250, 110
<i>Taq I</i>	A: 410, 270, 210, 80
	B: 500, 410, 410, 270, 210, 80
	C: 500, 410, 270, 210, 80
	D: 500, 500, 410, 270, 210, 80
<i>Hae III</i>	A: 390, 210, 200
	B: 390, 210, 200, 180
16S rDNA	
<i>Bam HI</i>	A: 580
	B: 380, 200
<i>Eco RI</i>	A: 580
	B: 300, 280
<i>Hae III</i>	A: 380, 120, 80
	B: 500, 80
<i>Alu I</i>	A: 175, 140, 95, 50
	B: 175, 175, 95, 80, 50
	C: 220, 175, 80, 50, 35
	D: 175, 175, 50
	E: 175, 140, 95, 80, 50
	F: 220, 140, 80, 50, 35
	G: 175, 140, 50, 35

แบบ A จะพบมากใน *H. asinina* และ *H. varia* (94.78% และ 100% ตามลำดับ) แต่รูปแบบ B พบมากใน *H. ovina* (73.24%)

ผลการตัด 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ *Bam* HI ให้รูปแบบ A (580 คู่เบส) และ B (380, 200 คู่เบส) เช่นเดียวกับผลจาก *Eco* RI; A (580 คู่เบส) และ B (380,200 คู่เบส) และ เอนไซม์ *Hae* III; A (380, 120 และ 80 คู่เบส) และ B (500 และ 80 คู่เบส) ตามลำดับ ในขณะที่การตัด 16S rDNA ด้วย *Alu* I พบรูปแบบการตัดจำนวน 7 แบบ (A, B, C, D, E, F และ G) (ตารางที่ 1.3) และสามารถแบ่งแยก *H. asinina* (รูปแบบ A และ E) ออกจาก *H. ovina* (รูปแบบ B) และ *H. varia* (C, D, F และ G)

เมื่อพิจารณาถึงเฉพาะผล PCR-RFLP ของ 16S rDNA จะพบจำนวน composite haplotypes 10 แบบ (ตารางที่ 1.4) โดย *H. asinina* มี 2 composite haplotypes (I, AAAA และ II, AAAE) แต่ haplotypes I จะพบมากกว่า (95.65% ของตัวอย่าง *H. asinina*) composite haplotypes III (ABBB) พบใน *H. ovina* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดมาจากทะเลฝั่งอ่าวไทย (59.15% ของตัวอย่าง *H. ovina* ทั้งหมด) ขณะที่ *H. ovina* ที่มาจากทะเลฝั่งอันดามันทั้งหมดมี composite haplotypes รูปแบบ IV, AAAB (39.44% ของตัวอย่าง *H. ovina* ทั้งหมด) และ V, AABB (1.41% ของตัวอย่าง *H. ovina* ทั้งหมด) ใน *H. varia* พบ composite haplotypes จำนวน 5 แบบ (VI, BABD; VII, BABC; VIII, BABG; IX, BABF และ X, AABC) แต่ composite haplotype VII (BABC) จะพบในตัวอย่างส่วนใหญ่ของตัวอย่าง *H. varia* (60.8%)

เมื่อพิจารณา PCR-RFLP ของ 18S rDNA + 16S rDNA พบรูปแบบ composite haplotypes (18S rDNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I, *Taq* I และ *Hae* III ตามด้วย 16S rDNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI, *Eco*R I, *Hae* III และ *Alu* I) ทั้งหมด 49 composite haplotypes โดยพบ composite haplotypes 15 แบบใน *H. asinina*; I (BBAAAA), II (ACAAAA), III (BCAAAA), IV (BBAAAAE), V (BAAAAA), VI (BAAAAAE), VII (CAAAAA), VIII (AAAAAAA), IX (ABAAAA), X (CABAAAA), XI (EAAAAA), XII (BABAAAA), XIII (AABAAAA), XIV (EBAAAA), และ XV (DBAAAA) 9 composite haplotypes ใน *H. ovina* ที่มาจากทะเลฝั่งอ่าวไทย; XVI (BBAABBB), XVII (ACAABBB), XVIII (ACBABBB), XIX (ADBABBB), XX (DBBABBB), XXI (ABBABBB), XXII (DCBABBB), XXIII (ADAABBB) และ XXIV (ABAABBB) และ 13 composite haplotypes ใน *H. ovina* มาจากทะเลฝั่งอันดามัน; XXV (ABBAAAB), XXVIF (BAAAAB), XXVII (ACBAAAB), XXVIII (FBBAAAB), XXIX (DDBAAAB), XXX (DCBAAAB), XXXI (CBAAAAB), XXXII (BBAAABB), XXXIII (ABAAAAB), XXXIV (ADBAAAB), XXXV (DBAAAAB), XXXVI (ACAAAAB) และ XXXVII (BAAAAB)

ตารางที่ 1.4 ความถี่ composite haplotypes จาก PCR-RFLP ของ 16 S rDNA ในหอยเป่าสี่กลุ่มตัวอย่างต่างๆ

Composite haplotype	<i>H. asinina</i>										<i>H. ovina</i>				<i>H. varia</i>	
	HASAMHE (N=19)	HASAME (N=12)	HATRAW (N=28)	HACAMHE (N=15)	HACAME (N=21)	HAPHIE (N=20)	HOCHOE (N=24)	HOSAME (N=18)	HOTRAW (N=18)	HOPHAW (N=11)	HVPHUW (N=21)	HVPHAW (N=2)				
I AAAA	0.8421(16)	1.0000(12)	0.9286(26)	1.0000(15)	1.0000(21)	1.0000(20)	-	-	-	-	-	-	-			
II AA AE	0.1579(3)	-	0.0714(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
III AB BB	-	-	-	-	-	-	1.0000(24)	1.0000(18)	-	-	-	-	-			
IV AA AB	-	-	-	-	-	-	-	-	0.944 (17)	1.0000(11)	-	-	-			
V AA BB	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0556(1)	-	-	-	-			
VI BA BD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2381(5)	0.5000(1)	-			
VII BA BC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6191(13)	0.5000(1)	-			
VIII BA BG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0476(1)	-	-			
IX BA BF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0476(1)	-	-			
X AA BC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0476(1)	-	-			

HA = *H. asinina*; HO = *H. ovina*; HV = *H. varia*; SAM = เกาะเสม็ด; TRA = เกาะตะลิงตริง; CAMH = หอยจากโรงเพาะฟักที่มีพ่อแม่จากหอย; CAM = กัมพูชา; PHI = ฟิลิปปินส์; CHO = เกาะลี้ซัง ซลบุรี; PHA = เกาะลิมิตัน ฟังงา; PHU = ภูเก็ต

ตารางที่ 1.5 รูปแบบการกระจายของความถี่ของ 18S + 16 S rDNA composite haplotypes ในกลุ่มตัวอย่างต่างๆของหอยเป่าชื่อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia*

Composite haplotypes	<i>H. asinina</i>						<i>H. ovina</i>						<i>H. varia</i>	
	HASAMIE (N=19)	HASAME (N=12)	HATRAW (N=28)	HACAMIE (N=15)	HACAME (N=21)	HAPHIE (N=20)	HOCHOE (N=24)	HOSAME (N=18)	HOTRAW (N=18)	HOPHAW (N=11)	HVPHUW (N=21)	HVPHAW (N=2)		
I	BBAAAA	0.2632(5)	-	-	0.0953(2)	0.1500(3)	-	-	-	-	-	-	-	
II	ACAAAA	0.0526(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
III	BCAAAA	0.0526(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IV	BBAAAAE	0.0526(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
V	BAAAAA	0.4211(8)	1(12)	0.5000(14)	0.4000(6)	0.1500(3)	-	-	-	-	-	-	-	
VI	BAAAAAE	0.1053(2)	-	0.0714(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
VII	CAAAAA	0.0526(1)	-	0.1072(3)	0.0667(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	
VIII	AAAAAAA	-	-	0.1786(5)	0.1333(2)	0.0500(1)	-	-	-	-	-	-	-	
IX	ABAAAA	-	-	0.0357(1)	0.1333(2)	0.3000(6)	-	-	-	-	-	-	-	
X	CABAAAA	-	-	0.0357(1)	0.2000(3)	-	-	-	-	-	-	-	-	
XI	EAAAAAA	-	-	0.0714(2)	0.0476(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	
XII	BABAAAA	-	-	-	0.0667(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	
XIII	AABAAAA	-	-	-	-	0.0500(1)	-	-	-	-	-	-	-	
XIV	EBAAAA	-	-	-	-	0.1500(3)	-	-	-	-	-	-	-	
XV	DBAAAA	-	-	-	-	0.1500(3)	-	-	-	-	-	-	-	
XVI	BBABBB	-	-	-	-	-	0.0417(1)	-	-	-	-	-	-	
XVII	ACAABBB	-	-	-	-	-	0.1666(4)	0.0556(1)	-	-	-	-	-	
XVIII	ACBABB	-	-	-	-	-	0.5833(14)	0.3333(6)	-	-	-	-	-	
XIX	ADBABB	-	-	-	-	-	0.1250(3)	0.2777(5)	-	-	-	-	-	
XX	DBBABB	-	-	-	-	-	0.0417(1)	-	-	-	-	-	-	
XXI	ABBABB	-	-	-	-	-	0.0417(1)	0.1666(3)	-	-	-	-	-	
XXII	DCBABB	-	-	-	-	-	-	0.0556(1)	-	-	-	-	-	
XXIII	ADAABBB	-	-	-	-	-	-	0.0556(1)	-	-	-	-	-	
XXIV	ABAABBB	-	-	-	-	-	-	0.0556(1)	-	-	-	-	-	
XXV	ABBAAB	-	-	-	-	-	-	-	0.3335(6)	0.1818(2)	-	-	-	

ตารางที่ 1.5 (ต่อ)

Composite haplotypes	<i>H. asinina</i>						<i>H. ovina</i>				<i>H. varia</i>	
	HASAMHE (N=19)	HASAME (N=12)	HATRAW (N=28)	HACAMHE (N=15)	HACAME (N=21)	HAPHIE (N=20)	HOCHOE (N=24)	HOSAME (N=18)	HOTRAW (N=18)	HOPHAW (N=11)	HVPHUW (N=21)	HVPHAW (N=2)
XXVI	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0555(1)	-	-	-
XXVII	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2223(4)	0.1818(2)	-	-
XXVIII	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0555(1)	-	-	-
XXIX	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0555(1)	-	-	-
XXX	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0555(1)	-	-	-
XXXI	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0555(1)	-	-	-
XXXII	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0555(1)	-	-	-
XXXIII	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0555(1)	-	-	-
XXXIV	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1112(2)	0.1818(2)	-	-
XXXV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0909(1)	-	-
XXXVI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1818(2)	-	-
XXXVII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0909(1)	-	-
XXXVIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0909(1)	-	-
XXXIX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1429(3)	-
XL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0952(2)	-
XLI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0476(1)	-
XLII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2382(5)	0.5000(1)
XLIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0476(1)	-
XLIV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0952(2)	-
XLV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0476(1)	-
XLVI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0476(1)	-
XLVII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0952(2)	-
XLVIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0476(1)	-
XLIX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0476(1)	0.5000(1)

และ 12 composite haplotypes; XXXVIII (BBABABD), XXXIX (BBABABC), XL (BBABABG), XLI (ABABABC), XLII (DBABABC), XLIII (EAABABC), XLIV (EAABABF), XLV (ABAAABC), XLVI (ACABABC), XLVII (CBABABC), XLVIII (DBABABD) และ XLIX (ABABABD) พบใน *H. varia* (ตารางที่ 1.5)

นอกจากนี้ยังไม่พบการซ้ำซ้อนกัน (overlap) ของ composite haplotypes ระหว่างตัวอย่างหอยเป่าชื่อต่างชนิดกันไม่ว่าจะเป็นการทำ PCR-RFLP ของ 16S rDNA เพียงอย่างเดียว หรือการทำ PCR-RFLP ของ 16 S + 18S rDNA ในขณะที่ PCR-RFLP ของ 18S rDNA เพียงอย่างเดียวมี shared composite haplotypes ระหว่างชนิดของหอยเป่าชื่อ ดังนั้นการจำแนกชนิดหอยเป่าชื่อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ PCR-RFLP ของ 16S rDNA

1.2.2 ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง composite haplotypes ของหอยเป่าชื่อและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

แผนภูมิ UPGMA ที่สร้างจากระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ของ composite haplotypes ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* สามารถแบ่ง composite haplotypes ทั้งหมดได้เป็น 3 กลุ่ม (กลุ่ม I, II และ III) โดยกลุ่ม I ทั้งหมดประกอบด้วย 15 composite haplotypes ของ *H. asinina* และ 11 composite haplotypes ของ *H. ovina* ที่มาจากทะเลฝั่งอันดามัน โดยมี composite haplotypes BAAAAAB ของ *H. ovina* ที่ misclustering และถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ *H. asinina* กลุ่ม II ประกอบด้วย composite haplotypes ของ *H. ovina* ที่มาจากทะเลฝั่งอ่าวไทย (9 composite haplotypes) และ 1 composite haplotype ของ *H. ovina* ที่มาจากทะเลฝั่งอันดามัน (BBAAABB) โดย composite haplotypes ทั้งหมดของ *H. varia* ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม III (รูปที่ 1.5)

1.2.3 Haplotype diversity และ nucleotide diversity ในกลุ่มตัวอย่าง nucleotide divergence ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของหอยเป่าชื่อ

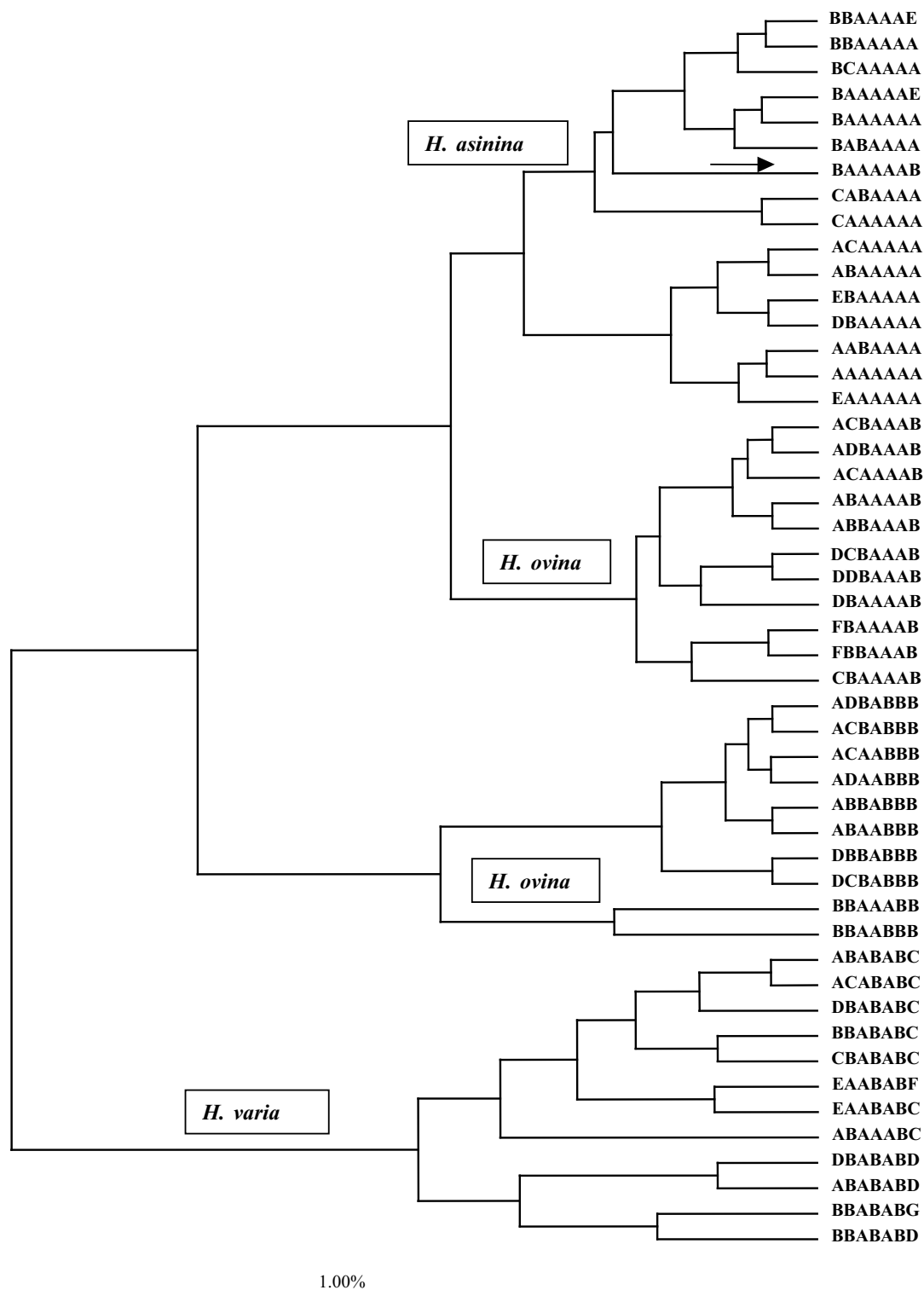
Haplotype diversity และ nucleotide diversity ของตัวอย่างหอยเป่าชื่อที่ทำการศึกษาครั้งนี้ แสดงในตารางที่ 1.6 โดยมี haplotype diversity ของ 16S + 18S rDNA เท่ากับ 0.6762 (0.0000 - 0.9013) ในขณะที่ nucleotide diversity มีค่า 0.3716% (0.0000 - 0.8114%) อย่างไรก็ตาม *H. varia* จากเกาะสิมิลัน จังหวัดพังงามีเพียง 2 ตัวอย่าง เนื่องจากไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ ดังนั้นข้อมูลพันธุศาสตร์ประชากรจากกลุ่มตัวอย่างดังกล่าวจึงยังสรุปไม่ได้

Nucleotide diversity และ nucleotide divergence ของตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมด แสดงในตารางที่ 1.7 โดยค่าเฉลี่ยของ nucleotide diversity และ nucleotide divergence ของ 18S rDNA + 16S rDNA มีค่าเท่ากับ 0.0169 และ 0.0132 ตามลำดับ โดยมีค่า nucleotide divergence สูงที่สุดระหว่างตัวอย่างเท่ากับ 0.0281 (HASAME - HVPHAW)

แผนภูมิ UPGMA ที่สร้างจาก nucleotide divergence ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง (รูปที่ 1.6) สามารถแยกความแตกต่างของ *H. asinina* ใน 3 กลุ่มใหญ่ตามชนิดของหอยเป่าฮือ ยกเว้น *H. ovina* ที่มาจากทะเลฝั่งอันดามันที่ cluster กับ *H. asinina* ซึ่งลักษณะดังกล่าวน่าจะมาจากการใช้จำนวนเอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่น้อยเกินไป

ตารางที่ 1.6 Haplotype diversity และ nucleotide diversity ของตัวอย่างหอยเป่าฮือที่พบในประเทศไทย ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย PCR-RFLP ของ 18S และ 16 S rDNA

ตัวอย่าง	Haplotype diversity \pm SE	Nucleotide diversity (x100)
<i>H. asinina</i>		
HASAME	0.0000 \pm 0.0000	0.0000
HASAMHE	0.7511 \pm 0.0508	0.3139
HACAME	0.3391 \pm 0.0898	0.1715
HACAMHE	0.7816 \pm 0.0518	0.4809
HATRAW	0.7065 \pm 0.0536	0.3758
HAPHIE	0.8359 \pm 0.0288	0.4910
<i>H. ovina</i>		
HOCHOE	0.6241 \pm 0.0679	0.1897
HOSAME	0.7937 \pm 0.0392	0.1903
HOTRAW	0.8317 \pm 0.0417	0.4073
HOPHAW	0.8831 \pm 0.0293	0.4222
<i>H. varia</i>		
HVPHUW	0.9013 \pm 0.0248	0.8114
HVPHAW	0.6667 \pm 0.2041	0.6057
ค่าเฉลี่ย	0.6762 \pm 0.0057	0.3716 \pm 0.0000



รูปที่ 1.5 แผนภูมิ UPGMA ที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง composite haplotypes ของ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR-RFLP ของ 18S และ 16S rDNA

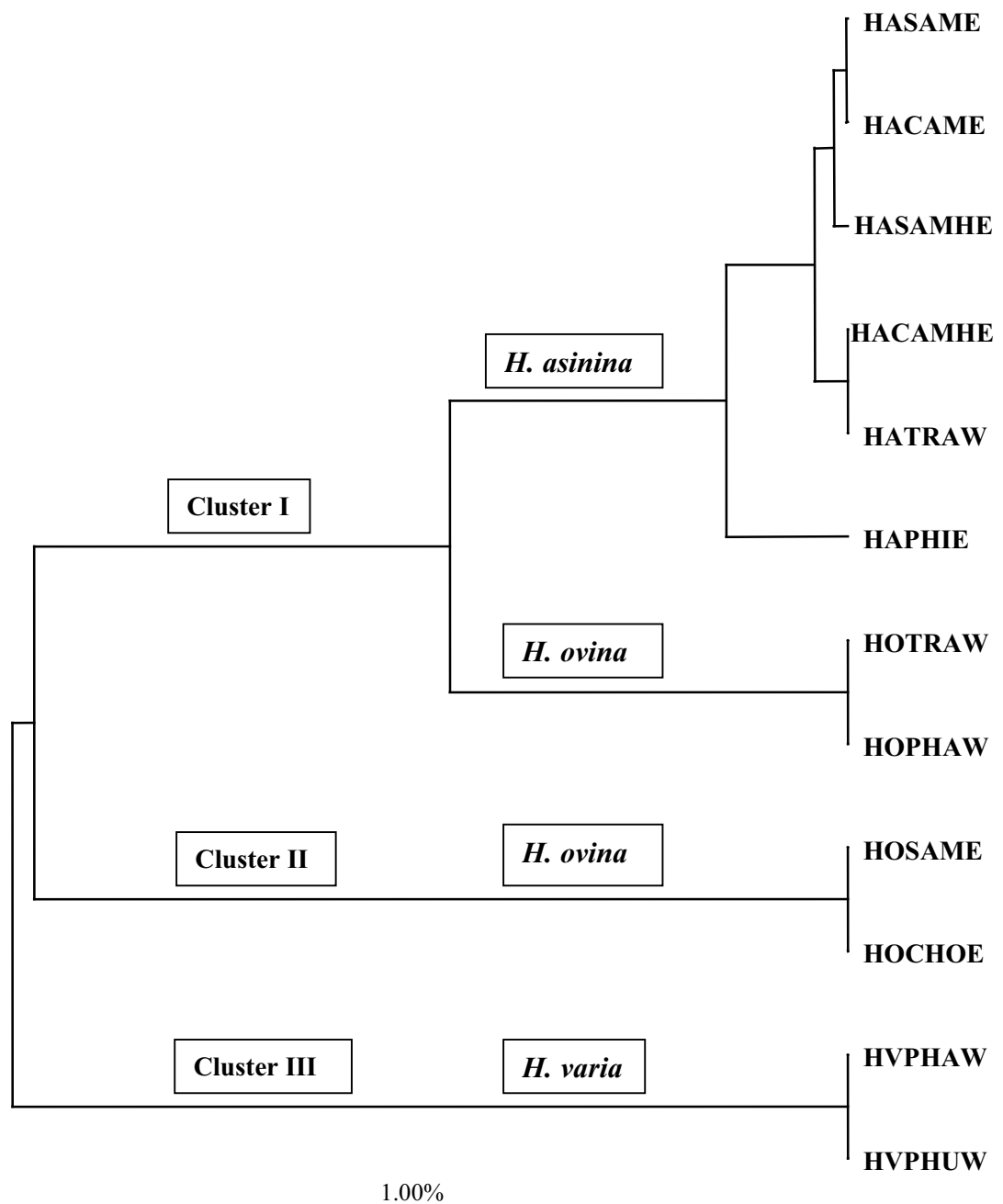
ตารางที่ 1.7 Nucleotide diversity (เหนือเส้นทแยงมุม) และ nucleotide divergence (ใต้เส้นทแยงมุม) ระหว่างกลุ่มตัวอย่างหอยเป่าสื่อ จากการศึกษาตัด 18S rDNA และ 16S rDNA ด้วยโปรแกรมไซม์ตัดจำเพาะ

	HASAMHW	HASAME	HATRAW	HACAMHE	HACAME	HAPHIE	HOCHO	HOSAME	HOTRAW	HOPHAW	HVPHUW	HVPHAW
HASAMHE	-	0.0021	0.0042	0.0049	0.0026	0.0066	E	0.0268	0.0139	0.0134	0.0263	0.0283
HASAME	0.0005	-	0.0027	0.0037	0.0009	0.0072	0.0279	0.0288	0.0159	0.0151	0.0282	0.0312
HATRAW	0.0007	0.0008	-	0.0043	0.0031	0.0067	0.0249	0.0256	0.0138	0.0129	0.0270	0.0278
HACAMHE	0.0009	0.0013	-0.0000	-	0.0040	0.0067	0.0242	0.0247	0.0131	0.0126	0.0271	0.0272
HACAME	0.0002	0.0000	0.0004	0.0008	-	0.0068	0.0271	0.0279	0.0151	0.0144	0.0275	0.0298
HAPHIE	0.0026	0.0047	0.0023	0.0019	0.0035	-	0.0219	0.0221	0.0104	0.0101	0.0237	0.0218
HOCHOE	0.0236	0.0270	0.0221	0.0208	0.0253	0.0186	-	0.0019	0.0132	0.0138	0.0284	0.0248
HOSAME	0.0243	0.0279	0.0227	0.0213	0.0261	0.0187	-0.0000	-	0.0131	0.0137	0.0285	0.0247
HOTRAW	0.0103	0.0139	0.0098	0.0087	0.0122	0.0059	0.0102	0.0101	-	0.0040	0.0217	0.0181
HOPHAW	0.0097	0.0130	0.0089	0.0081	0.0114	0.0054	0.0107	0.0107	-0.0001	-	0.0220	0.0183
HVPHUW	0.0206	0.0241	0.0211	0.0206	0.0226	0.0171	0.0234	0.0235	0.0156	0.0159	-	0.0069
HVPHAW	0.0237	0.0281	0.0229	0.0218	0.0259	0.0163	0.0209	0.0207	0.0129	0.0132	-0.0002	-

HA = *H. asinina*; HO = *H. ovina*; HV = *H. varia*; SAM = เกาะเสม็ด ; TRA = เกาะตะลิงตริง; CAMH = หอยจากโรงเพาะฟักที่มีพ่อแม่จากกัมพูชา; CAM = กัมพูชา; PHI =

ฟิลิปปินส์; CHO = เกาะสีซั้ง ขลบุรี; PHA = เกาะลิ้มลิ้น ฟังงา; PHU = ภูเก็ต

ค่าเฉลี่ย nucleotide diversity ระหว่างตัวอย่าง = 0.0169 ± 0.0000 ค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ย nucleotide divergence ระหว่างตัวอย่าง = 0.0132 ± 0.0000



รูปที่ 1.6 แผนภูมิ UPGMA ที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง composite haplotypes ของ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR-RFLP ของ 18S และ 16S rDNA

1.2.4 ความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างหอยเป่าฮื้อในประเทศไทย

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างหอยเป่าฮื้อที่ศึกษาทั้งหมด ด้วย geographic heterogeneity analysis และ F_{ST} พบว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$) ซึ่งจากข้อมูลของ 18S + 16S rDNA พบว่า gene pool ของ *H. asinina* ในประเทศไทยมีลักษณะเป็น panmictic gene pool อย่างไรก็ตามพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างตัวอย่างจากประเทศฟิลิปปินส์และตัวอย่างอื่นๆ ยกเว้นตัวอย่าง HACAMHE ($P < 0.0021$ ปรับค่าตาม sequential Bonferroni approach)

พบความแตกต่างทางพันธุกรรมที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างตัวอย่างหอยเป่าฮื้อ *H. ovina* ที่มาจากทะเลอันดามันและฝั่งอ่าวไทย ($P < 0.0001$) ซึ่งในขณะที่ *H. varia* ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ($P = 0.7710$ ตารางที่ 1.8) ความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรในแต่ละตัวอย่างโดยการประมาณจาก ค่า F_{ST} พบโครงสร้างประชากรอย่างมีนัยสำคัญใน *H. ovina* ที่มาจากฝั่งทะเลที่แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ด้วย PCR-RFLP ของ 16S rDNA ($P < 0.001$ ตารางที่ 1.9)

โดยทั่วไปแล้วการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างหอยเป่าฮื้อที่ศึกษา ด้วย geographic heterogeneity analysis และ F_{ST} จะให้ผลที่สอดคล้องกัน อย่างไรก็ตาม F_{ST} แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่าง *H. asinina* จากประเทศฟิลิปปินส์และตัวอย่างอื่นๆในประเทศไทย (รวมกัมพูชา) มาจาก 18S rDNA (นิวเคลียดีเอ็นเอ)

ตารางที่ 1.8 การวิเคราะห์ geographic heterogeneity ของหอยเป็ดคือ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* จากการศึกษา PCR-RFLP ของ 16S rDNA (เหนือเส้นทแยงมุม) and 18S + 16S rDNAs (ใต้เส้นทแยงมุม)

	HASAMHW	HASAM	HATRAW	HACAMHE	HACAME	HAPHIE	HOCHO	HOSAME	HOTRAW	HOPHAW	HVPHUW	HVPHAW
	E											
HASAMHE	-	0.2586 ^{ns}	0.6413 ^{ns}	0.2368 ^{ns}	0.1007 ^{ns}	0.1062 ^{ns}	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.0049 ^{ns}
HASAME	0.0184 ^{ns}	-	0.5681 ^{ns}	1.0000 ^{ns}	1.0000 ^{ns}	1.0000 ^{ns}	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.0113 ^{ns}
HATRAW	0.0087 ^{ns}	0.1371 ^{ns}	-	0.5341 ^{ns}	0.4989 ^{ns}	0.4994 ^{ns}	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.0053 ^{ns}
HACAMHE	0.0106 ^{ns}	0.0086 ^{ns}	0.2670 ^{ns}	-	1.0000 ^{ns}	1.0000 ^{ns}	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.0078 ^{ns}
HACAME	0.0293 ^{ns}	0.5741 ^{ns}	0.0657 ^{ns}	0.0035 *	-	1.0000 ^{ns}	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.0048 ^{ns}
HAPHIE	0.0007 *	0.0003 *	<0.0001*	0.0085 ^{ns}	0.0001 *	-	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.0041*
HOCHOE	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	-	1.0000 ^{ns}	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.0031*
HOSAME	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.1264 ^{ns}	-	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.0037*
HOTRAW	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	-	1.0000 ^{ns}	<0.0001*	0.0179 ^{ns}
HOPHAW	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.3668 ^{ns}	-	<0.0001*	0.0134 ^{ns}
HVPHUW	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	-	1.0000 ^{ns}
HVPHAW	0.0639 ^{ns}	0.0102 ^{ns}	0.0172 ^{ns}	0.0572 ^{ns}	0.0114 ^{ns}	0.0100 ^{ns}	0.0328 ^{ns}	0.0784 ^{ns}	0.1565 ^{ns}	0.1249 ^{ns}	0.7710 ^{ns}	-

ns = ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ, * P < 0.0042 สำหรับ *H. asinina*, P < 0.0125 สำหรับ *H. ovina* และ P < 0.05 สำหรับ *H. varia* ปฏิบัติตาม sequential Bonferroni method (Rice, 1989).

ตารางที่ 1.9 Estimated F_{ST} (และค่า P-value) ระหว่างคู่ของตัวอย่างของหอยเป่าสี่จากการศึกษา PCR-RFLP ของ 18S และ 16S rDNAs

Geographic samples	18S rDNA	16S rDNA
<i>H. asinina</i>		
HASAMHE-HASAME	0.2563 (0.0083 ^{ns})	0.0699 (0.2656 ^{ns})
HASAMHE-HATRAW	0.0668 (0.0388 ^{ns})	-0.0058 (0.6350 ^{ns})
HASAMHE-HACAMHE	0.0744 (0.0483 ^{ns})	0.0895 (0.2385 ^{ns})
HASAMHE-HACAME	0.0862 (0.0686 ^{ns})	0.1208 (0.0977 ^{ns})
HASAMHE-HAPHIE	0.1591 (0.0008*)	0.1160 (0.1059 ^{ns})
HASAME-HATRAW	0.1641 (0.0141 ^{ns})	-0.0074 (0.5693 ^{ns})
HASAME-HACAMHE	0.2934 (0.0022*)	Not possible
HASAME-HACAME	0.0437 (0.2712 ^{ns})	Not possible
HASAME-HAPHIE	0.4535 (<0.0001*)	Not possible
HATRAW-HACAMHE	0.0052 (0.3347 ^{ns})	0.0051 (0.5347 ^{ns})
HATRAW-HACAME	0.0497 (0.0747 ^{ns})	0.0224 (0.4999 ^{ns})
HATRAW-HAPHIE	0.1801 (<0.0001*)	0.0199 (0.5035 ^{ns})
HACAMHE-HACAME	0.1512 (0.0058 ^{ns})	Not possible
HACAMHE-HAPHIE	0.0560 (0.0566 ^{ns})	Not possible
HACAME-HAPHIE	0.3302 (<0.0001*)	Not possible
<i>H. ovina</i>		
HOCHOE-HASAME	0.0385 (0.1173 ^{ns})	Not possible
HOCHOE-HOTRAW	0.1296 (0.0035*)	0.9525 (<0.0001*)
HOCHOE-HOPHAW	0.1046 (0.0226 ^{ns})	1.0000 (<0.0001*)
HOSAME-HOTRAW	0.0285 (0.1754 ^{ns})	0.9444 (<0.0001*)
HOSAME-HOPHAW	-0.0017 (0.4295 ^{ns})	1.0000 (<0.0001*)
HOTRAW-HOPHAW	-0.0134 (0.5747 ^{ns})	-0.0299 (1.0000 ^{ns})
<i>H. varia</i>		
HVPHUW-HVPHAW	0.0876 (0.3125 ^{ns})	-0.2409 (1.0000 ^{ns})

ns = ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ; * P < 0.0042 สำหรับ *H. asinina*, P < 0.0125 สำหรับ *H. ovina* และ P < 0.05 สำหรับ *H. varia* ปรับตาม sequential Bonferroni method (Rice, 1989).

2. การศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของหอยเป่าฮือ *Haliotis asinina*,

Haliotis ovina และ *Haliotis varia* ด้วยวิธี RAPD-PCR

2.1 วิธีดำเนินการทดลอง

2.1.1 ตัวอย่าง

ทำการตรวจสอบลักษณะความแปรผันทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮือที่ทำการเก็บตัวอย่างจากธรรมชาติและจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จำนวนรวมทั้งสิ้น 226 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2. 1)

2.1.2 การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างหอยเป่าฮือ

สกัดโครโมโซมอดีเอ็นเอจากเนื้อส่วนเท้าหรือจากเลือดของหอยเป่าฮือด้วยวิธี Phenol/chloroform ทำการวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และประมาณค่า high molecular weight genomic DNA ด้วย mini-gel electrophoresis โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

2.1.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD-PCR

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี RAPD-PCR โดยนำดีเอ็นเอของตัวอย่างหอยเป่าฮือทั้ง 3 ชนิดที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ RAPD (University of British Columbia, UBC และ Operon Technologies, OPA และ OPB) มินิแซทเทลไลต์ (minisatellite core sequences) และไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellites) ดังแสดงด้วยตารางที่ 2.2

ซึ่งในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 μ l ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 100 μ M dNTPs (dATP, dGTP, dTTP และ dCTP), 0.2 μ M ไพรเมอร์ และ 1 Unit ของ *Taq* polymerase และ 25 ng ของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทำปฏิกิริยาจำนวน 35-40 รอบ

คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในหอยเป่าฮือแต่ละชนิด โดยเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอบน agarose gel ที่ชัดเจน และให้ผลเหมือนกันในตัวอย่างเดียวกันเมื่อทำซ้ำ ทำการปรับสภาพต่าง ๆ ในปฏิกิริยาเพื่อให้เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละชนิด เช่น ความเข้มข้นของ $MgCl_2$, ความเข้มข้น dNTPs, ปริมาณไพรเมอร์, ปริมาณ *Taq* polymerase, ปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่าง หรืออุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis

นำไพรเมอร์จากการคัดเลือกเบื้องต้นที่ให้ผลคงที่ (reproducible) และให้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะกับชนิดของหอยเป่าฮือ (species-specific RAPD markers) จำนวน 5 primers ประกอบด้วย OPB11, UBC101, UBC195, UBC197 และ UBC271

ตารางที่ 2.1 สถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างหอยเป่าชื่อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ชนิดของหอยเป่าชื่อและสถานที่เก็บตัวอย่าง	ชื่อกลุ่มตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่เก็บ (จำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษาด้วย PCR-RFLP)
<i>H. asinina</i>		
โรงเพาะเลี้ยง (พ่อแม่พันธุ์เกาะเสม็ด จ. ระยอง)	HASAMHE	28 (14)
โรงเพาะเลี้ยง (พ่อแม่พันธุ์กัมพูชา)	HACAMHE	15 (13)
เกาะตะลิ่ง จ. ตรัง	HATRAW	28 (19)
เกาะเสม็ด จ. ระยอง	HASAME	19 (14)
กัมพูชา	HACAME	23 (19)
ฟิลิปปินส์	HAPHIE	30 (20)
อินโดนีเซีย	HAINDW	20 (-)
ตัวอย่าง <i>H. asinina</i>		163 (99)
<i>H. ovina</i>		
เกาะค้างคาว อ. เกาะสีชัง จ. ชลบุรี	HOCHOE	29 (29)
เกาะเสม็ด จ. ระยอง	HOSAME	43 (27)
เกาะเชือก จ. ตรัง	HOTRAW	47 (23)
เกาะสิมิลัน จ. พังงา	HOPHAW	16 (16)
ตัวอย่าง <i>H. ovina</i>		135 (95)
<i>H. varia</i>		
เกาะแอล จ. ภูเก็ต	HVPHUW	29 (28)
เกาะสิมิลัน จ. พังงา	HVPHAW	4 (4)
ตัวอย่าง <i>H. varia</i>		33 (32)
รวมตัวอย่างทั้งหมด		331 (226)

2.1.4 การศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของหอยเป้าฮื้อ

นำไพรเมอร์ที่ได้คัดเลือกไว้จำนวน 5 ไพรเมอร์ (OPB11, UBC101, UBC195, UBC197 และ UBC271) มาทำการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของ *H. asinina* และใช้ OPB11 และ UBC101 ศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป้าฮื้อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* นำรูปแบบ RAPD ที่ได้มาแปลงเป็น binary code ที่แสดงค่า 0/1 โดย 0 = ไม่มีชิ้น DNA ที่ตำแหน่งที่ตรวจสอบ และ 1 = มีชิ้น DNA ในตำแหน่งที่ตรวจสอบ จากนั้นจึงนำ matrix ดังกล่าวมาคำนวณค่าสถิติทางพันธุศาสตร์ต่าง ๆ

โดยทำการวิเคราะห์ค่า similarity index ระหว่างหอยเป้าฮื้อแต่ละตัวที่ทำการทดลองด้วยสูตร

$$S_{xy} = 2n_{xy} / n_x + n_y \quad (\text{Nei และ Li, 1979})$$

เมื่อ S_{xy} คือ ค่า similarity index ระหว่างตัวอย่าง x และ y

n_{xy} คือ จำนวน shared RAPD bands ที่ปรากฏในตัวอย่างหอยเป้าฮื้อ x และ y

n_x และ n_y คือ จำนวน RAPD bands ทั้งหมดที่ score ในตัวอย่างหอยเป้าฮื้อ x และ y ตามลำดับ

ค่า similarity index ภายในกลุ่มตัวอย่างหอยเป้าฮื้อ คำนวณโดยการหาค่าเฉลี่ย similarity index ระหว่างหอยเป้าฮื้อแต่ละตัว ภายในกลุ่มตัวอย่างนั้น ค่า similarity index ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง (S_{ij}) คำนวณโดยการหาค่า similarity index ระหว่างหอยเป้าฮื้อแต่ละคู่ จากกลุ่มตัวอย่าง i กับ j โดยใช้สูตรที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และนำค่า similarity index ที่ได้มาเปลี่ยนกลับเพื่อหาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยใช้สูตร $S_{xy} = 2n_{xy} / n_x + n_y$ (Lynch, 1990)

นำค่า genetic distance ที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-joining method (Saitou และ Nei, 1987) โดยใช้โปรแกรม NEIGHBOR ใน Phylip (Felsenstein, 1993) ทำการตรวจสอบ genetic heterogeneity ระหว่างกลุ่มตัวอย่างของ *H. asinina* ด้วย โปรแกรม Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA)

2.2 ผลการทดลองการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina*, *Haliotis ovina* และ *Haliotis varia* ด้วยวิธี RAPD-PCR

2.2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์

จากการนำตัวอย่างดีเอ็นเอของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* *H. ovina* และ *H. varia* มาทดสอบการเพิ่มจำนวน (amplification) โดยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ RAPD-PCR จำนวน 128 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 34 ไพรเมอร์ที่สามารถใช้ amplification ในปฏิกิริยา RAPD-PCR ได้ (ตารางที่ 2.2) และได้นำไพรเมอร์เหล่านี้มาทดสอบกับจำนวนตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น โดยในการศึกษาครั้งนี้ ได้ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ UBC101 และ OPB11 ศึกษาพันธุศาสตร์เชิงประชากรของหอยเป่าฮื้อทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่ใช้ไพรเมอร์ UBC101, OPB11, UBC195, UBC197 และ UBC271 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* (รูปที่ 2.1)

2.2.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮื้อโดยใช้วิธี RAPD-PCR

2.2.2.1 ความหลากหลายระหว่างสปีชีส์

จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี RAPD-PCR พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสูงใน *H. asinina* *H. ovina* และ *H. varia* โดยเมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC101 และ OPB11 มาวิเคราะห์พันธุกรรมของหอยเป่าฮื้อทั้ง 3 ชนิดในประเทศไทย พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 72 แถบ ซึ่งมีขนาดระหว่าง 320 bp ถึง 2300 bp โดยขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ UBC101 มีขนาดอยู่ระหว่าง 320 bp ถึง 1850 bp และจากไพรเมอร์ OPB11 ซึ่งมีขนาดอยู่ระหว่าง 390 bp ถึง 2300 bp และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ผลเหมือนเดิมเมื่อทำซ้ำกับตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 37 แถบจากไพรเมอร์ UBC101 และจำนวน 35 แถบจากไพรเมอร์ OPB11 และพบว่าเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอ (polymorphic band) คือ 100% ในทั้งสองไพรเมอร์ โดย polymorphic band คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบน้อยกว่า 95% ของทุกตัวอย่างภายในแต่ละสปีชีส์ (ตาราง 2.2, 2.3, 2.4 และ 2.5)

เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอของ *H. asinina* *H. ovina* และ *H. varia* จากการวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ UBC101 และ OPB11 คือ 84.96%, 94.74%, และ 91.23% ตามลำดับ และพบว่า *H. ovina* มีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอสูงที่สุด ตามด้วย *H. varia* และ *H. asinina* ซึ่งจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด เปอร์เซ็นต์ความหลากหลาย และ monomorphic band ภายในหอยเป่าฮื้อแต่ละสปีชีส์ แสดงไว้ในตารางที่ 2.5

ตาราง 2.2 ผลของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (amplification) หอยเป่าชื่อโดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ RAPD-PCR

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	Amplification Strength	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	Amplification Strength
UBC101	GCG CCT GGA G	+++	UBC164	CCA AGA TGC T	-
UBC111	AGT AGA CGG G	-	UBC166	ACT CCT ACA G	-
UBC114	TGA CCG AGA C	-	UBC167	CCA ATT CAC G	-
UBC115	TTC CGC GGG C	-	UBC168	CTA GAT GTG C	++
UBC117	TTA GCG GTC T	-	UBC169	ACG ACG TAG G	-
UBC118	CCC GTT TTG T	-	UBC170	ATC TCT CCT G	-
UBC119	ATT GGG CGA T	++	UBC171	TGA CCC CTC C	-
UBC120	GAA TTT CCC C	-	UBC174	AAC GGG CAG C	++
UBC121	ATA CAG GGA G	-	UBC175	TGG TGC TGA T	-
UBC122	GTA GAC GAG C	-	UBC187	AAC GGG GGA G	-
UBC128	GCA TAT TCC G	-	UBC189	TGC TAG CCT C	-
UBC132	AGG GAT CTC C	-	UBC191	CGA TGG CTT T	-
UBC135	AAG CTG CGA G	-	UBC193	TGC TGG CTT T	++
UBC138	GCT TCC CCT T	-	UBC195	GAT CTC AGC G	+++
UBC139	CCC AAT CTT C	-	UBC197	TCC CCG TTC C	+++
UBC140	GTC GCA TTT C	-	UBC200	TCG CGGA TAT G	++
UBC142	ATC TGT TCG G	-	UBC210	GCA CCG AGA G	++
UBC143	TCG CAG AAC G	-	UBC217	ACA GGT AGA C	-
UBC144	AGA GGG TTC T	-	UBC220	GTC GAT GTC G	++
UBC146	ATG TGT TGC G	-	UBC222	AAG CCT CCC C	-
UBC148	TGT CCA CCA G	-	UBC228	GCT GGG CCG A	-
UBC153	GAG TCA CGA G	-	UBC233	CTA TGC GCG C	-
UBC158	TAG CCG TGG C	-	UBC235	CTG AGG CAA A	-
UBC159	GAG CCC GTA G	-	UBC237	CGA CCA GAG C	-
UBC160	CGA TTC AGA G	++	UBC255	TTC CTC CGG A	-
UBC161	CGT TAT CTC G	-	UBC259	GGT ACG TAC T	-
UBC163	CCC CCC AGA T	-	UBC262	CGC CCC CAG T	-

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	Amplification Strength	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	Amplification Strength
UBC263	TTA GAG ACG G	-	OPA9	GGG TAA CGC C	-
UBC264	TCC ACC GAG C	++	OPA10	GTG ATC GCA G	++
UBC267	CCA TCT TGT G	++	OPA11	CAA TCG CCG T	-
UBC268	AGG CCG CTT A	-	OPA12	TCG GCG ATA G	-
UBC270	TGC GCG CGG G	-	OPA13	CAG CAC CCA C	-
UBC271	TCC CCG TTC C	+++	OPA14	TCT GTG CTG G	-
UBC272	AGC GGG CCA A	++	OPA15	TTC CGA ACC C	++
UBC273	AAT GTC GCC A	-	OPA16	AGC CAG CGA A	-
UBC277	AGG AAG GTG C	-	OPA17	GAC CGC TTG T	-
UBC281	GAG AGT GGA A	-	OPA18	AGG TGA CCG T	-
UBC282	GGG AAA GCA G	-	OPA19	CAA ACG TCG G	++
UBC286	CGG AGC CGG C	-	OPA20	GTT GCG ATC C	++
UBC293	TCG TGT TGC T	-	OPB1	GTT TCG CTC C	-
UBC295	CGC GTT CCT G	-	OPB2	TGA TCC CTG G	-
UBC297	GCG CATT TAG A	-	OPB3	CAT CCC CCT G	-
UBC298	CCG TAC GGA C	-	OPB4	GGA CTG GAG T	-
UBC299	TGT CAG CGG T	-	OPB5	TGC GCC CTT C	-
UBC428	GGC TGC GGT A	-	OPB6	TGC TCT GCC C	-
UBC456	GCG GAG GTC C	++	OPB7	GGT GAC GCA G	-
UBC457	CGA CGC CCT G	++	OPB8	GTC CAC ACG G	-
UBC459	GCG TCG AGG G	++	OPB9	TGG GGG ACT C	-
OPA1	CAG GCC CTT C	++	OPB10	CTG CTG GGA C	-
OPA2	TGC CGA GCT G	++	OPB11	GTA GAC CCG T	+++
OPA3	AGT CAG CCA C	-	OPB12	CCT TGA CGG A	-
OPA4	AAT CGG GCT G	-	OPB13	TTC CCC CGC T	-
OPA5	AGG GGT CCT G	-	OPB14	TCC GCT CTG G	-
OPA6	GGT CCC TGA C	-	OPB15	GGA GGG TGT T	-
OPA7	GAA ACG GGT G	-	OPB16	TTT GCC CGG A	++
OPA8	GTG ACG TAG G	-	OPB17	AGG GAA CGA G	++

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

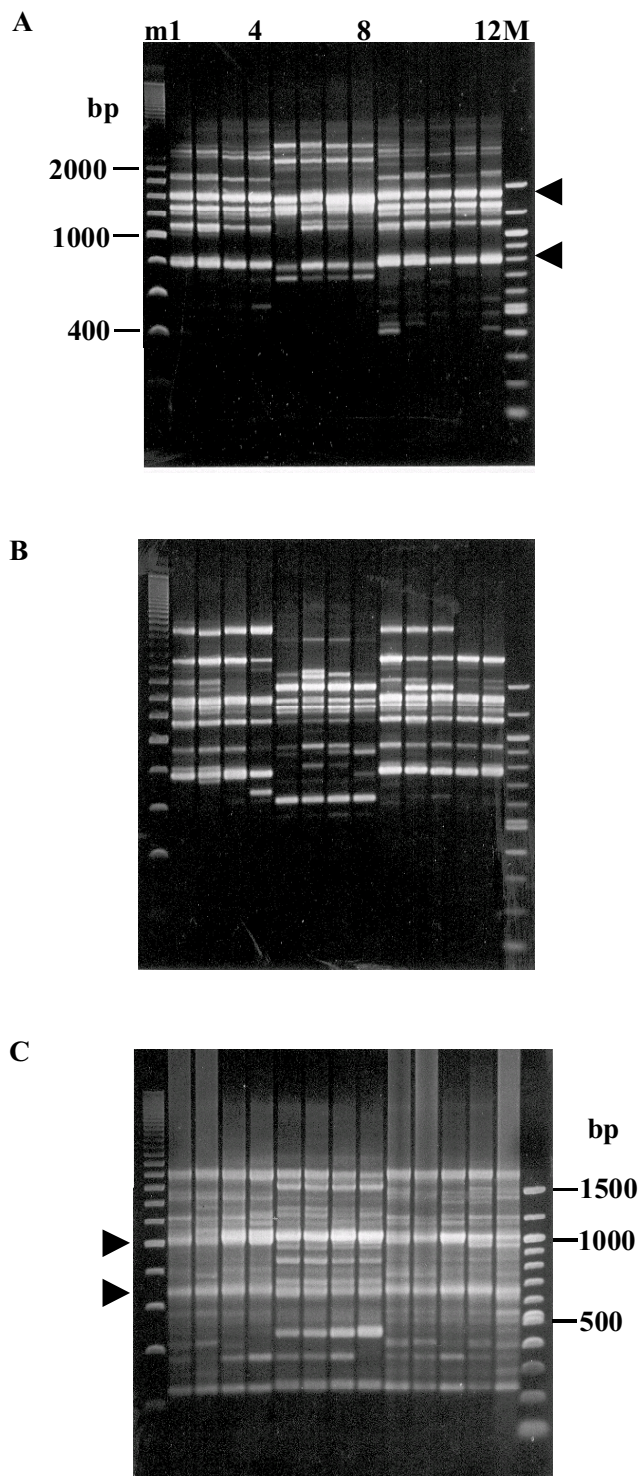
ไพรเมอร์	ลำดับเบส	Amplification Strength	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	Amplification Strength
OPB18	CCA CAG CAG T	-	Microsatellites	(GACA) ₄	+
OPB19	ACC CCC GAA G	-	HRU33	CCC AAG GTC CCC AAG GTC AGG GAG GCG AAG GCT	-
OPB20	GGA CCC TTA C	-	HRU18	ACC CGG CGC TTA TTA GAG	-
Microsatellites	(CA) ₈	-	PER I	GAC NGG NAC NGG	-
Microsatellites	(CT) ₈	-	INS	ACA GGG GTG TGG GG	++
Microsatellites	(CAC) ₅	+	M13	GAG GGT GGN GGN TCT	++
Microsatellites	(GTG) ₅	++	YNZ22	CTC TGG GTG TCG TGC	-
Microsatellites	(GATA) ₄	+	YN73	CCC GTG GGG CCG CCG	++

- = ไพรเมอร์ที่ไม่ให้ชิ้น RAPD

+ = ไพรเมอร์ที่ให้ชิ้น RAPD ที่จาง

++ = ไพรเมอร์ที่ให้ชิ้น RAPD ที่เข้มและนำไปปรับสภาวะที่เหมาะสม

+++ = ไพรเมอร์ที่ให้ชิ้น RAPD เข้มและคัดเลือกไว้สำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าฮือ



รูป 2.1 รูปแบบRAPD ที่ได้จากการวิเคราะห์หอยเป่าชื่อ *H. asinina* จากเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง (HASAME ช่อง 1 - 4) กัมพูชา (HACAMHE ช่อง 5 - 8) เกาะตะลิ่ง จังหวัดตรัง (HATRAW ช่อง 9 - 10) และ ฟิลิปปีนส์ (HAPHIE ช่อง 11 - 12) ด้วยไพรเมอร์ OPB11 (A), UBC195 (B) และ UBC271 (C) ตามลำดับ แถว M และ m คือ 100 bp และ 200 bp DNA ladder ตามลำดับ ลูกศรแสดงเครื่องหมาย RAPDที่จำเพาะกับหอยเป่าชื่อ *H. asinina*

ตารางที่ 2.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ RAPD-PCR, size-range, จำนวนแถบดีเอ็นเอ และเปอร์เซ็นต์ของ polymorphic และ monomorphic bands ที่ได้จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* *H. ovina* และ *H. varia* ด้วยวิธี RAPD-PCR

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	ขนาดของ amplified RAPD bands	RAPD bands	polymorphic bands (%)	monomorphic bands (%)
OPB11	5'-GTAGACCCGT-3'	320 - 1850	37	100	0
UBC101	5'-GCGCCTGGAG-3'	390 - 2300	35	100	0
Overall		320 - 2300	72	100	0

ตารางที่ 2.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ RAPD-PCR, size-range, จำนวนแถบดีเอ็นเอ และเปอร์เซ็นต์ของ polymorphic และ monomorphic bands ที่ได้จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ด้วยวิธี RAPD-PCR

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	ขนาดของ amplified RAPD bands	RAPD bands	polymorphic bands (%)	monomorphic bands (%)
OPB11	5'-GTAGACCCGT-3'	320 - 1850	37	100.0	0.0
UBC101	5'-GCGCCTGGAG-3'	390 - 2300	35	100.0	0.0
UBC195	5'-GATCTCAGCG-3'	520 - 1480	25	84.0	16.0
UBC197	5'-TCCCCGTTCC-3'	500 - 1480	23	87.0	13.0
UBC271	5'-GCCATCAAGA-3'	250 - 1020	12	83.0	17.0
Overall		25 - 2300	132	90.8	9.2

ตารางที่ 2.5 จำนวนของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด เบอร์เริ่มต้นของ polymorphic และ monomorphic bands ภายใต้อินทรีย์วัตถุ ที่ได้จากวิธีการด้วยวิธี RAPD-PCR

ไพรเมอร์	<i>H. asinina</i>		<i>H. ovina</i>		<i>H. varia</i>	
	จำนวน RAPD bands	จำนวน monomorphic bands	จำนวน RAPD bands	จำนวน monomorphic bands	จำนวน RAPD bands	จำนวน monomorphic bands
OPB11	32	26	26	23	24	20
UBC101	21	19	31	31	33	32
UBC195	25	21	-	-	-	-
UBC197	23	20	-	-	-	-
UBC271	12	10	-	-	-	-
รวม	113	96 (84.96%)*	57	54 (94.74%)	57	52 (91.23%)
		17 (15.32%)		3 (5.26%)		5 (8.77%)

*จำนวน polymorphic bands จาก OPB11 และ UBC101 เท่ากับ 80.91%

2.2.2.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *H. asinina*

เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *H. asinina* ด้วยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 5 ชนิดพบว่า *H. asinina* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสูง (ตาราง 2.4) โดยจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ให้ผลเหมือนเดิมเมื่อทำซ้ำกับทุกตัวอย่างที่ศึกษาคือ 32, 21, 25, 23 และ 12 แถบ จากไพรเมอร์ UBC101, OPB11, UBC195, UBC197 และ UBC271 ตามลำดับ โดยมี แถบดีเอ็นเอ 113 แถบ ที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 250 bp ถึง 2300 bp และทุกไพรเมอร์ให้ผลความหลากหลายระดับสูงในหอยเป่าชื่อ *H. asinina* โดยเปอร์เซ็นต์ของ polymorphic bands จากไพรเมอร์ UBC101, OPB11, UBC195, UBC197 และ UBC271 คือ 81.25% (26/32), 90.48% (19/21), 84.00% (21/25), 86.96% (20/23) และ 83.33% (10/12) ตามลำดับ ขนาดของแถบ RAPD ในแต่ละไพรเมอร์แสดงไว้ในตารางที่ 2.4

2.2.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอยเป่าชื่อ

2.2.3.1 Similarity index และ Genetic distance

ค่าเฉลี่ยของ similarity index ของตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์ RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ OPB11, UBC101, UBC195, UBC197 และ UBC271 มีค่าเท่ากับ 0.6830, 0.7715, 0.8002, 0.8444, และ 0.8396 ตามลำดับ (ตาราง 2.6)

ค่าเฉลี่ย similarity index ภายในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง (geographic sample) รวมทุกไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 0.5259 (HVPHAW) ถึง 0.8496 (HATRAW) โดยทั่วไปพบว่า *H. asinina* มีค่า similarity index ภายในสปีชีส์อยู่ในระดับสูง (0.8297) และอยู่ในช่วง 0.7927 (HASAME) ถึง 0.8496 (HATRAW) ในขณะที่ *H. varia* มีค่า similarity index ภายในสปีชีส์อยู่ในระดับต่ำกว่า (0.6010 - 0.7032) และ *H. varia* มีค่าเฉลี่ยของ similarity index อยู่ระหว่าง 0.5259 - 0.6102 จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ากลุ่มตัวอย่างของ *H. asinina* มีความสัมพันธ์ภายในสปีชีส์ใกล้เคียงกันมากกว่ากลุ่มตัวอย่างของ *H. ovina* และ *H. varia*

จากการใช้ไพรเมอร์ OPB11 และ UBC101 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าชื่อทั้ง 3 ชนิด และได้นำมาคำนวณค่า similarity index ระหว่างตัวอย่าง (S_{ij}) จากไพรเมอร์แต่ละชนิด จากนั้นคำนวณค่า Genetic distances (D_{ij}) จากค่า similarity index ระหว่างตัวอย่าง ตามสมการ $D_{ij} = 1 - S_{ij}$ พบว่าค่าเฉลี่ย genetic distance ระหว่างกลุ่มตัวอย่างภายในสปีชีส์ของ *H. asinina* *H. ovina* และ *H. varia* อยู่ระหว่าง 0.1578 - 0.4208, 0.3259 - 0.4827 และ 0.4295 ตามลำดับ (ตาราง 2.7) โดยค่าเฉลี่ย genetic distance ภายใน *H. asinina* *H. ovina* และ *H. varia* มีค่าเท่ากับ 0.2995, 0.4328, และ 0.4295 ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่า *H. ovina* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์สูงกว่า *H. varia* และ *H. asinina*

ตารางที่ 2.6 ค่า similarity indices (S) ภายในแต่ละกลุ่มตัวอย่างของหอยเป่าฮื้อ โดยใช้วิธี RAPD-PCR

ตัวอย่าง	ไพรมอร์					ค่าความเหมือนเฉลี่ย ภายในกลุ่มตัวอย่าง จากไพรมอร์ทั้ง หมด
	OPB11	UBC101	UBC195	UBC197	UBC271	
HASAMHE	0.8112	0.8812	0.8652	0.8666	0.8011	0.8451 ± 0.0362
HASAME	0.7831	0.8571	0.7066	0.8192	0.7974	0.7927 ± 0.0556
HACAMHE	0.7973	0.8686	0.8048	0.8941	0.8432	0.8416 ± 0.0412
HACAME	0.8411	0.8640	0.7749	0.8667	0.8317	0.8357 ± 0.0371
HATRAW	0.8133	0.8146	0.8674	0.8385	0.9141	0.8496 ± 0.0423
HAPHIE	0.8143	0.8392	0.7825	0.7811	0.8503	0.8135 ± 0.0317
HOCHOE	0.6431	0.7027	-	-	-	0.6729 ± 0.0421
HOSAME	0.6971	0.7092	-	-	-	0.7032 ± 0.0086
HOPHAW	0.4648	0.7371	-	-	-	0.6010 ± 0.1925
HOTRAW	0.5382	0.7053	-	-	-	0.6218 ± 0.1182
HVPHUW	0.4891	0.7313	-	-	-	0.6102 ± 0.1713
HVPHAW	0.5036	0.5482	-	-	-	0.5259 ± 0.0315
ค่าความเหมือนเฉลี่ย ของแต่ละไพรมอร์จาก กลุ่มตัวอย่างทั้งหมด	0.6830 ± 0.1474	0.7715 ±m 0.0997	0.8002 ± 0.0608	0.8444 ± 0.0403	0.8396 ± 0.0424	

ตารางที่ 2.7 ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ได้เส้นทแยงมุม) และ ค่าดัชนีความเหมือน (similarity indices เหนือเส้นทแยงมุม) ระหว่างกลุ่มตัวอย่างของ

H. asinina, *H. ovina* และ *H. varia*

	HASAM	HASAME	HACAMH	HACA	HATRA	HAPHIE	HOCHO	HOSAM	HOTRA	HOPHA	HVPHU	HVPHA
HE	E	E	ME	W	W	E	E	E	W	W	W	W
HASAMHE	-	0.8068	0.8346	0.8423	0.6304	0.6268	0.2528	0.2359	0.2556	0.2703	0.2957	0.2436
HASAME	0.1933	-	0.7985	0.8235	0.6122	0.6282	0.2682	0.2493	0.2626	0.2872	0.2917	0.2464
HACAMHE	0.1655	0.2015	-	0.8302	0.6172	0.6093	0.2706	0.2535	0.2660	0.2865	0.2825	0.2253
HACAME	0.1578	0.1765	0.1698	-	0.6182	0.6508	0.2726	0.2553	0.2620	0.2907	0.3081	0.2451
HATRAW	0.3697	0.3878	0.3828	0.3818	-	0.5793	0.2969	0.2830	0.3384	0.3491	0.3508	0.3011
HAPHIE	0.3732	0.3718	0.3907	0.3492	0.4208	-	0.3038	0.5873	0.3489	0.3737	0.3182	0.2945
HOCHOE	0.7473	0.7319	0.7295	0.7275	0.7032	0.6962	-	0.6741	0.5173	0.5201	0.4388	0.3981
HOSAME	0.7641	0.7508	0.7466	0.7447	0.7170	0.4127	0.3259	-	0.5518	0.5466	0.4209	0.4101
HOTRAW	0.7445	0.7374	0.7340	0.7381	0.6616	0.6512	0.4827	0.4483	-	0.5933	0.3761	0.3684
HOPHAW	0.7298	0.7128	0.7155	0.7093	0.6509	0.6264	0.4799	0.4536	0.4067	-	0.3803	0.3558
HVPHUW	0.7043	0.7084	0.7175	0.6919	0.6493	0.6818	0.5612	0.5791	0.6240	0.6197	-	0.5706
HAPHAW	0.7565	0.7536	0.7747	0.7550	0.6990	0.7055	0.6020	0.5899	0.6316	0.6443	0.4295	-

H. asinina (HA), *H. ovina* (HO) และ *H. varia* (HV) คำย่อ: CAM = กัมพูชา, CAMH = ตัวอย่างรุ่น P0 ที่พ่อแม่พันธุ์มาจากกัมพูชา, TRA = เกาะตะลิ่ง, ตรัง, PHA = สิบตัน พังงา, PHI = ฟิลิปปินส์, PHU = ภูเก็ต, CHO = เกาะลี้ซัง ชลบุรี, SAMH = ตัวอย่างรุ่น P0 ที่พ่อแม่พันธุ์มาจากเกาะเสม็ด, SAM = เกาะเสม็ด ะยอง และ TRA = เกาะเชือก ตรัง (*H. ovina*)

ค่า similarity index และ genetic distance ระหว่างกลุ่มตัวอย่างของ *H. asinina* สามารถคำนวณโดยใช้วิธีเดียวกันกับการคำนวณค่า similarity index ภายในกลุ่มตัวอย่าง ค่าเฉลี่ยของ genetic distance ระหว่าง geographic sample ภายในสปีชีส์ต่อทุกไพรเมอร์ของ *H. asinina* อยู่ระหว่าง 0.0156 - 0.2381 (ตารางที่ 2.9) ค่าเฉลี่ย genetic distance ของ *H. asinina* ในอ่าวไทย (HASAMHE, HASAME, HACAMHE และ HACAME) คือ 0.0243 แสดงให้เห็นว่า *H. asinina* ในอ่าวไทยมีความคล้ายกันมากกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างจากฝั่งอันดามัน (HATRAW) ซึ่งมีค่า genetic distance ระหว่าง 0.2096 - 0.2381

ตาราง 2.8 ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance; ใต้เส้นทแยงมุม) และค่าดัชนีความเหมือน (similarity indices; เหนือเส้นทแยงมุม) ภายในสปีชีส์ของ *H.asinina*

	HASAMHE	HASAME	HACAMHE	HACAME	HATRAW	HAPHIE
HASAMHE	-	0.9730	0.9737	0.9844	0.7619	0.7781
HASAME	0.0270	-	0.9683	0.9781	0.7686	0.7871
HACAMHE	0.0263	0.0317	-	0.9766	0.7904	0.7764
HACAME	0.0156	0.0219	0.0234	-	0.7691	0.7933
HATRAW	0.2381	0.2314	0.2096	0.2309	-	0.8203
HAPHIE	0.2219	0.2129	0.2236	0.2067	0.1797	-

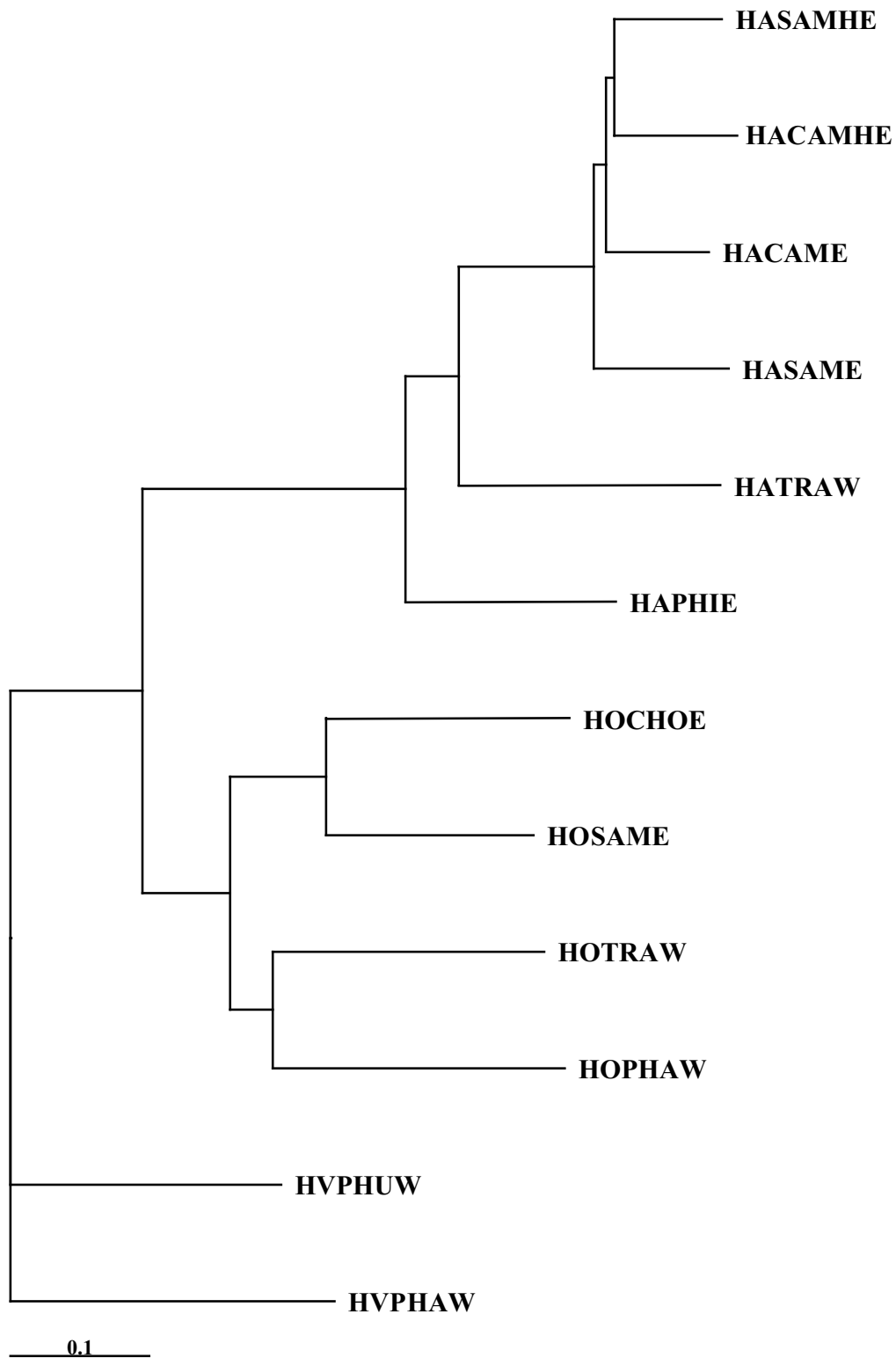
2.2.3 การวิเคราะห์ geographic heterogeneity และแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงภูมิศาสตร์ (Phylogeography)

จากการวิเคราะห์ geographic heterogeneity ของกลุ่มตัวอย่าง *H. asinina* ที่ทำการศึกษาพบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกไพรเมอร์ ($P < 0.0001$) และสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 3 กลุ่มตัวอย่าง โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *H. asinina* จากอ่าวไทย (HACAME, HACAMHE, HASAME และ HASAMHE) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *H. asinina* จากทะเลอันดามัน (HATRAW) และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *H. asinina* จากฟิลิปปินส์ (HAPHIE) ($P < 0.0001$ ตารางที่ 2.8) เมื่อไม่พิจารณาตัวอย่างจากโรงเพาะเลี้ยง (HACAMHE HASAMHE และ HAPHIE) ยังคงพบว่า *H. asinina* ธรรมชาติจากอ่าวไทย (HACAME และ HASAME) มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับ *H. asinina* ธรรมชาติจากทะเลอันดามัน (HATRAW) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$) จากผลการทดลองบ่งชี้ว่า *H. asinina* ในประเทศไทยไม่ได้มีลักษณะพันธุกรรมแบบ panmictic gene pool (ดังที่พบ

ตารางที่ 2.9 การวิเคราะห์ geographic heterogeneity ของกลุ่มตัวอย่างของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* จากการศึกษา RAPD-PCR

Pairwise comparison	พรเมอร์				
	UBC101	UBC195	UBC197	UBC271	OPB11
HASAMHE-HASAME	P = 1.0000 ^{ns}	P = 1.0000 ^{ns}	P = 1.0000 ^{ns}	P = 1.0000 ^{ns}	P = 1.0000 ^{ns}
HASAMHE-HATRAW	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001
HASAMHE-HACAMHE	P = 0.0000	P = 0.0003	P = 0.2803 ^{ns}	P = 0.9206 ^{ns}	P = 0.9993 ^{ns}
HASAMHE-HACAME	P = 0.9983 ^{ns}	P < 0.0001	P = 0.5521 ^{ns}	P = 0.9233 ^{ns}	P = 0.9991 ^{ns}
HASAMHE-HAPHIE	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001
HASAME-HATRAW	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001
HASAME-HACAMHE	P = 1.0000 ^{ns}	P = 0.0007	P = 0.8708 ^{ns}	P = 0.2715 ^{ns}	P = 1.0000 ^{ns}
HASAME-HACAME	P = 1.0000 ^{ns}	P = 0.2338 ^{ns}	P = 0.5431 ^{ns}	P = 0.7939 ^{ns}	P = 1.0000 ^{ns}
HASAME-HAPHIE	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001
HATRAW-HACAMHE	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001
HATRAW-HACAME	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001
HATRAW-HAPHIE	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001
HACAMHE-HACAME	P = 1.0000 ^{ns}	P = 0.0323 ^{ns}	P = 0.9790 ^{ns}	P = 0.1640 ^{ns}	P = 1.0000 ^{ns}
HACAMHE-HAPHIE	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001
HACAME-HAPHIE	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001	P < 0.0001

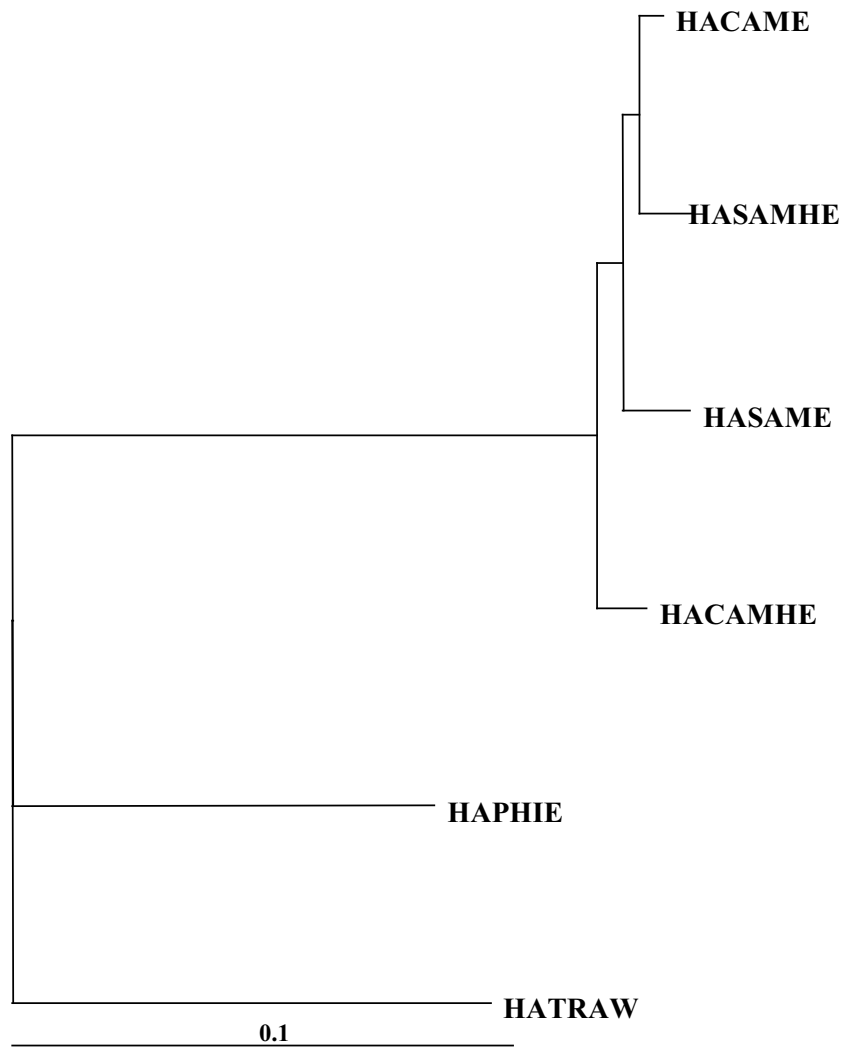
NS = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากปรับค่า significant level ด้วย sequential Bonferroni method (Rice, 1989), ND = ไม่ได้ศึกษา



รูปที่ 2.2 Neighbor-joining tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ที่วิเคราะห์จากค่า genetic distance ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ได้จาก RAPD-PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB11 และ UBC101

ด้วยวิธี PCR-RFLP ของ 16S rDNA บทที่ 1) แต่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์จากฝั่งทะเลอันดามัน และฝั่งอ่าวไทยจากการสร้าง neighbor-joining tree จากค่าเฉลี่ยของ genetic distance ระหว่างคู่ของกลุ่ม ตัวอย่าง (geographic samples) ของหอยเป่าชื่อทั้ง 3 สปีชีส์ แสดงให้เห็นว่า *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* มี phylogenetic differentiation ที่แยกกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 2.2) และพบความแตกต่างทางเชิง phylogeography ใน *H. ovina* โดย neighbor-joining tree สามารถแบ่งแยก *H. ovina* เป็น 2 กลุ่มได้อย่าง ชัดเจน คือ กลุ่มอ่าวไทย (HOCHOE และ HOSAME) และกลุ่มทะเลอันดามัน (HOPHAW และ HOTRAW) สำหรับ *H. varia* เนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างจากเกาะสิมิลัน จังหวัดพังงา (HVPG) น้อย ดังนั้นไม่สามารถสรุปได้

สำหรับแผนภูมิ neighbor-joining ระหว่างกลุ่มตัวอย่างของ *H. asinina* (รูปที่ 2.2) ให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์ geographic heterogeneity โดยความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจาก 6 กลุ่มตัวอย่าง ของ *H. asinina* โดยแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มตัวอย่างจากฝั่งทะเลอัน ดามัน (HATRAW) ฟิลิปปินส์ (HAPHIE) และกลุ่มตัวอย่างจากอ่าวไทย (HASAMHE, HASAME, HACAMHE และ HACAME)



รูปที่ 2.3 Neighbor-joining tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของ *H. asinina* ที่วิเคราะห์จากค่า genetic distance ที่ได้จากรAPD-PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC101, OPB11, UBC195, UBC197 และ UBC271

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของ

หอยเป่าฮือ *Haliotis asinina* ด้วย microsatellites

3.1 วิธีดำเนินการทดลอง

3.1.1 ตัวอย่างหอยเป่าฮือ

ตัวอย่างหอยเป่าฮือที่ใช้ในการสร้างห้องสมุดยีน ได้จากโรงเพาะเลี้ยงที่ใช้พ่อ-แม่พันธุ์หอยจากอ่าวไทย ในการทดสอบความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์ใช้ตัวอย่างหอยจาก 4 แหล่ง ซึ่งเป็นตัวอย่างหอยจากที่เก็บจากธรรมชาติ 2 แหล่ง และตัวอย่างจากโรงเพาะเลี้ยง 2 แหล่ง ตัวอย่างหอยจากธรรมชาติเก็บจากบริเวณเกาะตะลิ่ง จังหวัดตรัง (HATRAW) และจากประเทศกัมพูชาบริเวณชายแดนที่ติดกับจังหวัดตราด (HACAME) ส่วนหอยจากโรงเพาะเลี้ยงใช้ตัวอย่างหอยรุ่น P₀ จากโรงเพาะเลี้ยงที่ใช้พ่อ-แม่พันธุ์หอยจากเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง (HASAMHE) และจากโรงเพาะเลี้ยงที่ใช้พ่อ-แม่พันธุ์หอยจากประเทศกัมพูชา (HACAMHE) ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮือได้ใช้ตัวอย่างหอยจาก 6 กลุ่มตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างหอยเดิมที่ใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 4 กลุ่มตัวอย่าง และเพิ่มอีก 2 กลุ่มตัวอย่าง คือตัวอย่างหอยจากธรรมชาติที่เก็บจากเกาะเสม็ด (HASAME) และหอยจากโรงเพาะเลี้ยงรุ่น F₁ ที่ได้รับจาก Aquaculture Department Southeast Asian Fisheries Development Center (SAFDEC) ประเทศฟิลิปปินส์ (HAPHIE)

3.1.2 การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

3.1.2.1 การสร้างห้องสมุดยีน (genomic libraries) ของหอยเป่าฮือ *H. asinina*

สกัดจีโนมมิกดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อบริเวณเท้าของหอยเป่าฮือ *H. asinina* โดยใช้วิธี proteinase K-phenol-chloroform จากนั้นนำมาสร้างห้องสมุดยีน 3 แบบ แบบแรกจีนดีเอ็นเอที่นำมาใช้สร้างห้องสมุดได้จากการตัดดีเอ็นเอของหอยเป่าฮือด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu I* (ตัดจีโนมมิกดีเอ็นเอของ *H. asinina* ปริมาณ 5 µg ด้วย *Alu I* จำนวน 25 units บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) ห้องสมุดยีนแบบที่สองจีนดีเอ็นเอที่นำมาใช้สร้างได้จากการนำดีเอ็นเอของหอยมาทำให้ขาดด้วยการ vortex และ sonication โดยนำดีเอ็นเอปริมาณ 1 µg ในปริมาตรรวม 22 µl ไป vortex นาน 10 นาที จากนั้นนำไป sonicate ใน sonication bath เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จีนดีเอ็นเอที่นำมาใช้สร้างห้องสมุดยีนแบบที่สามได้จากการตัดดีเอ็นเอของหอยโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะรวมกันสามชนิดคือ *AluI*, *RsaI* และ *HincII* (ตัดจีโนมมิกดีเอ็นเอของของ *H. asinina* ปริมาณ 6 µg ด้วย *AluI*, *RsaI* และ *HincII* อย่างละ 20 units บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง)

นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากทั้ง 3 วิธีไปแยกใน 1.5% agarose gel แล้วสกัดจีนดีเอ็นเอขนาด 300 - 800 bp ออกจากเจลแล้วนำจีนดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้เป็นปลายทู่โดยใช้เอนไซม์ Klenow จากนั้นนำไป ligate

กับพลาสมิด pUC18/Sma I-BAP แล้วโคลนเข้าเซลล์ *E. coli* XL1-blue โดยวิธี electroporation คัดเลือกโคลนที่มี recombinant plasmid บน LB agar plates ที่มี 50 mg/ml Ampicillin

3.1.2.2 การตรวจหาโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์จากห้องสมุดยีน การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และ ออกแบบไพรเมอร์

ตรวจหาโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์โดยใช้วิธี colony hybridization (Grunstein และ Hogness, 1975) โดยใช้ตัวติดตามที่เป็น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ชนิด (GT)₁₅ และ (CT)₁₅ ที่ติดฉลากด้วยสารรังสี [γ -³²P] ATP นำโคลนที่ให้ผลบวกมาสกัดพลาสมิดโดยวิธีของ Holmes และ Quigley (1981) พลาสมิดที่ได้นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ T7 sequencingTM kit (Amersham Pharmacia Biotech) ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ขนานข้างไมโครแซทเทลไลต์โดยใช้โปรแกรม OLIGO 4.0

ทำการทดลองเปรียบเทียบปริมาณไมโครแซทเทลไลต์ชนิด (CT)_n และ (GT)_n ที่กระจายอยู่ในจีโนมของหอยเป่าฮือ โดยการหาคัดดีเอ็นเอของหอยเป่าฮือ *H. asinina* และดีเอ็นเอของกิ้งกูดาค่า *Penaeus monodon* (ใช้เป็นตัวควบคุม) อย่างละ 200 ng ลงแผ่น nylon membrane 2 แผ่น แล้วนำไป hybridize กับตัวติดตาม (CT)₁₅ และ (GT)₁₅ ที่ติดฉลากด้วยสารรังสี [γ -³²P]ATP อย่างละแผ่น เปรียบเทียบปริมาณไมโครแซทเทลไลต์ชนิด (CT)_n และ (GT)_n จากความเข้มของจุดที่ได้หลังจากนำแผ่น membrane ไปทำ autoradiography

3.1.3 การทดสอบความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์

นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาตรวจสอบจีโนมไทป์ของหอยเป่าฮือตัวอย่าง โดยทำPCRในปริมาตร 5 μ l ประกอบด้วย 1x PCR buffer, 200 μ M ของแต่ละ dNTP, 0.45 μ M reverse primer, 0.425 μ M forward primer, 0.025 μ M forward primer ที่ติดฉลากด้วย [γ -³²P]ATP, 0.15 U *Tag* polymerase และดีเอ็นเอต้นแบบ 15 - 25 ng โปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาPCR คือ pre-denaturation 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation 95°C เป็นเวลา 1 นาที, annealing เป็นเวลา 2 นาที อุณหภูมิในปฏิกิริยา annealing แสดงในตารางที่ 3.4, extension 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ extension 72°C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลผลิตจากปฏิกิริยาPCRที่ได้มาตรวจสอบจีโนมไทป์ของหอยเป่าฮือจากขนาดของอัลลีล (ขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยาPCR) โดยการวิเคราะห์ electrophoresis ใน 6% denaturing polyacrylamide gel จากนั้นนำไปทำ autoradiography เพื่อดูขนาดของ ผลผลิตจากปฏิกิริยาPCR ที่ได้บนแผ่นฟิล์ม

เนื่องจากต้องตรวจสอบจีโนมไทป์ของตัวอย่างหอยจำนวนมาก ดังนั้นเพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในจึงใช้วิธี chelex based method (Walsh และคณะ, 1991 และ Altschmied และคณะ, 1997) การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เนื้อเยื่อบริเวณเท้าของหอยเป่าฮือประมาณ 50 mg มาบดใน chelex working solution (5% chelex ในน้ำปริมาตร 400 μ l) (w/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วปั่นแยกตะกอนออกเก็บส่วนใสไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบ

จีโนมไทป์ของหอยเป่าฮื้อ โดยใช้ดีเอ็นเอของหอยที่สกัดได้ 1 μ l ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่สภาวะดังที่กล่าวมาแล้ว

3.1.4 การทดสอบความไวในการตรวจจีโนมไทป์

การทดสอบความไวในการตรวจสอบจีโนมไทป์ของหอยเป่าฮื้อ พิจารณาในแง่ของเวลาและปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ในเวลาที่เหมาะสม โดยนำไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่งที่ใช้เวลาในการตรวจสอบ (เวลาในการทำ autoradiography) น้อยที่สุดและมากที่สุด มาใช้ประเมินความไวในการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ในทุกๆ ตำแหน่ง

ในการทดสอบดูปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบจีโนมไทป์ได้ ได้ทำการทดลองโดยการเตรียมสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาPCR ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน 12 ความเข้มข้น โดยใช้ดีเอ็นเอ 25 ng มาทำ two-fold serial dilutions จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาPCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่มีความไวในการตรวจสอบจีโนมไทป์มากที่สุดและน้อยที่สุดมาตรวจสอบ โดยที่สารรังสีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาPCR ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) มีความแรงเท่ากับ 3,000 Ci/mmol ในวันที่เริ่มทำการทดลอง จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ไปวิเคราะห์ electrophoresis และ autoradiography โดยประกบฟิล์มที่เวลาต่างๆ เพื่อหาเวลาที่เหมาะสม

นอกจากการทดสอบหาปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดแล้ว ได้ทำการทดสอบระยะของหอยเป่าฮื้อที่สามารถนำมาตรวจสอบจีโนมไทป์ได้ โดยนำหอยเป่าฮื้อระยะ spat 3 ตัวมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้หอยทั้งตัวบดใน 400 μ l ของ chelex working solution ทำการสกัดดีเอ็นเอ และนำดีเอ็นเอปริมาตร 1 μ l มาตรวจสอบจีโนมไทป์โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่มีความไวในการตรวจสอบจีโนมไทป์มากที่สุดและน้อยที่สุดมาใช้ตรวจสอบ

3.1.5 การใช้ไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาได้ในการตรวจสอบหอยเป่าฮื้อชนิด *H. ovina* และ *H. varia* (cross amplification)

นำดีเอ็นเอของหอยเป่าฮื้อ *H. ovina* และ *H. varia* ที่สกัดโดยวิธี proteinase K-phenol-chloroform ชนิดละ 5 ตัวมาตรวจสอบจีโนมไทป์โดยการทำปฏิกิริยาPCR ตามสภาวะเดียวกันการตรวจสอบใน *H. asinina*

3.1.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เลือกไมโครแซทเทลไลต์ 3 ตำแหน่ง (Has2, Has3 และ Has8) มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* ทั้ง 6 กลุ่มตัวอย่าง โดยนำจีโนมไทป์ที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติดังนี้

3.1.6.1 การวิเคราะห์ *Genotypic disequilibrium*

ทำการวิเคราะห์ *Genotypic disequilibrium* ของไมโครแซทเทลไลต์ที่สามารถนำมาใช้ได้ทั้งหมด เพื่อทดสอบว่าไมโครแซทเทลไลต์แต่ละตำแหน่งมีความเกี่ยวข้องกันอย่างไร โดยพิจารณาจากจีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลต์ในแต่ละตำแหน่งว่ามี segregation ที่ไม่เป็นแบบสุ่ม (non-random) กับจีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลต์ในตำแหน่งอื่นๆหรือไม่ โดยใช้วิธี Exact test (Raymond และ Rousset, 1995) ในโปรแกรม GENEPOP โดยทดสอบกับจีโนไทป์ของตัวอย่างหอยเป่าชื่อจาก HATRAW และ HASAME

3.1.6.2 การทดสอบสมมติฐาน Hardy-Weinberg ของกลุ่มตัวอย่าง

ทำการทดสอบกลุ่มตัวอย่างหอยเป่าชื่ออยู่ในสมมติฐาน Hardy-Weinberg หรือไม่โดยใช้วิธี Markov chain (Guo และ Thomson, 1992) ทดสอบสมมติฐานว่ามี heterozygote deficiency หรือไม่ โดยใช้โปรแกรม GENEPOP ปรับระดับความน่าจะเป็นที่จะปฏิเสธสมมติฐานโดยใช้วิธี sequential Bonferroni (Rice, 1989)

3.1.6.3 ความแตกต่างทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างหอยเป่าชื่อจากแหล่งต่างๆ

ศึกษา geographic heterogeneity ของแต่ละคู่ตัวอย่างโดย พิจารณาจากการกระจายของอัลลีลที่ไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละคู่ตัวอย่างว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยตั้งสมมติฐานว่าการกระจายของอัลลีลของแต่ละคู่ตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทดสอบสมมติฐานโดยใช้วิธี exact test (Raymond และ Rousset, 1995) ในโปรแกรม GENEPOP

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างโดยใช้วิธี Wright's F_{ST} statistics (Wright, 1978) คำนวณค่า F_{ST} จากความถี่จีโนไทป์ภายใต้เงื่อนไขที่ว่า การกระจายของจีโนไทป์ระหว่างคู่ตัวอย่างที่ตรวจสอบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (null hypothesis; H_0) โดยใช้โปรแกรม GENEPOP ปรับระดับความน่าจะเป็นที่จะปฏิเสธสมมติฐานโดยใช้วิธี sequential Bonferroni (Rice, 1989)

3.1.6.4 ระยะห่างทางพันธุกรรมและแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ของกลุ่มตัวอย่างหอยเป่าชื่อจากแหล่งต่างๆ

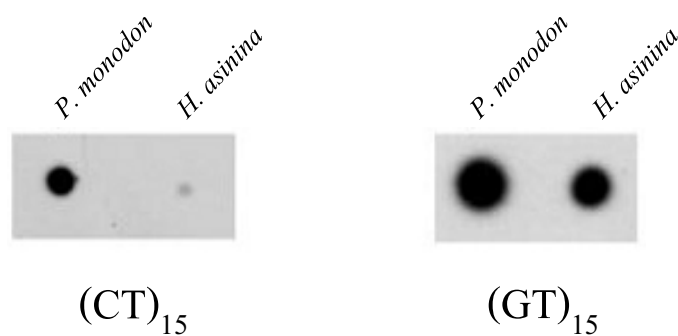
คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่กลุ่มตัวอย่างคำนวณโดยใช้วิธีของ Cavalli-Sforza และ Edwards (1967) โดยนำข้อมูลความถี่ของอัลลีลมาใช้คำนวณระยะห่างโดยใช้โปรแกรม Gendist ใน PHYLIP (Felsenstein, 1993) ทำการ bootstrap ข้อมูลจำนวน 2,000 ครั้ง และสร้าง phylogenetic tree โดยใช้วิธี neighbor-joining

3.2 ผลการทดลองการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างประชากรของหอยเป่าฮือ *Haliotis asinina* ด้วย microsatellites

3.2.1 การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

3.2.1.1 การตรวจหาโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์จากห้องสมุดยีน

จากการสร้างห้องสมุดยีน 3 แบบ เพื่อค้นหาไมโครแซทเทลไลต์ในหอยเป่าฮือ *H. asinina* ห้องสมุดแรกได้จากการตัดดีเอ็นเอของหอยเป่าฮือด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* ห้องสมุดยีนแบบที่สองได้จากการทำดีเอ็นเอของหอยเป่าฮือให้ขาดด้วยการ vortex และ sonication ห้องสมุดยีนแบบที่สามได้จากการตัดดีเอ็นเอของหอยเป่าฮือโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะรวมกันสามชนิดคือ *Alu I*, *Rsa I* และ *Hinc II* เมื่อตรวจหาไมโครแซทเทลไลต์ด้วยตัวตรวจสอบ (GT)₁₅ พบว่าห้องสมุดยีนแรก (2,510 โคลน) ให้โคลนที่ให้ผลบวกน้อยที่สุดคือ 0.2% ขณะที่แบบที่สาม (3,487 โคลน) ให้ผลบวกมากที่สุด (1.46%) ส่วนห้องสมุดยีนแบบที่สอง (4,564 โคลน) ให้ผลบวก 0.43% เมื่อตรวจหาไมโครแซทเทลไลต์ด้วยตัวตรวจสอบ (CT)₁₅ กับห้องสมุดยีนแบบที่สอง (4,464 โคลน) พบว่าให้ผลบวกเพียง 0.07% นอกจากนี้จากการทำ dot blot hybridization พบว่าหอยเป่าฮือมีไมโครแซทเทลไลต์ชนิด (CT)_n น้อยกว่าชนิด (GT)_n มาก และจากผลการทดลองดังกล่าวยังแสดงให้เห็นด้วยว่าในหอยเป่าฮือ *H. asinina* มีไมโครแซทเทลไลต์ชนิด (GT)_n และ (CT)_n น้อยกว่าในกึ่งกุลาดำ *Panaeus monodon* (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 ผลการทำ dot blot hybridization ของดีเอ็นเอของกึ่งกุลาดำ (*P. monodon*) และดีเอ็นเอของหอยเป่าฮือ *H. asinina* (อย่างละ 200 ng) โดยใช้ตัวติดตาม (GT)₁₅ และ (CT)₁₅ ที่ติดฉลากด้วยสารรังสี ³²P

3.2.1.2 ลักษณะของไมโครแซทเทลไลต์ที่พบจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อนำโคลนที่ให้ผลบวกจำนวน 68 โคลนมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีไมโครแซทเทลไลต์ทั้งหมด 26 โคลน (38.2%) โดยที่พบไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 33 ตำแหน่ง พบไมโครแซทเทลไลต์ชนิด perfect, imperfect และ compound ในอัตราส่วนที่เท่ากันคือ 11 โคลน แม้ว่าจากการทดลองจะใช้ตัวติดตามชนิด (GT)_n และ (CT)_n แต่ก็ยังพบไมโครแซทเทลไลต์ที่มีรูปแบบอื่นด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 3.1, 3.2, และ 3.3) โดยพบไมโครแซทเทลไลต์ที่มีรูปแบบของหน่วยซ้ำ 3 ชนิดคือ แบบที่มีเบสซ้ำเป็น di-, tetra- และ hexanucleotides โดยที่ไมโครแซทเทลไลต์ชนิด di- และ tetranucleotides มีจำนวนหน่วยซ้ำอยู่ในช่วง 8 - 37 และ 3 - 45 หน่วยซ้ำ ตามลำดับ ขณะที่พบ ไมโครแซทเทลไลต์ชนิด hexanucleotides ที่มีจำนวนหน่วยซ้ำ 6 หน่วย เพียง 1 ครั้ง

ตารางที่ 3.1 ไมโครแซทเทลไลต์ชนิด perfect ที่พบในหอยเป่าฮือ *H. asinina*

ชนิด	หน่วยซ้ำ	จำนวน โคล์ส
Dinucleotide	(GT/CA) _n	6
	(CG/GC) _n	-
Tetranucleotide	(GGTT) _n	1
	(GTGA) _n	2
	(GTGC) _n	1
Hexanucleotide	(GTGTGC) _n	1

ตารางที่ 3.2 ไมโครแซทเทลไลต์ชนิด imperfect ที่พบในหอยเป่าฮือ *H. asinina*

ชนิด	หน่วยซ้ำ	จำนวน โคล์ส
Dinucleotide	(AT/TA) _n	1
	(CT/GA) _n	1
	(GT/CA) _n	7
Tetranucleotide	(GTGA) _n	2

3.2.1.3 การทดสอบความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์

จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไมโครแซทเทลไลต์ 33 ตำแหน่ง สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ได้ 14 คู่ แต่พบว่ามีเพียง 10 คู่ (Has1 - Has10) ที่สามารถนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ได้สำเร็จ อุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ในการทำปฏิกิริยา PCR (T_A) แสดงในตารางที่ 3.4 เมื่อนำตัวอย่างหอยเป่าฮือ 4 กลุ่มตัวอย่าง (HATRAW, HACAME, HASAMHE และ HACAMHE) มาตรวจสอบจีโนไทป์เพื่อ

ตารางที่ 3.3 ไมโครแซทเทลไลต์ชนิด compound ที่พบในหอยเป่าชื่อ *H. asinina*

ชนิด	หน่วยซ้ำ	จำนวน โลคัส
di-di	(AG) ₂₁ (GT) ₁₄	1
	(AT) ₇ (GT) ₃₇	1
	(GT) ₂₄ (GA) ₁₈	1
	(GT) ₁₇ (AG) ₁₀	1
di-tetra	(GT) ₁₁ (CTGT) ₇	1
	(GT) ₃₇ (CTGT) ₈	1
	(GT) ₆ (TGCA) ₄	1
	(GT) ₉ (TGAG) ₆	1
	(GT) ₁₃ (AGTG) ₅	1
tetra-tetra	(AGTG) ₇ AG(AGTG) ₁₉	1
tetra-tetra-tetra-di	(CTAT) ₁₀ (GTAT) ₂₃ (CTAT) ₁₂ (AC) ₂₀	1

ตารางที่ 3.4 หน่วยซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ของ *H. asinina* อุณหภูมิในปฏิกิริยา annealing (T_A) สำหรับการทำให้ PCR และขนาดของอัลลีลที่พบใน recombinant clone และขนาดของอัลลีลที่พบในการทดลอง

ตำแหน่ง	หน่วยซ้ำ	T _A (°C)	ขนาดของอัลลีล พบในโคลน (bp)	ขนาดของอัลลีล ที่พบ (N) [#] (bp)
Has1	(GT) ₁₇ N ₃₆ (GT) ₁₀	53	257	258-360 (72)
Has2	(AT) ₇ (GT) ₃₇	57	333	286-340 (65)
Has3	(GT) ₂₄ (GA) ₁₈	57	175	134-178 (71)
Has4	(GT) ₆ (TGCA) ₄ N ₁₅ (GT) ₇	57	254	222-250 (67)
Has5	(GT) ₁₇	49	98	104-173 (72)
Has6	(GT) ₁₉	57	232	232-240 (48)
Has7	(ACGC) ₆	49	117	112-126 (48)
Has8	(AGTG) ₁₆	49	191	148-238 (72)
Has9	(GT) ₃₄	53	117	148-240 (48)
Has10	(CA) ₁₆ CG(CA) ₄	53	140	118-160 (48)

(N)[#] จำนวนตัวอย่าง

ประเมินระดับความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์ในแต่ละตำแหน่งพบว่าไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 10 ตำแหน่งมีความหลากหลาย และมีขนาดของอัลลีลอยู่ในช่วง 104 - 360 bp (ตารางที่ 3.4) โดยที่ตำแหน่ง Has1 เป็นตำแหน่งที่มีความหลากหลายสูงสุด คือมีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 26 อัลลีล และมีค่า observed heterozygosity 0.85 ขณะที่ตำแหน่ง Has7 มีความหลากหลายต่ำที่สุดคือมีจำนวนอัลลีล 3 อัลลีล และมีค่า heterozygosity 0.27 ค่า expected heterozygosity ของไมโครแซทเทลไลต์ทุกตำแหน่ง (ยกเว้น Has7) มีค่าสูงกว่าค่า observed heterozygosity (ตารางที่ 3.5)

ตารางที่ 3.5 จำนวนอัลลีลทั้งหมด ค่า expected heterozygosity และ observed heterozygosity ที่ได้จากการตรวจสอบจีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 10 ตำแหน่ง โดยใช้ตัวอย่างหอยเป่าชื่อ *H. asinina* จาก 4 กลุ่มตัวอย่าง (ตะลิ่ง HATRAW, กัมพูชา HACAME, โรงเพาะเลี้ยงเกาะเสม็ด HASAMHE และ โรงเพาะเลี้ยงกัมพูชา HACAME)

ตำแหน่ง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนอัลลีล	Heterozygosity	
			observed	expected
Has1	72	26	0.85	0.93
Has2	65	21	0.68	0.93
Has3	71	13	0.62	0.82
Has4	67	5	0.40	0.59
Has5	72	19	0.35	0.91
Has6*	48	6	0.75	0.71
Has7*	48	3	0.27	0.24
Has8	76	19	0.71	0.88
Has9 [#]	48	26	0.81	0.92
Has10 [#]	48	9	0.42	0.63

*ไม่รวมตัวอย่างจาก HATRAW ซึ่งไม่สามารถให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาPCRได้

#ไม่รวมตัวอย่างจาก HASAMHE และ HACAMHE เนื่องจากไม่ได้ทำการตรวจสอบจีโนไทป์

3.2.1.4 ลักษณะของไมโครแซทเทลไลต์แต่ละตำแหน่งที่พบ

Has1

ไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่งนี้มีลักษณะเป็นการรวมกันของไมโครแซทเทลไลต์ชนิด $(GT)_n$ จำนวน 2 บริเวณ $((GT)_{17}, N_{36}(GT)_{10})$ ช่วงขนาดของอัลลีลกว้าง (258 - 360 bp) ดังนั้นจึงมีความแตกต่างกันของความเข้มของอัลลีลมากระหว่างอัลลีลขนาดใหญ่และขนาดเล็ก อัลลีลขนาดใหญ่จำเป็นต้องใช้เวลาในการประกอบฟิล์มนานกว่าขนาดเล็ก ดังนั้นการตรวจหาจีโนไทป์ของหอยในตำแหน่งนี้จึงค่อนข้างยากและอาจเกิด null alleles (มีอัลลีลจากการทำ PCR ไม่ครบทำให้ตัวอย่างที่เป็น heterozygotes ในตำแหน่งที่ตรวจสอบกลายเป็น homozygotes) ได้ง่าย

Has2

ไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่งนี้เป็นไมโครแซทเทลไลต์ชนิด compound มีหน่วยซ้ำเป็น $(AT)_7(GT)_{37}$ ขนาดของอัลลีลมีขนาดอยู่ในช่วง 286 - 340 bp และสามารถอ่านได้ง่ายแม้ว่าจะมี stutter bands เนื่องจากมีขนาดใหญ่ ดังนั้นการตรวจสอบจีโนไทป์จึงต้องใช้เวลาในการทำ electrophoresis และ autoradiography นาน ที่ตำแหน่งนี้พบที่มีความหลากหลายสูง

Has3

ไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่งนี้เป็นไมโครแซทเทลไลต์ชนิด compound microsatellite มีหน่วยซ้ำเป็น $(GT)_{24}(GA)_{18}$ ระดับความหลากหลายของตำแหน่งนี้ไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับ Has1 แต่ขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR มีขนาดเล็ก (134 - 178 bp) และอ่านได้ง่าย

Has4

ไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่งนี้มีลักษณะเป็นการรวมกันของไมโครแซทเทลไลต์ชนิด $(GT)_6$ $(TGCA)_4N_{15}(GT)_7$ ขนาดของอัลลีลอยู่ในช่วง 220 - 250 bp มีความหลากหลายต่ำ ตำแหน่งนี้มีความไวในการตรวจหาจีโนไทป์ที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่าง *H. asinina* จากอ่าวไทย (HACAME, HACAMHE และ HASAMHE) กับ *H. asinina* จากทะเลอันดามัน (HATRAW) โดยไมโครแซทเทลไลต์ที่ได้ในการวิจัยครั้งนี้ได้มาจาก หอยเป่าฮือจากฝั่งอ่าวไทย จึงมีความเป็นไปได้ว่า หอยเป่าฮือจากฝั่งอันดามันมีความห่างทางพันธุกรรมกับหอยเป่าฮือจากอ่าวไทย ดังนั้นตำแหน่งที่ไพรเมอร์อาจเกาะกับ template ด้วย efficiency ที่ต่างกัน

Has5

ไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่งนี้เป็นไมโครแซทเทลไลต์ชนิด perfect มีหน่วยซ้ำเป็น $(GT)_{17}$ ตำแหน่งนี้มีความหลากหลายสูง ขนาดของอัลลีลอยู่ในช่วง 104 - 173 bp มีจำนวนอัลลีลมากแต่มีระดับของ heterozygosity ต่ำ ตามทฤษฎีแล้วอาจจะเกิด null allele ในตำแหน่งนี้ได้ การทดสอบการเกิด null alleles

สามารถตรวจสอบกับ pedigreed samples หลายๆครอบครัว อย่างไรก็ตามระบบการผลิตหอยเป่าชื่อในปัจจุบัน เป็นแบบ mass spawning ทำให้ผู้วิจัยไม่มีตัวอย่างในการตรวจสอบ null alleles ที่ไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งต่างๆ

Has6

ไมโครแซทเทลไลท์ในตำแหน่งนี้เป็น perfect มีหน่วยซ้ำเป็น $(GT)_{10}$ ขนาดของอัลลีลมีขนาดอยู่ในช่วง 231 - 240 bp และสามารถอ่านได้ง่าย อย่างไรก็ตามมีเพียง 6 อัลลีลเท่านั้นที่พบจากการตรวจสอบตัวอย่าง *H. asinina* จาก HACAME, HACAMHE และ HASAMHE และไม่สามารถให้ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ตัวอย่างจาก HATRAW

Has7

ไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่งนี้เป็น perfect มีหน่วยซ้ำชนิด tetranucleotide repeats $(ACGC)_6$ ขนาดของอัลลีลมีขนาดเล็ก (112 - 126 bp) ดังนั้นจึงสามารถอ่านจีโนมได้ band ที่ได้คมชัดและไม่มี stutter band แต่ไม่สามารถให้ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ตัวอย่างจาก HATRAW เช่นกัน

Has8

ไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งนี้มีหน่วยซ้ำเป็น tetranucleotide repeats $(AGTG)_{16}$ ขนาดของอัลลีลอยู่ในช่วง 148 - 238 bp และมีค่า heterozygosity สูง รูปแบบของอัลลีลคมชัดและสะอาดและมี stutter band งามๆ 2-3 bands ดังนั้นตำแหน่งนี้จึงสามารถตรวจสอบได้ง่าย

Has9

ไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งนี้เป็นชนิด perfect อีกตำแหน่งหนึ่ง ที่มีหน่วยซ้ำเป็น $(GT)_{34}$ ได้ใช้ทดสอบความหลากหลายเฉพาะตัวอย่างจาก HATRAW และ HACAME เท่านั้น รูปแบบของอัลลีลของตำแหน่งนี้มีความคมชัดและมี stutter bands ที่ตำแหน่งนี้มีความหลากหลายสูงมีจำนวนอัลลีลมากและมีระดับของ heterozygosity ที่สูง ขนาดของอัลลีลของตัวอย่างจาก HATRAW มีขนาดเล็กกว่าของตัวอย่างจาก HACAME (HATRAW, 148 - 162 bp; HACAME 184 - 240 bp) ดังนั้นจึงอาจแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันระหว่างตัวอย่างหอยเป่าชื่อจาก 2 แหล่งนี้

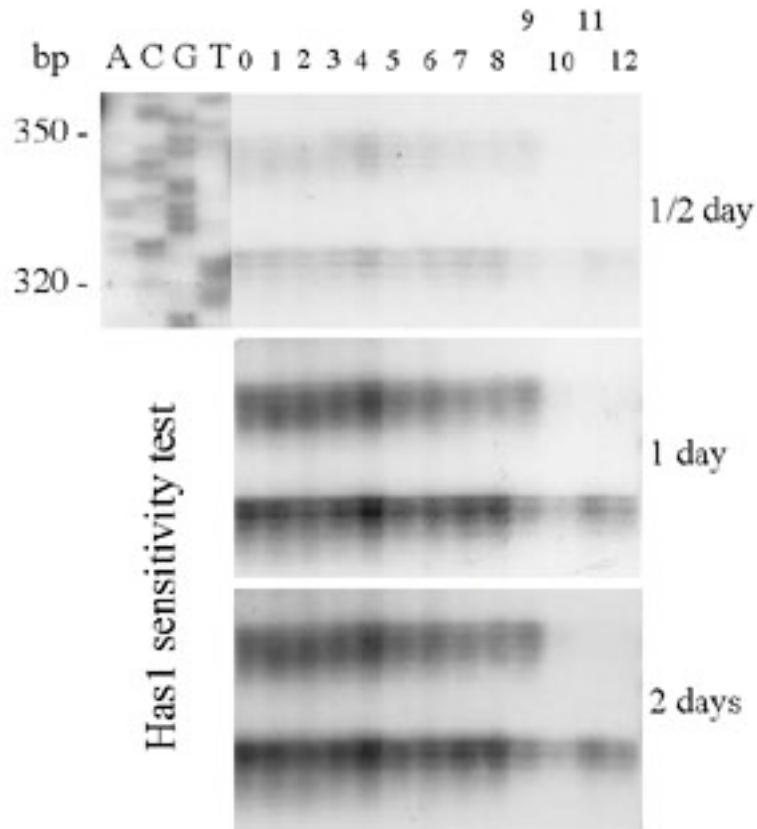
Has10

ไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่งนี้เป็น imperfect dinucleotide repeats และได้ใช้ทดสอบความหลากหลายเฉพาะตัวอย่างจาก HATRAW และ HACAME เท่านั้น มี stutter band ขนาดของอัลลีลมีขนาดเล็ก (118 - 160 bp) และอ่านง่าย แต่มีระดับของความหลากหลายค่อนข้างต่ำ

3.2.2 การทดสอบความไวในการตรวจจีโนมไทป์ และการใช้ไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาได้ในการตรวจสอบหอยเป่าฮือ *H. asinina* และ *H. varia* (cross-amplification)

เนื่องจากการตรวจสอบจีโนมไทป์ของหอยเป่าฮือโดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาได้ทั้ง 10 ตำแหน่งพบว่า ไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่ง Has4 เป็นตำแหน่งที่ให้ความไวในการตรวจสอบมากที่สุด ขณะที่ตำแหน่ง Has1 ให้ความไวในการตรวจสอบน้อยที่สุด ดังนั้นในการทดสอบความไวในการตรวจสอบจีโนมไทป์ของ *H. asinina* โดยจึงได้เลือกใช้ไมโครแซทเทลไลต์ 2 ตำแหน่งนี้มาใช้ประเมินความไวในการตรวจสอบจีโนมไทป์ของทุกตำแหน่ง จากการทดลองพบว่าเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบสั้นที่สุดประมาณ 2 ชั่วโมง ถึง 1 วันขึ้นอยู่กับตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์ที่ตรวจสอบ ความแรงของสารรังสีที่ใช้ในการตรวจสอบขณะนั้น และดีเอ็นเอต้นแบบประมาณ 50 พิโคกรัมสามารถตรวจจีโนมไทป์ได้ถูกต้องในระยะเวลาดังกล่าว (รูปที่ 3.2 และ 3.3) นอกจากนี้พบว่าสามารถใช้ตรวจจีโนมไทป์ของลูกหอยเป่าฮือ *H. asinina* ระยะ spat ได้ (รูปที่ 3.4)

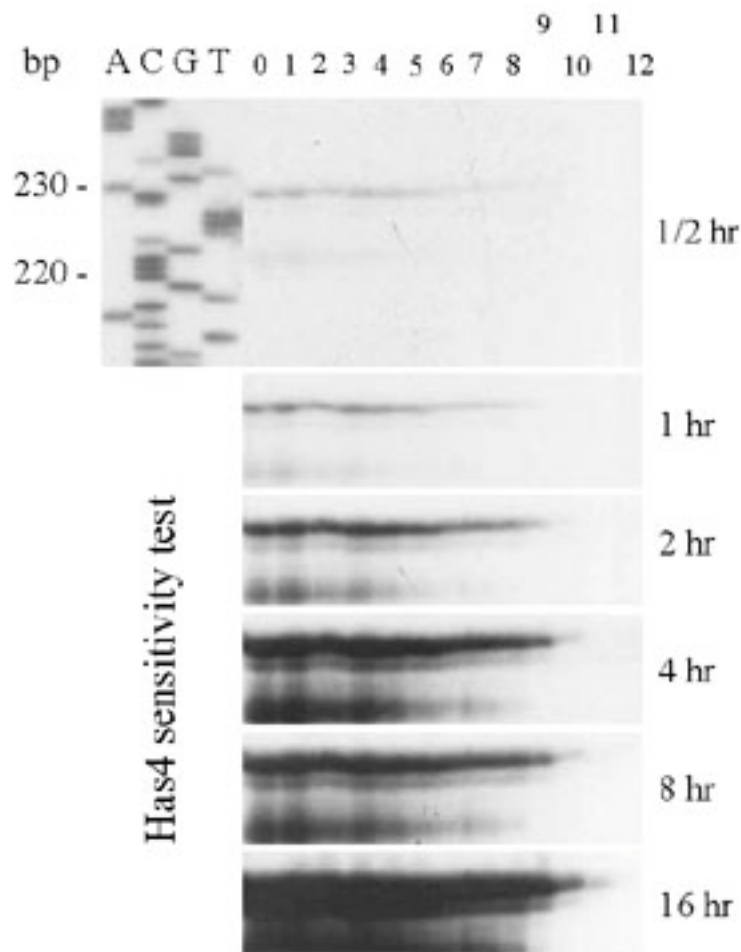
จากการทดลองทำ PCR กับหอยเป่าฮือ *H. ovina* และ *H. varia* พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 10 คู่นี้ไม่สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหอยเป่าฮือ *H. ovina* และ *H. varia* ได้



รูปที่ 3.2 ความไวในการตรวจสอบจีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่ง Has1 (เวลาในการประกบฟิล์มที่ 1/2 วัน 1 วัน และ 2 วัน)

ช่อง ACGT = marker (sequencing ladder ของ M13 mp18)

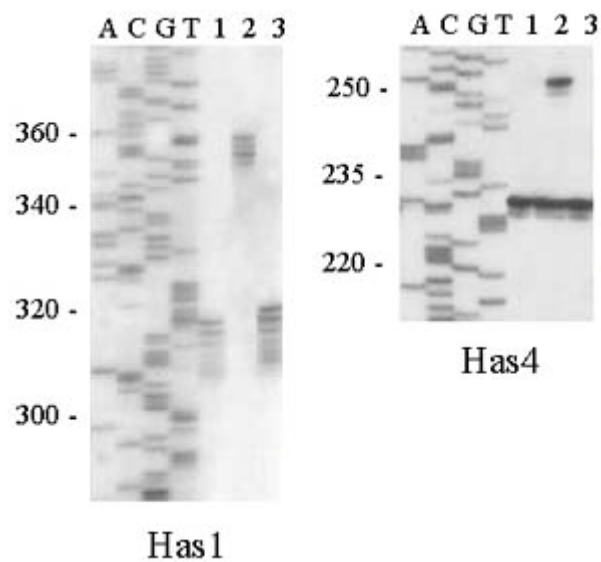
ช่องที่ 0-12 = รูปแบบของผลผลิตจากปฏิกิริยาPCR ที่ได้จากการใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20 และ 0.10 ng และ 48.83, 24.41, 12.21 และ 6.10 pg ตามลำดับ



รูปที่ 3.3 ความไวในการตรวจสอบจีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่ง Has4 (เวลาในการประกบฟิล์มที่ 1/2, 1, 2, 4, 8 และ 16 ชั่วโมง) โดยใช้ sequencing ladder ของ M13 mp18 เป็น marker

ช่อง ACGT = marker (sequencing ladder ของ M13 mp18)

ช่องที่ 1-3 = รูปแบบของผลผลิตจากปฏิกิริยาPCR ที่ได้จากการใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20 และ 0.10 ng และ 48.83, 24.41, 12.21 และ 6.10 pg ตามลำดับ



รูปที่ 3.4 รูปแบบของไมโครแซทเทลไลต์ที่ตำแหน่ง Has1 และ Has4 ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* อายุ 2 สัปดาห์ (ระยะ spat)

ช่อง ACGT = marker (sequencing ladder ของ M13 mp18)

ช่องที่ 1-3 = รูปแบบของผลผลิตจากปฏิกิริยาPCR ที่ได้จากการใช้ดีเอ็นเอของลูกหอยเป่าชื่อแต่ละตัว

3.2.3 การวิเคราะห์ Genotypic disequilibrium

จากการวิเคราะห์ Genotypic disequilibrium ของไมโครแซทเทลไลต์ 8 ตำแหน่ง (ไม่ได้วิเคราะห์ตำแหน่ง Has6 และ Has7 เนื่องจาก 2 ตำแหน่งนี้ไม่สามารถให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาPCR กับ HATRAW โดยการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนไทป์ของตัวอย่างหอยจาก HATRAW และ HACAME พบว่าจีโนไทป์ของทุกตำแหน่งมีความเกี่ยวข้องกันอย่างสูง ($P > 0.0031$) (ตารางที่ 3.6)

3.2.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮือ *H. asinina*

3.2.4.1 ขนาดและการกระจายอัลลีลของไมโครแซทเทลไลต์ในหอยเป่าฮือ *H. asinina*

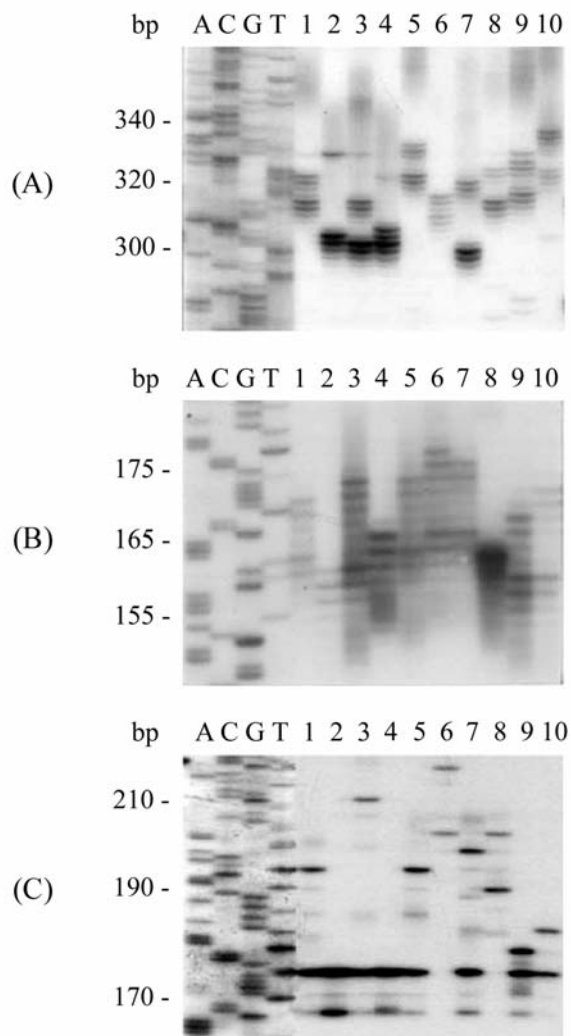
จากการใช้ไมโครแซทเทลไลต์ 3 ตำแหน่ง Has2, Has3 และ Has8 มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างของหอยเป่าฮือ *H. asinina* 6 กลุ่มตัวอย่าง คือ HATRAW, HASAME, HACAME, HAPHIE, HASAMHE และ HACAMHE ตัวอย่างผลผลิตจากปฏิกิริยาPCR ของไมโครแซทเทลไลต์ 3 ตำแหน่งนี้แสดงในรูปที่ 3.5

ตารางที่ 3.6 การวิเคราะห์ genotypic disequilibrium ของไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่ง Has1, Has2, Has3, Has4, Has5, Has8, Has9 และ Has10 โดยใช้ตัวอย่างจาก HATRAW และ HACAME

	Has1	Has2	Has3	Has4	Has5	Has8	Has9	Has10
Has1	-							
Has2	1.0000 ^{ns}	-						
Has3	0.0480 ^{ns}	1.0000 ^{ns}	-					
Has4	0.6522 ^{ns}	0.4474 ^{ns}	0.2029 ^{ns}	-				
Has5	0.9816 ^{ns}	0.1131 ^{ns}	0.3816 ^{ns}	0.9826 ^{ns}	-			
Has8	0.8208 ^{ns}	1.0000 ^{ns}	0.2381 ^{ns}	0.5223 ^{ns}	0.9902 ^{ns}	-		
Has9	0.7085 ^{ns}	1.0000 ^{ns}	0.6899 ^{ns}	0.6828 ^{ns}	0.7118 ^{ns}	0.7069 ^{ns}	-	
Has10	0.9994 ^{ns}	0.3478 ^{ns}	0.9852 ^{ns}	0.3326 ^{ns}	0.0067 ^{ns}	0.5770 ^{ns}	0.5229 ^{ns}	-

* ระดับนัยสำคัญถูกปรับเป็น $P < 0.00625$ โดยวิธี sequential Bonferroni

ns = ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 3.5 รูปแบบไมโครแซทเทลไลต์ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* 10 ตัว (ช่องที่ 1-10) ที่ตำแหน่ง Has2 (A), Has3 (B) และ Has8 (C) ขนาดของอัลลีลเทียบกับ sequencing ladder ของ M13 mp18 (ACGT)

จากการตรวจสอบจีโนมโทปีของหอยเป่าฮื้อ 106 ตัวจาก 6 กลุ่มตัวอย่าง โดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์ Has2, Has3 และ Has8 พบจำนวนอัลลีล 23, 18 และ 21 อัลลีล ตามลำดับ โดยที่ตำแหน่ง Has2 อัลลีลมีขนาดใหญ่และกระจายอยู่ในช่วง 286-340 bp ขณะที่ Has3 ซึ่งมีขนาดอัลลีลเล็กมีการกระจายของอัลลีลอยู่ในช่วง 134-196 bp ส่วน Has8 มีการกระจายของอัลลีลอยู่ในช่วง 148 - 238 bp (ตารางที่ 3.7)

รูปแบบการกระจายอัลลีลมีความหลากหลายมากที่ตำแหน่ง Has2 (รูปที่ 3.6) ที่ตำแหน่ง Has3 มีอัลลีลที่มีขนาด 160 bp มีความถี่ที่พบสูงมาก (0.760) ในตัวอย่างจากเกาะตะลิงบิง ตรัง (HATRAW รูปที่ 3.7) ที่ตำแหน่ง Has8 พบเพียง 2 และ 4 อัลลีลในกลุ่มตัวอย่างจากฟิลิปปินส์ (HAPHIE) และเกาะตะลิงบิง ตามลำดับ (รูปที่ 3.8) รูปแบบการกระจายอัลลีลทั้ง 3 ตำแหน่งของ HASAME, HACAME, HACAMHE และ HASAMHE มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันแต่มีความแตกต่างจากตัวอย่างจากเกาะตะลิงบิงและฟิลิปปินส์ ที่ตำแหน่ง Has2 ตัวอย่างธรรมชาติจากเกาะตะลิงบิง ให้จำนวนอัลลีลมากที่สุด (17 อัลลีล) ขณะที่ *H. asinina* จากฟิลิปปินส์ให้เพียง 4 อัลลีล

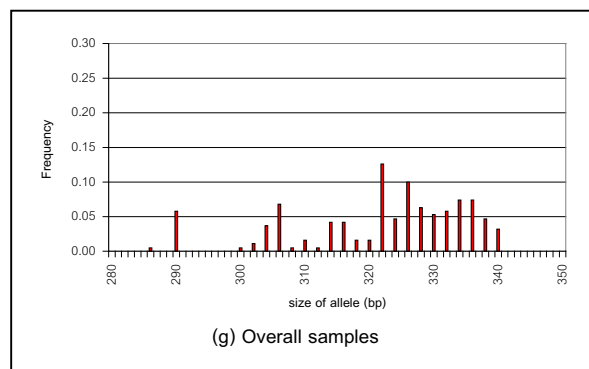
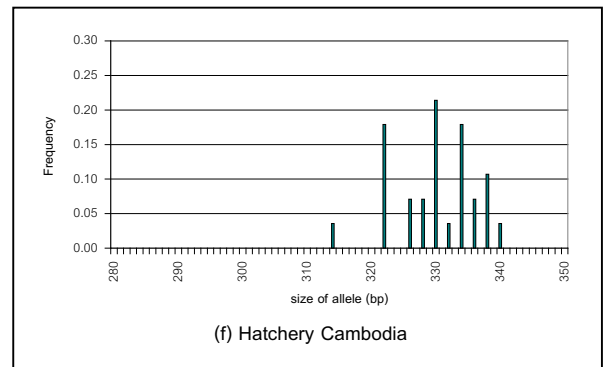
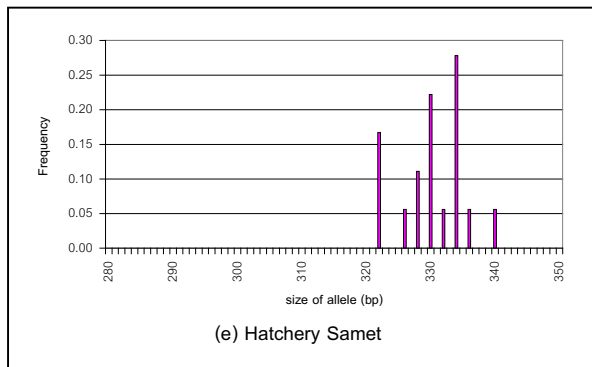
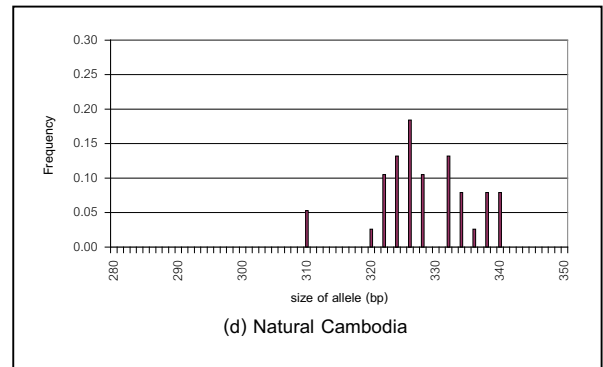
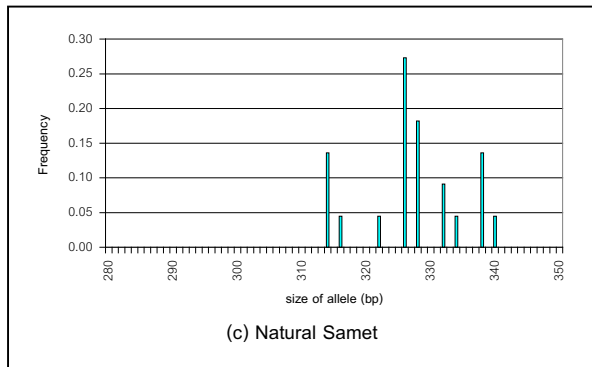
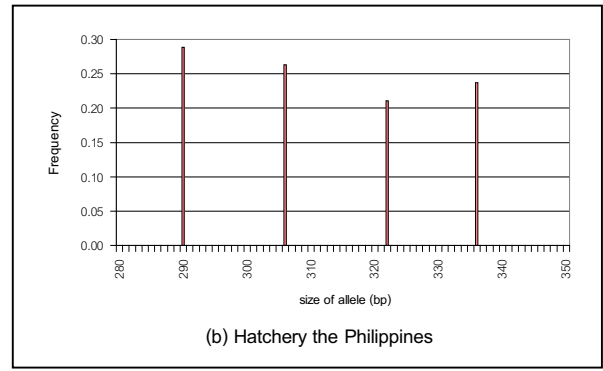
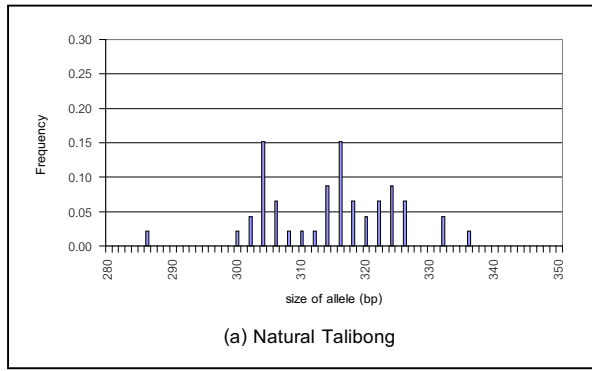
3.2.4.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มตัวอย่างของ *H. asinina*

จากการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 6 กลุ่มตัวอย่างของ *H. asinina* พบว่า Has2 เป็นตำแหน่งที่มีความหลากหลายสูงที่สุดตามด้วย Has3 และ Has8 เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของจำนวนอัลลีลและจำนวน effective number of alleles (9.67 และ 9.14; 7.33 และ 6.67 และ 7.50 และ 5.54 ตามลำดับ) (ตารางที่ 3.7) ค่าเฉลี่ยของ observed heterozygosity เป็น 0.63 (Has8), 0.72 (Has2) และ 0.78 (Has3) ตัวอย่างหอยจากฟิลิปปินส์มีจำนวนอัลลีลน้อยที่สุดและที่ตำแหน่ง Has8 มีค่า observed heterozygosity เท่ากับ 0.00 แต่มี observed heterozygosity ที่ตำแหน่ง Has2 และ Has3 เท่ากับ 1.00 ค่า observed heterozygosity ใน *H. asinina* จากกัมพูชา (Has3) และฟิลิปปินส์ (Has2 และ Has3) มีค่าสูงกว่า expected heterozygosity

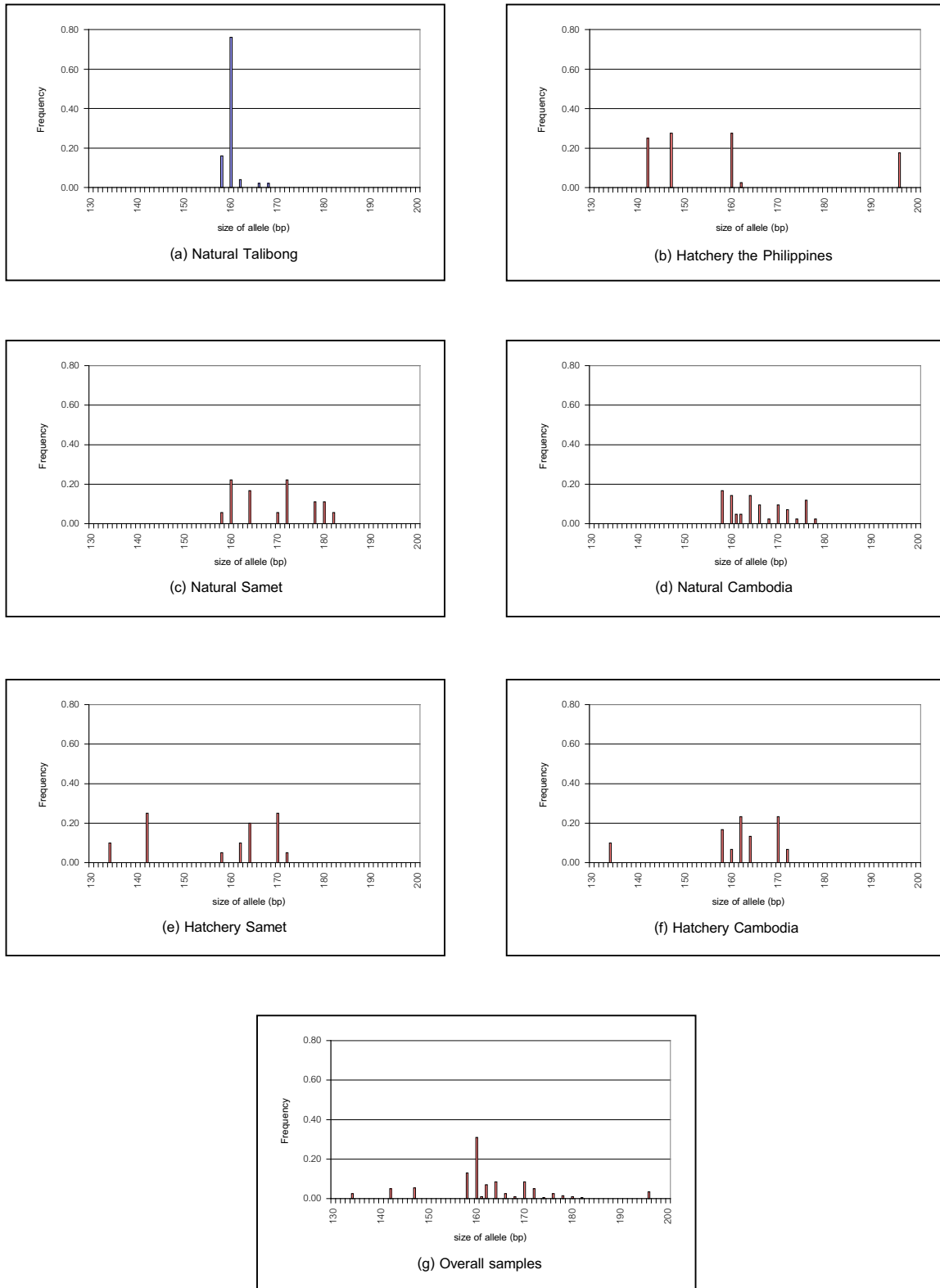
พิจารณาจากระดับความหลากหลายของอัลลีลของแต่ละกลุ่มตัวอย่างในทุกๆ ตำแหน่งแล้วพบว่า *H. asinina* จากกัมพูชา (HACAME) มีจำนวนอัลลีลและ effective number of alleles สูงที่สุด (12.00 และ 9.37) (ตารางที่ 5.8) ตัวอย่างอื่นๆ ยกเว้นจาก HAPHIE (3.67 และ 3.58) มีค่าที่ใกล้เคียงกับ HACAME (7.67 - 8.67 และ 6.04 - 8.74) ค่า expected heterozygosity ในแต่ละตัวอย่างไม่มีความแตกต่างจากค่า observed heterozygosity มากนัก เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างจากฟิลิปปินส์ (HAPHIE) มีจำนวนอัลลีลและ effective number of allele ต่ำ แต่กลับมีค่า observed heterozygosity สูงกว่าตัวอย่าง HACAME ซึ่งมีจำนวนอัลลีลและ effective number of allele สูงที่สุด

ตารางที่ 3.7 ขนาดตัวอย่าง ช่วงขนาดอัลลีล และความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์ (จำนวนอัลลีลต่อโลคัส, number of effective alleles (n_e) และ heterozygosity) ที่ตำแหน่ง Has2, Has3 และ Has8 จากการตรวจสอบจีโนมโทปีของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* จำนวน 6 กลุ่มตัวอย่าง

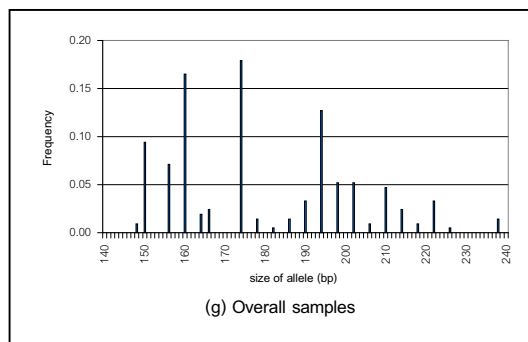
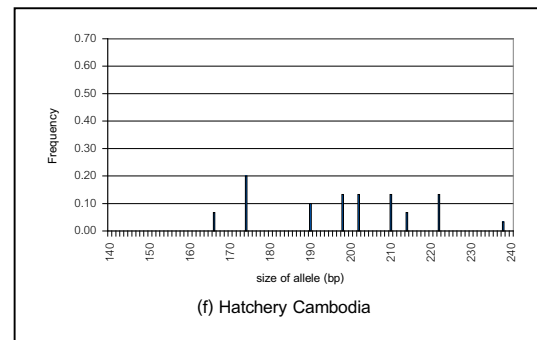
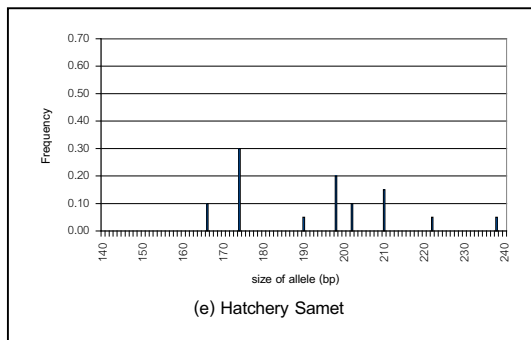
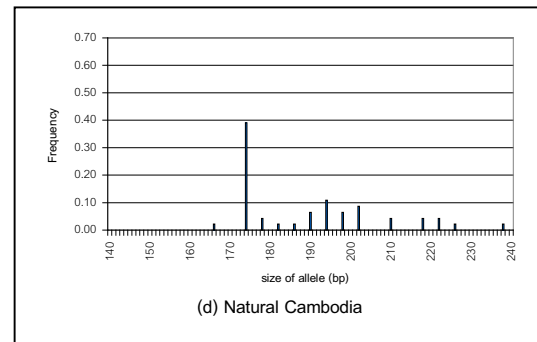
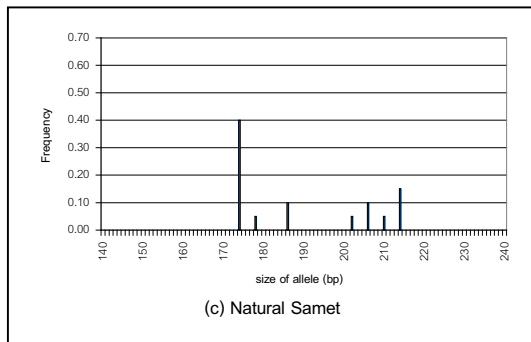
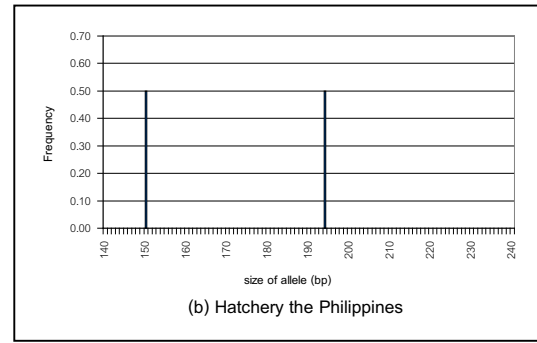
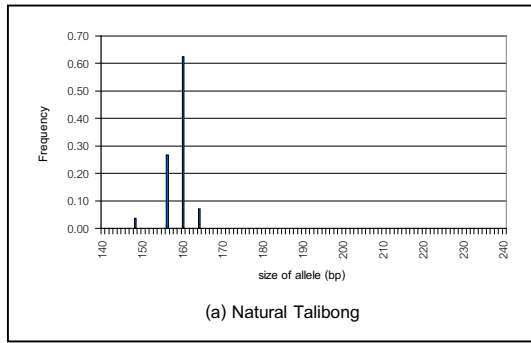
ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	ขนาดอัลลีล (bp)	จำนวน อัลลีล	n_e	Heterozygosity	
					observed	expected
Has2						
HATRAW	23	286-336	17	14.29	0.87	0.93
HASAME	11	314-340	9	8.33	0.64	0.88
HACAME	19	310-340	10	11.11	0.47	0.91
HAPHIE	19	290-336	4	4.35	1.00	0.77
HASAMHE	9	322-340	8	7.69	0.67	0.87
HACAMHE	14	314-340	10	9.09	0.64	0.89
ค่าเฉลี่ย	15.83	286-340	9.67	9.14	0.72	0.88
Has3						
HATRAW	25	158-168	5	1.67	0.32	0.40
HASAME	9	158-182	8	9.09	0.89	0.89
HACAME	21	158-178	12	11.11	0.62	0.91
HAPHIE	20	142-196	5	4.35	1.00	0.77
HASAMHE	10	134-172	7	6.67	1.00	0.85
HACAMHE	15	134-172	7	7.14	0.87	0.86
ค่าเฉลี่ย	16.67	134-196	7.33	6.67	0.78	0.78
Has8						
HATRAW	28	148-164	4	2.17	0.54	0.54
HASAME	10	174-214	8	5.56	0.80	0.82
HACAME	23	166-238	14	5.88	0.78	0.83
HAPHIE	20	150-194	2	2.04	0.00	0.51
HASAMHE	10	166-238	8	7.14	0.80	0.86
HACAMHE	15	166-238	9	10.00	0.87	0.90
ค่าเฉลี่ย	17.67	148-238	7.50	5.47	0.63	0.74



รูปที่ 3.6 การกระจายความถี่ของอัลลีลที่ตำแหน่ง Has2 ของตัวอย่างหอยเป่าฮือ *H. asinina* จาก (a) เกาะตะลิงบง ตรัง (HATRAW, $N = 23$ ตัว), (b) โรงเพาะเลี้ยงฟิลิปปินส์ (HAPHIE, $N = 19$ ตัว), (c) เกาะเสม็ด (HASAME, $N = 11$ ตัว), (d) กัมพูชา (HACAME, $N = 19$ ตัว), (e) โรงเพาะเลี้ยงที่มีพ่อแม่พันธุ์จากเกาะเสม็ด (HASAMHE, $N = 9$ ตัว), (f) โรงเพาะเลี้ยงที่มีพ่อแม่พันธุ์กัมพูชา (HACAMHE, $N = 14$ ตัว) และ (g) ความถี่รวมทั้ง 6 กลุ่มตัวอย่าง ($N = 95$ ตัว)



รูปที่ 3.7 การกระจายความถี่ของอัลลีลที่ตำแหน่ง Has3 ของกลุ่มตัวอย่างหอยเป่าฮี้ *H. asinina* จาก (a) เกาะตะลิบอง (HATRAW, $N = 25$ ตัว), (b) โรงเพาะเลี้ยงฟิลิปปินส์ (HAPHIE, $N = 20$ ตัว), (c) เสม็ด (HASAME, $N = 9$ ตัว), (d) กัมพูชา (HACAME, $N = 21$ ตัว), (e) โรงเพาะเลี้ยงที่มีพ่อแม่พันธุ์จากเกาะเสม็ด (HASAMHE, $N = 10$ ตัว), (f) โรงเพาะเลี้ยงที่มีพ่อแม่พันธุ์จากกัมพูชา (HACAMHE, $N = 14$ ตัว) และ (g) ความถี่รวมทั้ง 6 กลุ่มตัวอย่าง ($N = 100$ ตัว)



รูปที่ 3.8 การกระจายความถี่ของอัลลีลที่ตำแหน่ง Has8 ของกลุ่มตัวอย่างหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* จาก (a) เกาะตะลิงบง (HATRAW, $N = 28$ ตัว), (b) โรงเพาะเลี้ยงฟิลิปปินส์ (HAPHIE, $N = 20$ ตัว), (c) เกาะเสม็ด (HASAME, $N = 10$ ตัว), (d) กัมพูชา (HACAME, $N = 23$ ตัว), (e) โรงเพาะเลี้ยงที่มีพ่อแม่พันธุ์จากเกาะเสม็ด (HASAMHE, $N = 10$ ตัว), (f) โรงเพาะเลี้ยงที่มีพ่อแม่พันธุ์จากกัมพูชา (HACAMHE, $N = 15$ ตัว) และ (g) ความถี่รวมทั้ง 6 กลุ่มตัวอย่าง ($N = 95$ ตัว)

ตารางที่ 3.8 ค่าเฉลี่ยของจำนวนอัลลีลต่อโลคัส effective number of alleles และค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีของแต่ละกลุ่มตัวอย่างจากไมโครแซทเทลไลต์ 3 ตำแหน่ง (Has2, Has3 และ Has8)

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยของจำนวนอัลลีลต่อโลคัส	Effective no. of alleles (n_e)	ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตี	
			ที่พบ ($h_{obs} \pm SD$)	ที่คาดไว้ ($h_{exp} \pm SD$)
HATRAW	8.67 ± 7.234	6.04	0.58 ± 0.277	0.62 ± 0.27
HASAME	8.33 ± 0.577	7.66	0.78 ± 0.127	0.86 ± 0.04
HACAME	12.00 ± 2.000	9.37	0.62 ± 0.155	0.88 ± 0.05
HAPHIE	3.67 ± 1.528	3.58	0.67 ± 0.577	0.68 ± 0.01
HASAMHE	7.67 ± 0.577	7.17	0.82 ± 0.166	0.86 ± 0.02
HACAMHE	8.67 ± 1.528	8.74	0.79 ± 0.133	0.88 ± 0.07

3.2.4.3 สมดุล Hardy-Weinberg

จากการวิเคราะห์สมดุล Hardy-Weinberg ของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดด้วยไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่ง Has2, Has3 และ Has8 พบว่าถ้ายกเว้นที่ตำแหน่ง Has2 และ Has3 ของตัวอย่าง HACAME และที่ตำแหน่ง Has8 ของตัวอย่าง HAPHIE แล้ว ทุกกลุ่มตัวอย่างจะอยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg ($P < 0.0001$) ตัวอย่าง HASAME และ HACAMHE ที่ตำแหน่ง Has2 ซึ่งไม่อยู่ในสมดุลของ Hardy-Weinberg ที่ $P < 0.05$ หลังจากปรับค่าความน่าจะเป็นโดยใช้วิธี sequential Bonferroni แล้วค่าความน่าจะเป็นดังกล่าวจะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.0027$; ตารางที่ 3.9)

ตารางที่ 3.9 ค่าความน่าจะเป็นที่แต่ละกลุ่มตัวอย่างของ *H. asinina* จะอยู่ในสมมติ Hardy-Weinberg ที่ไม่โครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง Has2, Has3 และ Has8

ตัวอย่าง	P-value *		
	Has2	Has3	Has8
HATRAW	0.1497 ^{ns}	0.0960 ^{ns}	0.3759 ^{ns}
HASAME	0.0102 ^{ns}	0.6599 ^{ns}	0.6267 ^{ns}
HACAME	<0.0001*	<0.0001*	0.3726 ^{ns}
HAPHIE	1.0000 ^{ns#}	1.0000 ^{ns#}	<0.0001*
HASAMHE	0.0904 ^{ns}	1.0000 ^{ns#}	0.2456 ^{ns}
HACAMHE	0.0227 ^{ns}	0.6827 ^{ns}	0.4427 ^{ns}

* ระดับนัยสำคัญถูกปรับเป็น $p < 0.0083$ โดยวิธี sequential Bonferroni

ns = ไม่มีนัยสำคัญ

= ทดสอบด้วย heterozygote excess

3.2.4.4 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างหอยเป่าชื่อ *H. asinina*

การวิเคราะห์ geographic heterogeneity จากความถี่อัลลีลของตัวอย่างของ *H. asinina* จากแหล่งต่างๆ แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์นี้ โดยกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากอ่าวไทย (ตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติและที่ได้จากโรงเพาะเลี้ยงจากเกาะเสม็ดและกัมพูชา) ไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ($P > 0.0027$) (ตารางที่ 3.10) แสดงให้เห็นว่า gene pool ของตัวอย่างเหล่านี้ไม่ได้มีการแบ่งแยกออกจากกัน ในทางตรงกันข้าม *H. asinina* จากเกาะตะลิ่ง (HATRAW) และฟิลิปปินส์ (HAPHIE) มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญกับตัวอย่างจากอ่าวไทยและมีความแตกต่างกันเองด้วย ($P < 0.0001$) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงการแบ่งแยกพันธุกรรม (genetic differentiation) ของ *H. asinina*

ค่า F -statistics รวมของแต่ละตำแหน่งในทุกกลุ่มตัวอย่างชี้ให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่าง *H. asinina* ที่ศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$) (ตารางที่ 3.11) การวิเคราะห์ F_{ST} ของกลุ่มตัวอย่างแต่ละคู่แสดงผลเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ geographic heterogeneity ($P < 0.0027$) ยกเว้นระหว่างตะลิ่ง (HATRAW) กับเกาะเสม็ด (HASAME) และเกาะตะลิ่ง (HATRAW) กับกัมพูชา (HACAME) ที่ตำแหน่ง Has2 (ตารางที่ 3.12)

3.2.4.5 ระยะห่างทางพันธุกรรม และแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (*phylogenetic tree*) ของหอยเป่าฮือ *H. asinina*

จากการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมของตัวอย่าง *H. asinina* พบว่าตัวอย่างหอยเป่าฮือภายในอ่าวไทยมีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกันน้อยคือระหว่าง 0.0113 - 0.0871 ขณะที่ระยะห่างทางพันธุกรรมที่มากขึ้นระหว่างตัวอย่างจากอ่าวไทยกับตะลิ่ง (HATRAW) และอ่าวไทยกับฟิลิปปินส์ (HAPHIE) (0.1310 - 0.1556 และ 0.1486 - 0.1716 ตามลำดับ) ระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุดอยู่ระหว่างตัวอย่างจากตะลิ่งและฟิลิปปินส์ (HATRAW - HAPHIE; 0.1717) ส่วนระยะห่างที่น้อยที่สุดอยู่ระหว่างตัวอย่างจากโรงเพาะเลี้ยงเสมีดกับโรงเพาะเลี้ยงกัมพูชา (HASAMHE - HACAMHE; 0.0113) (ตารางที่ 3.13) รูปแบบของ bootstrapped neighbor-joining tree แสดงรูปแบบของความแตกต่างเช่นเดียวกับผลจากการวิเคราะห์ geographic heterogeneity และ F_{ST} ดังนั้นจากตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมดสามารถแบ่ง *H. asinina* ออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่ม A (อ่าวไทย) กลุ่ม B (เกาะตะลิ่งจากทะเลอันดามัน) และ กลุ่ม C (ฟิลิปปินส์) (รูปที่ 3.9)

ตารางที่ 3.10 การวิเคราะห์ geographic heterogeneity ของตัวอย่างหอยเป่าชื่อ *H. asinina* 6 กลุ่มตัวอย่าง โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง Has2, Has3 และ Has8

ตัวอย่าง	P-value*		
	Has2	Has3	Has8
HATRAW – HASAME	0.0009	<0.0001	<0.0001
HATRAW- HACAME	<0.0001	<0.0001	<0.0001
HATRAW – HAPHIE	<0.0001	<0.0001	<0.0001
HATRAW- HASAMHE	<0.0001	<0.0001	<0.0001
HATRAW – HACAME	<0.0001	<0.0001	<0.0001
HAPHIE - HASAME	<0.0001	<0.0001	<0.0001
HAPHIE - HACAME	<0.0001	<0.0001	<0.0001
HAPHIE - HASAMHE	<0.0001	<0.0001	<0.0001
HAPHIE –HACAMHE	<0.0001	<0.0001	<0.0001
HASAME - HACAME	0.2709 ^{ns}	0.1080 ^{ns}	0.2206 ^{ns}
HASAME – HASAMHE	0.0100 ^{ns}	0.0258 ^{ns}	0.0188 ^{ns}
HASAME - HACAMHE	0.0310 ^{ns}	0.0030 ^{ns}	0.0093 ^{ns}
HACAME - HASAMHE	0.0362 ^{ns}	0.2380 ^{ns}	0.5050 ^{ns}
HACAME – HACAMHE	0.0190 ^{ns}	0.0216 ^{ns}	0.1098 ^{ns}
HACAME –HASAMHE	0.9746 ^{ns}	0.9316 ^{ns}	0.9273 ^{ns}

*ระดับนัยสำคัญถูกปรับเป็น $P < 0.0083$ โดยวิธี sequential Bonferroni

ns = ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 3.11 ค่าเฉลี่ย F -statistics จากหอยเป่าชื่อ 6 กลุ่มตัวอย่าง (HATRAW, HASAME, HAPHIE, HACAME, HACAMHE และ HASAMHE) จากการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์ 3 ตำแหน่ง (Has2, Has3 และ Has8)

Locus	F_{ST}	P-value*
Has2	0.0738	< 0.0001
Has3	0.1669	< 0.0001
Has8	0.2535	< 0.0001
Overall	0.1647	-

*ระดับนัยสำคัญถูกปรับเป็น $P < 0.0083$ โดยวิธี sequential Bonferroni

ตารางที่ 3.12 ค่า F -statistics ที่ได้จากการวิเคราะห์หัตถ์ตัวอย่างหอยเป่าชื่อ *H. asinina* 6 กลุ่มตัวอย่าง โดยใช้ไมโครแซทเทไลต์ตำแหน่ง Has2 Has3 และ Has8

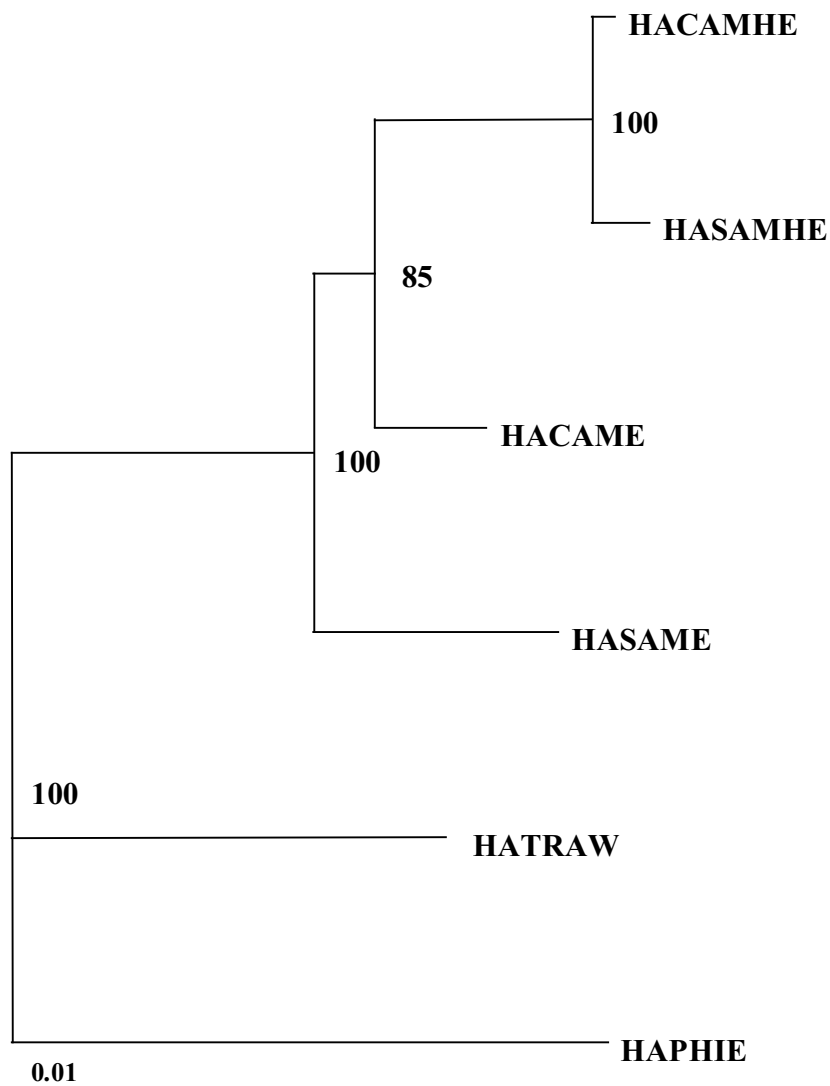
คู่ตัวอย่าง	Has2		Has3		Has8	
	F_{ST}	P-value *	F_{ST}	P-value *	F_{ST}	P-value *
HATRAW – HASAME	0.0471	0.0046 ^{ns}	0.2569	0.0002	0.3453	< 0.0001
HATRAW – HACAME	0.0346	0.0043 ^{ns}	0.2402	< 0.0001	0.3205	< 0.0001
HATRAW – HPHIE	0.1187	< 0.0001	0.2648	< 0.0001	0.4672	< 0.0001
HATRAW – HASAMHE	0.0756	< 0.0001	0.3596	< 0.0001	0.3265	< 0.0001
HATRAW – HACAMHE	0.0618	< 0.0001	0.3336	< 0.0001	0.2983	< 0.0001
HAPHIE – HASAME	0.1752	< 0.0001	0.1260	0.0002	0.3036	0.0005
HAPHIE – HACAME	0.1340	< 0.0001	0.1213	< 0.0001	0.2810	< 0.0001
HAPHIE – HACAMHE	0.1259	< 0.0001	0.1706	< 0.0001	0.2943	< 0.0001
HAPHIE – HASAMHE	0.1491	< 0.0001	0.1844	< 0.0001	0.3204	0.0002
HASAME – HACAME	-0.0145	0.7039 ^{ns}	0.0036	0.3831 ^{ns}	-0.0047	0.4918 ^{ns}
HASAME – HASAMHE	0.0536	0.0422 ^{ns}	0.0552	0.0268 ^{ns}	0.0266	0.1567 ^{ns}
HASAME – HACAMHE	0.0333	0.0955 ^{ns}	0.0593	0.0140 ^{ns}	0.0385	0.0657 ^{ns}
HASAME – HASAMHE	0.0205	0.1883 ^{ns}	0.0031	0.3769 ^{ns}	-0.0010	0.4265 ^{ns}
HASAME – HACAMHE	0.0169	0.1734 ^{ns}	0.0198	0.1074 ^{ns}	0.0200	0.0934 ^{ns}
HACAMHE - HASAMHE	-0.0456	0.9623 ^{ns}	-0.0211	0.8258 ^{ns}	-0.0270	0.9062 ^{ns}

* ระดับนัยสำคัญถูกปรับเป็น $P < 0.0083$ โดยวิธี sequential Bonferroni

ns = ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 3.13 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของแต่ละคู่ตัวอย่างของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลความถี่อัลลีลในตำแหน่ง Has2, Has3 และ Has8 โดยใช้วิธี Cavalli-Sforza และ Edwards chord distance

	HATRAW	HASAME	HAPHIE	HACAME	HACAMHE	HASAMHE
HATRAW	-					
HASAME	0.1393	-				
HAPHIE	0.1486	0.1649	-			
HACAME	0.1310	0.0578	0.1564	-		
HACAMHE	0.1494	0.0767	0.1670	0.0531	-	
HASAMHE	0.1556	0.0871	0.1716	0.0521	0.0113	-



รูปที่ 3.9 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (bootstrapped neighbor-joining tree) ของหอยเป่าสี *H. asinina* 6 กลุ่มตัวอย่างที่สร้างจากระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณโดยใช้วิธี Cavalli-Sforza และ Edwards chord distance ตัวเลขที่รอยต่อของแต่ละกิ่งแสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrapped ของแต่ละคู่ตัวอย่าง

4. การพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อหอยเป่าฮือ *Haliotis asinina* และ *Haliotis varia* จาก 16S rDNA polymorphism

4.1 วิธีดำเนินการทดลอง

4.1.1 ข้อมูลจากพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าฮือ

จากการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าฮือโดยการย่อย 16S rDNA ด้วย *Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III และ *Alu* I จะได้ composite haplotypes ทั้งหมด 10 แบบ ซึ่งใน *H. asinina* จะพบ composite haplotypes จำนวน 2 แบบ ได้แก่ AAAA และ AAEE ใน *H. ovina* จะพบ composite haplotypes จำนวน 3 แบบ ได้แก่ ABBB, AAAB และ AABB ส่วนใน *H. varia* จะพบ composite haplotypes จำนวน 5 แบบ ได้แก่ BABG, BABC, BABD, BABF และ AABG โดยไม่พบ composite haplotype ที่ share กันระหว่างหอยเป่าฮือต่างชนิดกัน ลักษณะการกระจายตัวของ composite haplotypes ใน *H. asinina* ไม่บ่งชี้ลักษณะการเกิด population differentiation ในหอยเป่าฮือชนิดนี้ ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนา species-specific markers ใน *H. asinina*

4.1.2 การโคลนชิ้น 16S rDNA

ทำปฏิกิริยา PCR สำหรับยีน 16S rDNA โดยใช้ดีเอ็นเอจากตัวแทนหอยเป่าฮือที่แสดง composite haplotypes ทั้ง 10 รูปแบบ นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ มาทำ electrophoresis และตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจล จากนั้นทำการชะดีเอ็นเอ และนำมาสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี proteinase K/phenol/chloroform

นำ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาทำเชื่อมกับ pGEM^R-T easy vector และ ถ่ายเข้าเซลล์ *E. coli* XL 1- Blue โดยวิธี electrotransformation และคัดเลือกโคลนที่มี recombinant plasmid มาตรวจสอบหาชิ้น insert โดยการย่อยด้วย *Eco* RI และวิเคราะห์ชิ้น insert ใน 1.0% agarose gel electrophoresis แล้วนำ recombinant plasmid ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ automated DNA sequencer

4.1.3 การประมาณค่า sequence divergence และการสร้าง phylogenetic tree

ทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้ง 10 แบบ จากนั้นคำนวณหา sequence divergence ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ด้วยวิธี Kimura's (1982) two parameter นำค่าที่ได้ มาทำการสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี neighbor-joining ด้วย PHYLIP version 3.56 (Felsenstein, 1993)

4.1.4 การออกแบบไพรเมอร์และการทดสอบความจำเพาะและความไว(sensitivity)ของไพรเมอร์

ทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้ง 10 แบบ และออกแบบ reverse primers ที่แสดงความจำเพาะต่อชนิดของหอยเป่าชื่อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* (ไพรเมอร์ 16S_{RHA}, 16S_{RHO} และ 16S_{RHV} ตามลำดับ) ด้วยโปรแกรม Oligo 4.0 โดยใช้ 16S_{F1} เป็น forward primer ในปฏิกิริยา PCR ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอน คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 60 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 60 วินาที (65 °C สำหรับ 16S_{F1}/16S_{RHV}) extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 60 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ และทำการวิเคราะห์ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ใน 1.5% agarose gel จากนั้นนำคู่ของไพรเมอร์ 16S_{F1}/16S_{RHA}, 16S_{F1}/16S_{RHO} และ 16S_{F1}/16S_{RHV} มาตรวจสอบความจำเพาะต่อหอยเป่าชื่อทั้ง 3 ชนิด

ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา PCR โดยการทำให้ 2 fold serial dilution ของดีเอ็นเอ ต้นแบบระหว่าง 25 ng - 12.25 pg และทำปฏิกิริยา PCR ดังที่แสดงข้างต้น

4.2 ผลการทดลองการพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* และ *H. varia* จาก 16S rDNA polymorphism

ทำการโคลนตัวแทนหอยเป่าฮื้อที่แสดง composite haplotypes ต่างๆของ 16S rDNA ทั้ง 10 รูปแบบ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำ multiple sequence alignment (รูปที่ 4.1) เมื่อนำ sequence divergence ที่ได้มาสร้าง neighbor-joining tree พบว่า phylogenetic tree ที่ได้สามารถแบ่งแยกหอยเป่าฮื้อแต่ละชนิดได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.2)

จากนั้นจึงออกแบบ reverse primers ที่จำเพาะกับชนิดกับหอยเป่าฮื้อชนิดต่างๆ และนำไปศึกษาหอยเป่าฮื้อทั้ง 3 ชนิด ผลการศึกษาเกี่ยวกับขนาดตัวอย่างจำนวนมากขึ้นพบ species-specific PCR product ใน *H. varia* และ *H. asinina* แต่ไม่พบ specific markers ใน *H. ovina* โดยไพรเมอร์ 16SF₁/16S_{RHA} ให้ผลบวกกับ 98.7% ของ *H. asinina* ที่ทำการตรวจสอบทั้งหมด โดยมีผล false positive กับ *H. varia* 1 ตัวอย่าง แต่ความเข้มของผลผลิตจากปฏิกิริยาPCR จะน้อยกว่าผลผลิตจาก *H. asinina* มากกว่าหนึ่งเท่าตัว ดังนั้นไพรเมอร์ 16SF₁/16S_{RHA} สามารถใช้ควบคู่กับไพรเมอร์ 16SF₁/16SR_{RHV} เพื่อความแม่นยำในการตรวจสอบ species origin ของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* (รูปที่ 4.3 และ ตารางที่ 4.1)

ทำการตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ที่ทำการพัฒนาขึ้น พบว่า 16SF₁/16S_{RHA} และ 16SF₁/16S_{RHV} มีความสามารถในการตรวจสอบชนิดของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* และ *H. varia* เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาPCRเพียง 25 pg และ 50 pg ตามลำดับ (รูปที่ 4.4) เครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อชนิดของ *H. asinina* ที่พัฒนาขึ้นสามารถไปใช้ในการตรวจสอบ species origin ของตัวอย่างอย่างรวดเร็ว และสามารถเข้าร่วมกับเครื่องหมาย PCR-RFLP (บทที่ 2) และ SCARs (บทที่ 5) ได้อีกด้วย

16S_{F1}

AABB **CGCCTGTTTAAACAAAAACAT**GGCTCCTTGGTTGTCTGA-GTGGATGAGGAGTCGGACCTG
 AAAB **CGCCTGTTTAAACAAAAACAT**GGCTCCTTGGTTGTCTGA-GTGGATGAGGAGTCGGACCTG
 ABBB **CGCCTGTTTAAACAAAAACAT**GGCTCCTCGGTTGTTTGA-GTGGATGGGAGTCGGACCTG
 BABC **CGCCTGTTTAAACAAAAACAT**GGCTCCTCGGTCAATTAGTGTGGATGGGAGTCGGACCTG
 BABF **CGCCTGTTTAAACAAAAACAT**GGCTCCTCGGTCAATTAGTGTGGATGGGAGTCGGACCTG
 BABD **CGCCTGTTTAAACAAAAACAT**GGCTCCTCGGTTCAATTAGTGTGGATGGGAGTCGGACCTG
 AABC **CGCCTGTTTAAACAAAAACAT**GGCTCCTCGGTCAATTAGTGTGGATGGGAGTCGGACCTG
 BABG **CGCCTGTTTAAACAAAAACAT**GGCTCCTCGGTCAAGTGTGGATGGGAGTCGGACCTG
 AAAA **CGCCTGTTTAAACAAAAACAT**GGCTCCTTG--TGTTTTAGGCGGATAAGGAGTCGGACCTG
 AAAE **CGCCTGTTTAAACAAAAACAT**GGCTCCTTG--TGTTTTAGGCGGATAAGGAGTCGGACCTG

***** * * * * *

AABB CCCGGTGACTTACGGGTTAAACGGCCGCGGTACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAATCA
 AAAB CCCGGTGACTTACGGGTTAAACGGCCGCGGTACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAATCA
 ABBB CCCGGTGACTTACGGGTTAAACGGCCGCGGTACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAATCA
 BABC CCCGGTGACTTACGGGTTAAACGGCCGCGGTACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAATCA
 BABF CCCGGTGACTTACGGGTTAAACGGCCGCGGTACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAATCA
 BABD CCCGGTGACTTACGGGTTAAACGGCCGCGGTACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAATCA
 AABC CCCGGTGACTTACGGGTTAAACGGCCGCGGTACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAATCA
 BABG CCCGGTGACTTACGGGTTAAACGGCCGCGGTACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAATCA
 AAAA CCCGGTGACTTACGGGTTAAACGGCCGCGGTACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAATCA
 AAAE CCCGGTGACTTACGGGTTAAACGGCCGCGGTACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAATCA

AABB CTTGCCTTTTAAATGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTCTG
 AAAB CTTGCCTTTTAAATGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTCTG
 ABBB CTTGCCTTTTAAATGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTCTG
 BABC CTTGCCTTTTAAATGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTCTG
 BABF CTTGCCTTTTAAATGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTCTG
 BABD CTTGCCTTTTAAATGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTCTG
 AABC CTTGCCTTTTAAATGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTCTG
 BABG CTTGCCTTTTAAATGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTCTG
 AAAA CTTGCCTTTTAAATGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTCTG
 AAAE CTTGCCTTTTAAATGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTCTG

***** *

AABB AAATATTTAAAAATTAACCTTCTAGGTGAAAAGGCTTAGATTAGGCTGAGGGACGAGAAGA
 AAAB AAATATTTAAAAATTAACCTTCTAGGTGAAAAGGCTTAGATTAGGCTGAGGGACGAGAAGA
 ABBB AAATATTTAAAAATTAACCTTCTAGGTGAAAAGGCTTAGATTAGGCTGAGGGACGAGAAGA
 BABC AAATATTTAAAAATTAACCTTCTAGGTGAAAAGGCTTAGATTAGGCTGAGGGACGAGAAGA
 BABF AAATATTTAAAAATTAACCTTCTAGGTGAAAAGGCTTAGATTAGGCTGAGGGACGAGAAGA
 BABD AAATATTTAAAAATTAACCTTCTAGGTGAAAAGGCTTAGATTAGGCTGAGGGACGAGAAGA
 AABC AAATATTTAAAAATTAACCTTCTAGGTGAAAAGGCTTAGATTAGGCTGAGGGACGAGAAGA
 BABG AAATATTTAAAAATTAACCTTCTAGGTGAAAAGGCTTAGATTAGGCTGAGGGACGAGAAGA
 AAAA GAATATTTAAAAATTAACCTTCTAGGTGAAAAGGCTTAGATTAGGCTGAGGGACGAGAAGA
 AAAE GAATATTTAAAAATTAACCTTCTAGGTGAAAAGGCTTAGATTAGGCTGAGGGACGAGAAGA

***** * * * * *

AABB CCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAGTGAAGGTTT-TAATTTCTAGTTGTACTAGAGAATTTA
 AAAB CCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAGTGAAGGTTT-TAATTTCTAGTTGTACTAGAGAATTTA
 ABBB CCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAGTGAAGGTTTATAATTTCTAGTTGTACTAGAGAATTTA
 BABC CCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAATGAAGGGGTGTGCTCCTGAAATAAGTTAGAGAGCTCA
 BABF CCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAATGAAGGGGTGTGCTCCTGAAATAAGTTAGAGAGCTCA
 BABD CCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAATGAAGGGGTGTGCTCCTGAAATAAGTTAGAGAGCTCA
 AABC CCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAATGAAGGGGTGTGCTCCTGAAATAAGTTAGAGAGCTCA
 BABG CCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAATGAAGGGGTGTGCTCCTGAAATAAGTTAGAGAGCTCA
 AAAA CCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAATAAAGGTTTATATTTCTAGTTGAATTTAGAGGTTTA
 AAAE CCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAATAAAGGTTTATATTTCTAGTTGAATTTAGAGGTTTA

***** * * * * *

16S_{RHV} 16S_{RHO}

AABB **AATTCATTTTTACATCTTTAGTTGGGG**TGACTGGGGAACATAGGTAGCTTCTCTGTTTTT
 AAAB **AATTCATTTTTACATCTTTAGTTGGGG**TGACTGGGGAACATAGGTAGCTTCTCTGTTTTT
 ABBB **AATTCATTTTTACATCTTTAGTTGGGG**TGACTGGGGAACATAGGTAGCTTCTCTGTTTTT
 BABC **GGTTTGTTC**TTACATCTTTAGTTGGGGTACTGGGGAACATAAGAAGCTTCCCTGTTTAT

BABF **GGTTTGTTT**TTACATCTTTAGTTGGGGTGACTGGGGAACATAAGAAGCTTCCCTGTTTAT
 BABD **GGTTTGTTT**TTACATCTTTAGTTGGGGTGACTGGGGAACATAAGAAGCTTCCCTGTTTAT
 AABC **GGTTTGTTT**TTACATCTTTAGTTGGGGTGACTGGGGAACATAAGAAGCTTCCCTGTTTAT
 BABG **GGTTTGTTT**TTACATCTTTAGTTGGGGTGACTGGGGAACATAAGAAGCTTCCCTGTTTAT
 AAAA AGTTTATTCTTACATCTTTAGTTGGGGTGACTGGGGAACAAAAGTAGCTTCTCTACT**TAT**
 AAAE AGTTTATTCTTACATCTTTAGTTGGGGTGACTGGGGAACAAAAGTAGCTTCTCTACT**TAT**

* * * * *

16S_{RHA}

AABB AGTA-AATTAAATTTGGTCTGCTGACTGATGATCCGGCATTGTCGATTATCGGAAAAAGT
 AAAB AGTA-AATTAAATTTGGTCTGCTGACTGATGATCCGGCATTGTCGATTATCGGAAAAAGT
 ABBB AGTA-GATTGAATTTGGTCTGCCGACTGATGATCCGACATTGTCGATTATCGGAAAAAGT
 BABC AGTTTAATTATTTTCGGTTTTCTGACTAAGGATCCAGCATTGCTGATTGTCGGAAAAAGT
 BABF AGTTTAATTATTTTCGGTTTTCTGACTAAGGATCCAGCATTGCTGATTGTCGGAAAAAGT
 BABD AGTTTAATTATTTTCGGTTTTCTGACTAAGGATCCAGCATTGCTGATTGTCGGAAAAAGT
 AABC AGTTTAATTATTTTCGGTTTTCTGACTAAGGATCCAGCATTGCTGATTGTCGGAAAAAGT
 BABG AGTTTAATAATTTTGGTTTTCTGACTAAGGATCCAGCATTGCTGATTGTCGGAAAAAGT
 AAAA -----**TACTGGGTTGGCTTGC**TAGCTAATGATCCGGCATTGCTGATTATTGGAAAAAGT
 AAAE -----**TACTGGGTTGGCTTGC**TAGCTAATGATCCGGCATTGCTGATTATTGGAAAAAGT

* * * * *

AABB TACCACAGGGATAACAGCGTAATCTTTCTGGAGAGTTCACATTGAAAGAAGGGTTTGCGA
 AAAB TACCACAGGGATAACAGCGTAATCTTTCTGGAGAGTTCACATTGAAAGAAGGGTTTGCGA
 ABBB TACCACAGGGATAACAGCGTAATCTTTCTGGAGAGTTCACATTGAAAGAAGGGTTTGCGA
 BABC TACCACAGGGATAACAGCGTAATCTTTCTGGAGAGTTCACATTGAAAGAAGGGTTTGCGA
 BABF TACCACAGGGATAACAGCGTAATCTTTCTGGAGAGTTCACATTGAAAGAAGGGTTTGCGA
 BABD TACCACAGGGATAACAGCGTAATCTTTCTGGAGAGTTCACATTGAAAGAAGGGTTTGCGA
 AABC TACCACAGGGATAACAGCGTAATCTTTCTGGAGAGTTCACATTGAAAGAAGGGTTTGCGA
 BABG TACCACAGGGATAACAGCGTAATCTTTCTGGAGAGTTCACATTGAAAGAAGGGTTTGCGA
 AAAA TACCACAGGGATAACAGCGTAATCTTTTGGAGAGTTCATATTGAAAAAAGGGTTTGCGA
 AAAE TACCACAGGGATAACAGCGTAATCTTTTGGAGAGTTCATATTGAAAAAAGGGTTTGCGA

* * * * *

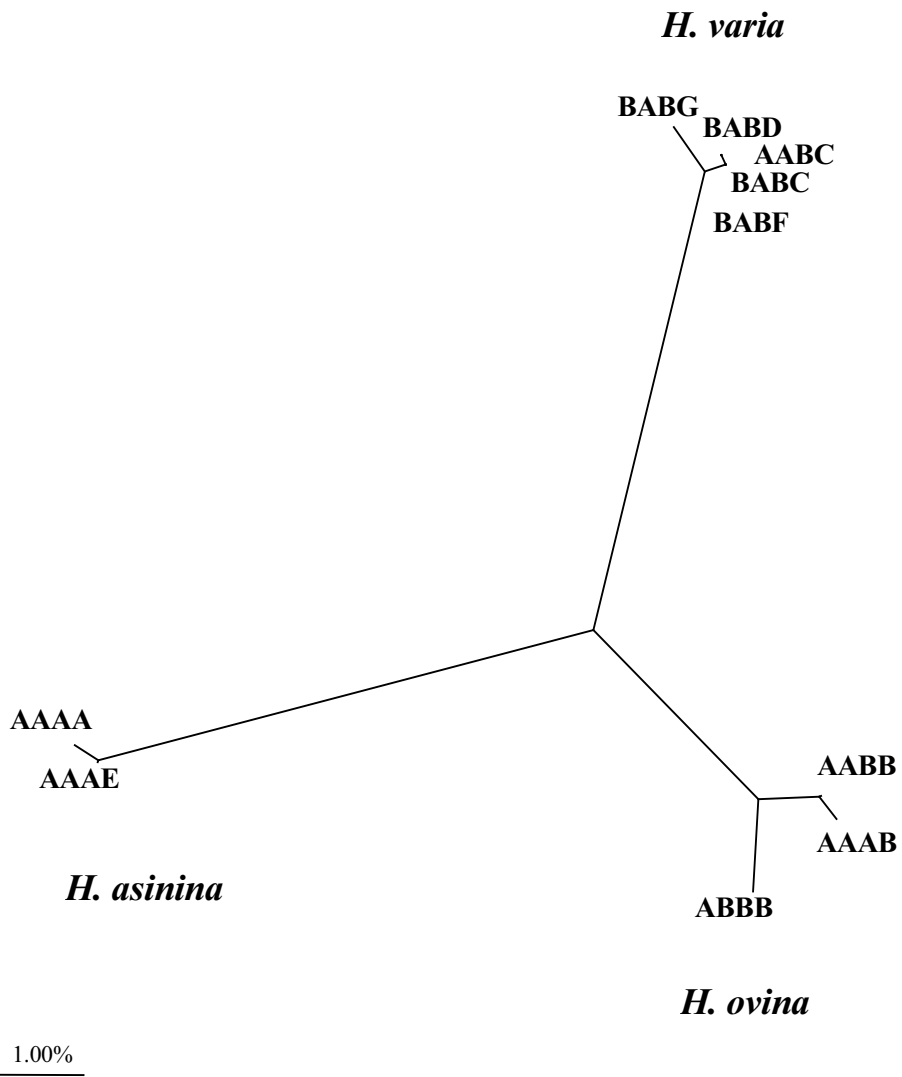
AABB CCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTGAGGGGTAGCAGCTTTCGTTGGTTGGTCTGTTCCG
 AAAB CCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTGAGGGGTAGCAGCTTTCGTTGGTTGGTCTGTTCCG
 ABBB CCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTGGGGGTAGCAGCTTTCGTTGGTTGGTCTGTTCCG
 BABC CCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTGAGGGGTAGCAGCTTTCGTTGGTTGGTCTGTTCCG
 BABF CCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTGAGGGGTAGCAGCTTTCGTTGGTTGGTCTGTTCCG
 BABD CCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTGAGGGGTAGCAGCTTTCGTTGGTTGGTCTGTTCCG
 AABC CCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTGAGGGGTAGCAGCTTTCGTTGGTTG-TCTGTTCCG
 BABG CCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTGAGGGGTAAACAGCTTTCGTTGGTTGGTCTGTTCCG
 AAAA CCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTAAGGGGTAGCAGCTTTCGTTGGTTGGTCTGTTCCG
 AAAE CCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTAAGGGGTAGCAGCTTTCGTTGGTTGGTCTGTTCCG

* * * * *

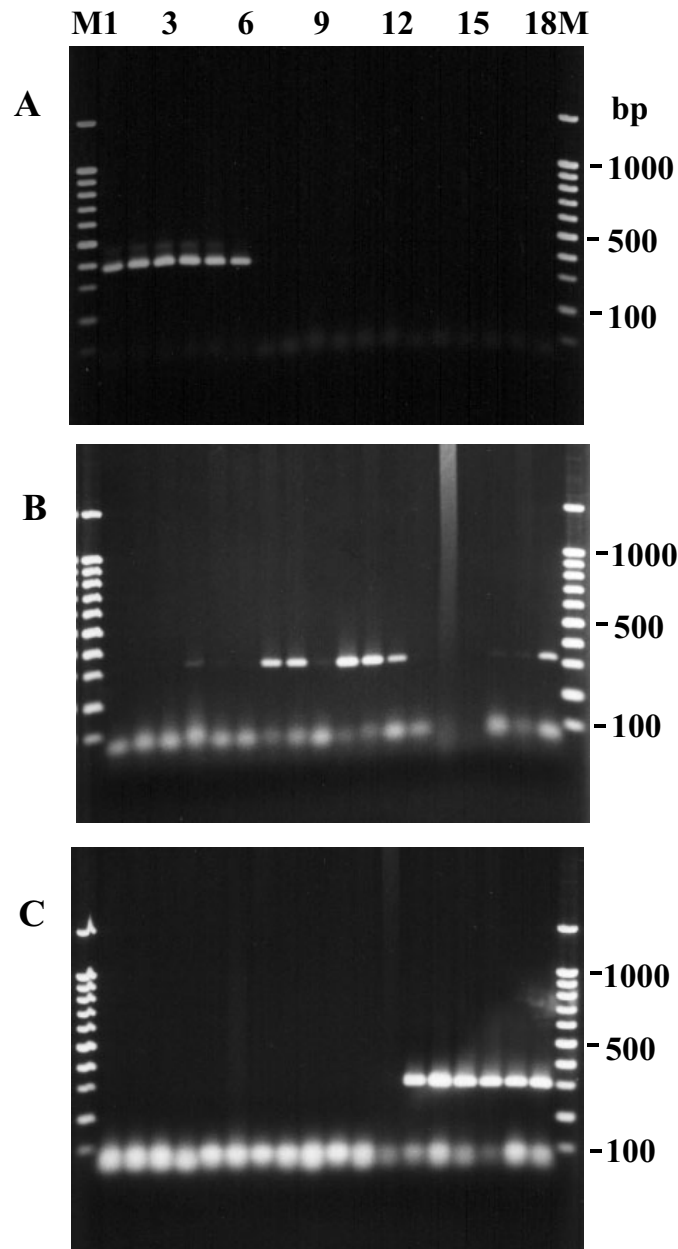
AABB ACCATTA AAAACCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG
 AAAB ACCATTA AAAACCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG
 ABBB ACCATTA AAAACCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG
 BABC ACCATTA AAAACCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG
 BABF ACCATTA AAAACCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG
 BABD ACCATTA AAAACCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG
 AABC ACCATTA AAAACCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG
 BABG ACCATTA AAAACCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG
 AAAA ACCATTA AAATCCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG
 AAAE ACCATTA AAAACCTTACATGATCTGAGTTCAGACCGG

* * * * *

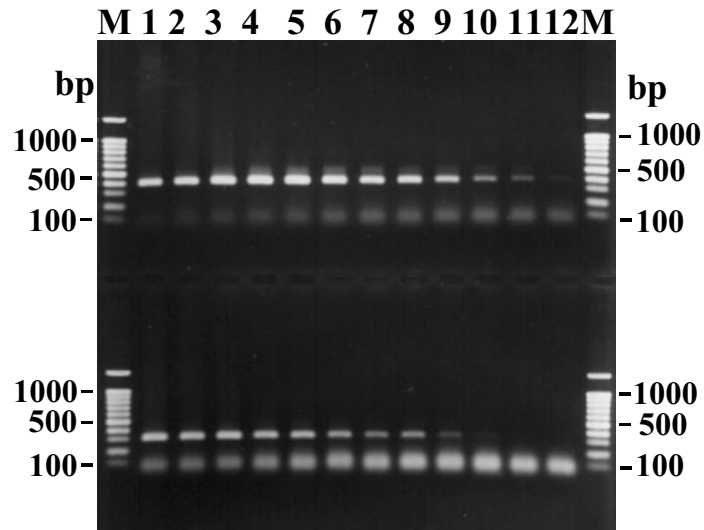
รูปที่ 4.1 Multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวแทนหอยเป่าฮือที่แสดง composite haplotypes ต่างๆจาก PCR-RFLP ของ 16S rDNA ตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการพัฒนา species-specific markers ของหอยเป่าฮือแต่ละชนิดแสดงด้วยตัวอักษรแบบหนา



รูปที่ 4.2 Neighbor-joining tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ที่มี composite haplotypes ที่แตกต่างกันโดยสร้างจากจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA



รูปที่ 4.3 ผลการตรวจสอบ species-specific PCR ของ *H. asinina* (ช่องที่ 1 – 6), *H. ovina* (ช่องที่ 7 – 12) และ *H. varia* (ช่องที่ 13 – 18) จากไพรเมอร์ $16S_{FI} + 16S_{RHA}$ (A) $16S_{FI} + 16S_{RHO}$ (B) และ $16S_{FI} + 16S_{RHV}$ (C). โดยใช้ 100 bp DNA ladder (ช่อง M) เป็นดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน



รูปที่ 4.4 ผลการตรวจสอบความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์ $16S_{F1} + 16S_{RHA}$ (A) and $16S_{F1} + 16S_{RHV}$ (B) จากการเจือจางดีเอ็นเอต้นแบบของ *H. asinina* และ *H. varia* (25 ng, 12.5 ng, 6.25 ng, 3.125 ng, 1.56 ng; 781.25 pg, 390.625 pg, 195.31 pg, 97.65 pg, 48.82 pg, 24.41 pg, และ 12.21 pg, ช่องที่ 1 – 12 ตามลำดับ) โดยใช้ 100 bp DNA ladder (ช่อง M) เป็นดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของหอยเป่าสี่ชนิดต่างๆ

ชนิด	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก: จำนวนที่ทำการศึกษา (%)		
	$16S_{F1}/16SR_a$	$16S_{F1}/16SR_v$	$16S_{F1}/16SR_o$
<i>H. asinina</i>	74:75 (98.7%)	0 : 18 (0.00%)	2 : 20 (10.00%)
<i>H. ovina</i>	0: 21 (0.00%)	0 : 18 (0.00%)	44 : 64 (68.75%)
<i>H. varia</i>	1: 20 (5.00%)	17 : 17 (100.00%)	5 : 20 (25.00%)

5. การพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อหอยเป่าฮื้อ *Haliotis asinina* และ *Haliotis varia* แบบ SCAR markers

5.1 วิธีการทดลอง

5.1.1 การโคลนชิ้น RAPD ที่จำเพาะต่อชนิด และ/หรือกลุ่มตัวอย่างของหอยเป่าฮื้อ

ทำการโคลนเครื่องหมาย RAPD ด้วยวิธี T-A cloning โดยนำผลผลิตที่ได้จาก RAPD-PCR มาทำ electrophoresis แล้วทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและชะดีเอ็นเอออกจากเจล จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มจำนวนใหม่ (reamplified) เชื่อมกับ pGEM^R-T easy vector และถ่ายเข้าเซลล์ *E. coli* XL1- Blue โดยวิธี electrotransformation

5.1.2 การตรวจสอบ inserted fragments ของ recombinant clones ด้วย colony PCR การหาลำดับ นิวคลีโอไทด์และการออกแบบไพรเมอร์

ตรวจสอบหาชิ้น insert โดยการทำ colony PCR ในปริมาตร 10 µl ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2.0 mM MgCl₂, 100 µM ของ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP, 0.1 µM ของไพรเมอร์ pUC1 + pUC2 (5'-TCC GGC TCG TAT GTT GTG TGG A-3' และ 5'-GTG CTG CAA GGC GAT TAA GTT GG-3') หรือ M13F + M13R (5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGAC-3' และ 5'-GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3'), 0.5 unit ของ DyNAzymeTM II DNA Polymerase (Finnzymes) และ cell suspension ของโคลนที่ต้องการตรวจสอบ

ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอโดยมีขั้นตอนคือ predenaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 45 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 60 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ และทำการวิเคราะห์ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ใน 1.2% agarose gel

ทำการสกัดพลาสมิดด้วย Nucleospin plasmid preparation kit (MACHEREY-NAGEL, Germany) นำ recombinant plasmid ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ทิศทางโดยใช้ automated sequencer จากนั้นนำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank และทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ ต่อโคลนที่สนใจด้วยโปรแกรม Oligo 4.0

5.1.3 การพัฒนาเครื่องหมาย *sequence-characterised amplified region (SCAR)* ที่จำเพาะกับ *H. asinina* และ *H. varia*

ทำการออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 20 คู่ นำมาตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอ ของ target species (*H. asinina*, $N = 12$) และ non-target species (*H. ovina* และ *H. varia*, $N = 4$ ในแต่ละชนิด) ทำปฏิกิริยา PCR ใน 25 μ l ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2.0 mM $MgCl_2$, 100 μ M ของ dATP, dCTP, dGTP, และ dTTP, 0.2 μ M ของแต่ละไพรเมอร์, 1.0 unit ของ DyNAzyme™ II DNA Polymerase (Finnzymes) และ 25 ng ของ ดีเอ็นเอต้นแบบ

โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีขั้นตอนคือ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ และทำการตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ใน 1.6% agarose gel

คัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ (CUHA2, CUHA12, CUHA13, CUHO3 และ CUHVI) ที่แสดงผลเบื้องต้นว่าจำเพาะกับชนิดของหอยเป่าสื่อมาทดสอบกับจำนวนตัวอย่างหอยเป่าสื่อที่จำนวนที่มากขึ้น ($N = 216$)

5.1.4 การตรวจสอบความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์และการประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบ species origin ของหอยเป่าสื่อ *H. asinina* ในผลิตภัณฑ์แบบต่างๆ

ตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ CUHA2, CUHA12 และ CUHV1 กับดีเอ็นเอต้นแบบของ *H. asinina* และ *H. varia* ปริมาณต่างๆจาก 10 pg, 20 pg, 30 pg, 60 pg, 100 pg, 250 pg, 500 pg, 1 ng, 2.5 ng, 5 ng, 10 ng และ 25 ng ด้วยปฏิกิริยา PCR ดังแสดงข้างต้น

นอกจากนี้ทดสอบความสามารถในการตรวจสอบ species origin ของไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นกับดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์หอยเป่าสื่อ *H. asinina* แบบต่างๆประกอบด้วย หอยแช่แข็ง(เก็บไว้เป็นเวลา 3 ปีที่ -30° C) ลูกหอยแช่แข็ง (เก็บที่ 4° Cเป็นเวลา 6 เดือน) หอยตากแห้ง (อบที่ 80° C นาน 72 ชั่วโมงและเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์) ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยปรับวิธีการสกัดดีเอ็นเอจาก phenol/chloroform มาเป็น 5% chelex solution

5.2 ผลการทดลองการพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* และ *H. varia* แบบ SCAR markers

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความแตกต่างของประชากรหอยเป่าฮื้อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ด้วยวิธี PCR-RFLP ของ 16S rDNA และ 18S rDNA พบว่าหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* ในประเทศไทยไม่มี genetic heterogeneity ($P < 0.0001$) อย่างไรก็ตามจากผลแสดงให้เห็นว่าหอยเป่าฮื้อทั้งสามชนิด *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกันอย่างชัดเจน ($P < 0.0001$) ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้อย่างมากที่จะสามารถค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อหอยเป่าฮื้อ *H. asinina*

จากการใช้ไพรเมอร์สำหรับ RAPD-PCR ทั้งหมดจำนวน 113 ไพรเมอร์ พบ 27 ไพรเมอร์ประกอบด้วย OPA01, OPA02, OPA10, OPA15, OPA19 และ OPA20 OPB11, OPB16 และ OPB17 UBC101, UBC119, UBC160, UBC168, UBC174, UBC193, UBC195, UBC197, UBC200, UBC210, UBC220, UBC264, UBC267, UBC271, UBC272, UBC456, UBC457 และ UBC459 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าฮื้อทั้งสามชนิด ในขั้นตอนต่อมาได้คัดเลือกไพรเมอร์ 5 ชนิด ประกอบด้วยไพรเมอร์ OPB11, UBC101, UBC195, UBC197 และ UBC271 มาใช้ในการค้นหาเครื่องหมายที่จำเพาะกับชนิดหรือจำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างของหอยเป่าฮื้อในประเทศไทย

ผลจากการค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อ *H. asinina* *H. ovina* *H. varia* พบเครื่องหมายพันธุกรรมจำนวนทั้งหมด 10, 2 และ 3 เครื่องหมายตามลำดับ (ตารางที่ 5.2 และรูปที่ 5.2) และยังพบเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* ที่เกาะตะลิ่ง (HATRAW) และฟิลิปปินส์ (HAPHIE) จำนวนกลุ่มตัวอย่างละ 3 เครื่องหมาย นอกจากนี้พบเครื่องหมาย RAPD ขนาด 1650 bp ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC195 จำเพาะต่อหอยเป่าฮื้อ *H. ovina* ที่มาจากอ่าวไทย แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอใน *H. ovina* จากทะเลอันดามัน

เนื่องจาก RAPD-PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาของพีซีอาร์ เช่น ต้องการดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี ซึ่งอาจจะทำให้เกิด false negative ได้ ดังนั้นจึงได้พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อชนิดและกลุ่มตัวอย่างหอยเป่าฮื้อ ที่ได้จากเทคนิค RAPD ไปเป็นเครื่องหมาย SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region)

จึงโคลนเครื่องหมาย RAPD จำนวนทั้งหมด 22 เครื่องหมาย (ตารางที่ 5.2) และนำโคลนทั้งหมดจำนวน 72 โคลนไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันทั้งหมด 39 โคลน แสดงว่าแถบดีเอ็นเอที่เป็นเครื่องหมาย RAPD มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันมากกว่าหนึ่ง

จีน เครื่องหมาย RAPD เกือบทั้งหมด ประมาณ 85% (33 จาก 39 ลำดับนิวคลีโอไทด์) ไม่มีความเหมือนกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ใด ๆ ที่มีรายงานไว้ใน GenBank เมื่อใช้โปรแกรม BlastN และ BlastX ที่ค่า E values < 10⁻⁴

ได้ออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 20 คู่ (pCUHA1 - pCUHA15, pCUHO1 - pCUHO4 และ pCUHV1; รูปที่ 5.2 และ ตารางที่ 5.3) โดยไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ได้ออกแบบมาจากเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างหอยเป่าชื่อ *H. asinina* พบว่า ไพรเมอร์ 4 คู่ (CUHA3, CUHA7, CUHA8 และ CUHA10) ให้ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (non-specific amplification) และไพรเมอร์ CUHA9 และ CUHA15 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าชื่อทั้ง 3 ชนิดได้ ส่วนไพรเมอร์ CUHA11 ให้ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อหอยเป่าชื่อชนิด *H. asinina* มากกว่าที่จะจำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่าง *H. asinina* ที่จังหวัดตรัง ดังนั้นสรุปได้ว่าไม่พบเครื่องหมาย SCAR ที่จำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างหอยเป่าชื่อ *H. asinina*

ส่วนผลของไพรเมอร์ CUHA5, CUHA6 และ CUHO1 นั้นสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ในหอยเป่าชื่อทั้ง 3 ชนิด นอกจากนั้นจึงได้ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ CUHA5 และ CUHA6 ในตัวอย่างจากหอยฝาเดียว (Gastropod) ประกอบด้วย หอยทากแอฟริกา (*Achatina fulica*) และ หอยโข่ง (*Pomacea canaliculata*, *Pila ampulacea*, *P. angelica*, *P. pesmei* และ *P. polita*) และหอยสองฝา ประกอบด้วย หอยนางรม (*Crassostera belcheri*, *C. iredalei*, *Saccostera cucullata*, *S. forskali*, และ *Striostera mytiloides*) และหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) กุ้งกุลาดำ *Peneaus monodon* และกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* จากผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่ทำการทดลองนอกจากหอยเป่าชื่อ ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อหอยเป่าชื่อได้

ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า ไพรเมอร์ 7 คู่ (CUHA1, CUHA2, CUHA4, CUHA11, CUHA12, CUHA13 และ CUHA14) สามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อ *H. asinina* ในขณะที่ไพรเมอร์ CUHO3 และ CUHV1 สามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อ *H. ovina* และ *H. varia* ได้ตามลำดับ (ตารางที่ 5.4) อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยไม่ได้คัดเลือกไพรเมอร์ CUHA14 มาวิเคราะห์กับจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นเนื่องจากทำให้ขนาดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยขนาด 473 bp จะพบในตัวอย่าง HACAMHE และ HAPHIE และขนาด 515 bp จะพบในตัวอย่างจาก HATRAW และ HAPHIE

ได้คัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ (CUHA2, CUHA12, CUHO3 และ CUHV1, รูปที่ 5.3 และ 5.4) มาทดสอบกับจำนวนตัวอย่างหอยเป่าชื่อที่จำนวน 216 ตัวอย่าง (ตาราง 5.1) จากผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ CUHA2, CUHA12 และ CUHA13 และไพรเมอร์ CUHV1 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เฉพาะ *H. asinina* และ *H. varia* เท่านั้น ตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์ CUHO3 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอใน *H. ovina* ทุกตัวอย่าง

แต่พบแถบดีเอ็นเอจาง ๆ ในหอย *H. asinina* และ *H. varia* ในบางตัวอย่าง เนื่องมาจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะของไพรเมอร์นี้ นอกจากนี้ไม่พบ heterozygotes (เกิดจากความแตกต่างของขนาดผลผลิตพีซีอาร์) ในทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์เหล่านี้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเครื่องหมาย SCAR ที่พัฒนายังคงเป็น dominant segregated markers เหมือนเครื่องหมาย RAPD

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนตัวอย่าง *H. varia* อย่างจำกัด ($N = 29$ จาก HVPHAW และ $N = 3$ จาก HVPHUW) ดังนั้นเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะกับ *H. varia* (229 bp จากไพรเมอร์ CUHV1) ควรจะมีการตรวจสอบกับจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น และครอบคลุมหลายพื้นที่ก่อนที่จะนำเครื่องหมายพันธุกรรมนี้มาใช้ในอนาคต

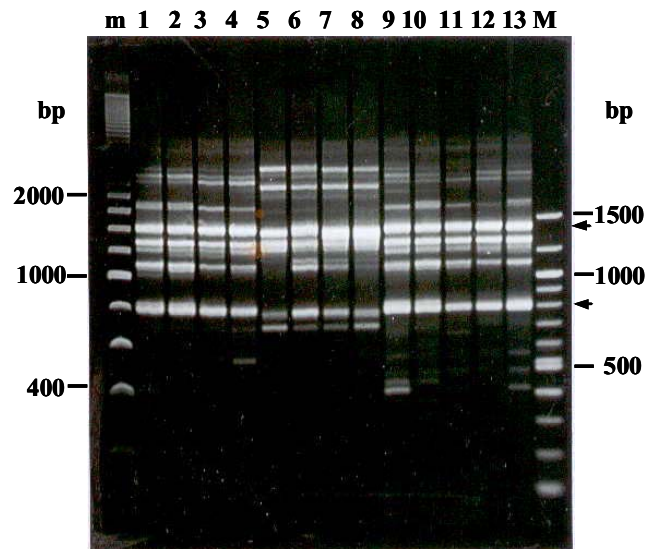
จากการตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ CUHA2, CUHA12, และ CUHV1 กับดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10 pg - 25 pg โดย agarose gel electrophoresis และ การย้อมด้วย ethidium bromide พบว่าทั้ง 3 ไพรเมอร์นี้ให้ผลที่สอดคล้องกันอย่างดีระหว่าง ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้กับความเข้มของผลผลิตของ PCR โดยพบว่าไพรเมอร์ CUHA2 และ CUHA12, สามารถตรวจดีเอ็นเอได้น้อยประมาณ 100 pg ส่วนไพรเมอร์ CUHV1 สามารถตรวจดีเอ็นเอได้น้อยถึง 20 pg ซึ่งระดับของความไวของไพรเมอร์นี้สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความจำเพาะต่อชนิดของหอยเป่าฮือในระยะที่เป็นลูกหอยได้ (รูปที่ 5.5)

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาการตรวจสอบชนิดของหอย *H. asinina* ให้รวดเร็วยิ่งขึ้นโดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบ 5% Chelex-based method แทนการใช้วิธี phenol/chloroform extraction method ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลานาน จากผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ CUHA2 และ CUHA13 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในตัวอย่างหอยเป่าฮือ *H. asinina* แซ่แข็ง ลูกหอยเป่าฮือในแอลกอฮอล์ หอยเป่าฮือตากแห้ง หอยเป่าฮือที่ผ่านการต้ม ได้อย่างคงที่และแม่นยำ ส่วนไพรเมอร์ CUHA12 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ในเกือบทุกตัวอย่างยกเว้นหอยเป่าฮือตากแห้งจำนวน 1 ตัวอย่าง (รูป 5.6 และ 5.7) เมื่อทำการทดลองซ้ำโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดใหม่ พบว่า CUHA12 สามารถตรวจสอบตรวจสอบตัวอย่างได้เช่นเดียวกับ CUHA2 และ CUHA13

ในการทดลองนี้คณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ที่จำเพาะต่อ *H. asinina* และ *H. varia* ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมเหล่านี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเพื่อยืนยันชนิดของผลิตภัณฑ์ของหอยเป่าฮือ และลูกหอยเป่าฮือที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงได้ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังมีเครื่องหมาย RAPD ที่จำเพาะต่อ *H. asinina* ที่ยังไม่ได้พัฒนาอีกหลายเครื่องหมาย ซึ่งสามารถที่จะพัฒนาเครื่องหมาย SCAR เพิ่มได้ ในกรณีที่เครื่องหมาย SCAR ที่มีอยู่ (CUHA2, CUHA12 และ CUHA13) มีปัญหาในการตรวจสอบตัวอย่างกลุ่มใหม่ๆของ หอยเป่าฮือ *H. asinina* ในอนาคต

ตารางที่ 5.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนตัวอย่างของหอยเป่าชื่อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ชนิดของหอยเป่าชื่อและสถานที่เก็บตัวอย่าง	ชื่อกลุ่มตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่เก็บ (จำนวนตัวอย่างที่ตรวจสอบ ความจำเพาะของไพรมอร์)
<i>H. asinina</i>		
โรงเพาะเลี้ยง (พ่อแม่พันธุ์เกาะเสม็ด จ. ระยอง)	HASAMHE	28 (15)
โรงเพาะเลี้ยง (พ่อแม่พันธุ์กัมพูชา)	HACAMHE	15 (12)
เกาะลิบง จ. ตรัง	HATRAW	28 (23)
เกาะเสม็ด จ. ระยอง	HASAME	19 (10)
กัมพูชา	HACAME	23 (20)
ฟิลิปปินส์	HAPHIE	30 (19)
อินโดนีเซีย	HAINDW	20 (12)
รวมตัวอย่าง <i>H. asinina</i>		143 (111)
<i>H. ovina</i>		
เกาะค้างคาว อ. เกาะสีชัง จ. ชลบุรี	HOCHOE	29 (20)
เกาะเสม็ด จ. ระยอง	HOSAME	43 (19)
เกาะเชือก จ. ตรัง	HOTRAW	47 (18)
เกาะลิมิลัน จ. พังงา	HOPHAW	16 (16)
รวมตัวอย่าง <i>H. ovina</i>		135 (73)
<i>H. varia</i>		
เกาะแอล จ. ภูเก็ต	HVPHUW	29 (29)
เกาะลิมิลัน จ. พังงา	HVPHAW	4 (3)
รวมตัวอย่าง <i>H. varia</i>		33 (32)
รวมตัวอย่างทั้งหมด		331 (216)



รูปที่ 5.1 agarose gel electrophoresis แสดงรูปแบบ RAPD ความจำเพาะต่อสปีชีส์ของไพรเมอร์ CUHA2 (A) ที่ทดสอบกับ genomic DNA ของ *H. asinina* (ช่องที่ 1 - 4) *H. ovina* (ช่องที่ 5 - 8) และ *H. varia* (ช่องที่ 9 - 12) ช่อง M แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ลูกศรแสดง candidate species-specific fragments

ตารางที่ 5.2 เครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อสปีชีส์ ต่อกลุ่มตัวอย่าง และต่อบริเวณของหอยเป่าฮือเขต
ร้อนในประเทศไทย (*H. asinina* , *H. ovina* และ *H. varia*) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี RAPD โดยใช้ไพร
เมอร์ OPB11, UBC101, UBC195, UBC197 และ UBC271

Species /population	Primer	RAPD marker (bp)	Name of Clones
<i>H. asinina</i>	OPB11	1400	pCUHA14 และ pCUHA16
		800	pCUHA17 และ pCUHA18
	UBC101	1700	pCUHA19
		1325	pCUHA20
		590	pCUHA13
	UBC195	760	pCUHA4, pCUHA21 และ pCUHA22
	UBC197	1400	pCUHA23
		710	pCUHA1
	UBC271	1000	pCUHA24
		650	pCUHA2, pCUHA3, pCUHA5, pCUHA6, pCUHA12 และ pCUHA25
/HATRAW	UBC195	650	pCUHA10 และ pCUHA11
	UBC271	850	pCUHA7 และ pCUHA8
		450	pCUHA9
/HAPHIE	UBC195	1000	pCUHA26
		680	pCUHA27
	UBC197	415	pCUHA15
<i>H. ovina</i>	OPB11	475	pCUHO1, pCUHO2 และ pCUHO3
	UBC195	950	pCUHO4
/อ่าวไทย	UBC195	1650	pCUHO5
<i>H. varia</i>	OPB11	690	pCUHV4, pCUHV5, pCUHV6 และ pCUHV7
		UBC195	700
		550	pCUHV3

A.

GCCATCAAGA TGTGACATGT TCATGGGCAA CTAAAATGGA TTGAAAAAAC
GTTACAAGTA TTTCACAAAC CTTTCCCTTT ATATATTTAT CCTGAATTAA
ATTGAACTCT GCTGAAAAGT GGCATATCAT TAATCAAAAT ATAGACTGGT
CAAACGTAAT GACTTCTTCA TGACTAAATA TAACTGAAGA TCAATGAACA
AGGTAAATAT TGCTGTAAAC AATAAACAGG CACATGTTTC AAAACAATTC
CACACAAAGG TAACTTTTGC TATTTGGTTA TGTAACAAG CTGCAGAGCC
CTCTTATGAA AGTTCACCTC CCAATGACTT CATTATCAG TAATGTGTGA

CUHA2-F

TCATATCCAG GATGCTTGTT CAGCATTCTG TGGCAGTTCT TGACAACTTG
ATTTTCAGTAC TGAATGAACA AGAAAGACTG ACAATTTTGT TCCATGTTGC
CCCCAAGTTA TTCTTGACAG ATGTAGATTC TGCATTAGTG ACAAAGATTT

CUHA2-R

TTATATATCT CCAAAGGGTC AGCAAAAAG AAGTACAGTA TACCCTGGTG
ATATCTTCCA CTGTTTGTCA GAGGGAACAT ATGGTACTGT ATCCAGACAC
ACGTTATAAC CAGGGTGCAC TGTACATGCC CACATGGAAG CATGAATCAT
GACAGTCAAT ACCATAACTG TATTTAATTT ACAAAAAAAA ATATATATGA
TCTTGATGGC

B.

GCCATCAAGA ATAAGCGTTA TGAAAACACT AACTCAAATC AGCCAAATAA
TCCCCTAGT GATATCCTCT TTGGACTGAA GTTGTGTTGTT TTAAGAGTAA

CUHA12-F

GAGGATTATA AGGCATGCTC AACTGGGTTT GGTGTTTTAA CTAATCCCAC
ACAGCCATCA CCAGCAGAGG GAATGATTTA CACATCTCAT TTTTGTGCT
TAATTATTGT GTTTGTTTTT TATTGAAAA AAAATGAAAT GGGAGTGTGA
ACAGCTTTAC AGTTTATATC GACACTGGTA CCATACAACA TACAATACAA
AATTTAAATG CAGCATGTGT TGTCACATAT GTATATAAAT TTGAATTACA
AACATGGGTA AAGCTTGAAG ACAATCTTAT ATGGAAATAG TGAATTATCT

CUHA12-R

GATCTTGATA ATCTGTCCAT CTTAAGATCT GCCTACCTCT TCGTCACTTC
TTCTTTTAGA TTTGATACTA AACATGATTG AAGAATTAAC CTCGTGGTTT
GTCATATGAC AATCTTGTAT TAGAACTAGG TTAGGTTTAT TTACCTTTGT
AAAGTGCATT ACACACATAC AAACAACTG TATTAATATA GAGCATTTAT
GAGAATGGTA TTGGTAAGAN AATTATTTTT GGTGTCTTGA TGGC

C.

GATCTCAGCG CATAcataat CATATTCATT ACAAAGGATA TAACACCAGA
AATGTCGCGC CATAATTCTT ATGACATACA GAAACCGGGG TAATTTTATC GGCATCGCTG
CTATATAATT TCCCCTCCTG AAACtaATAG AATTTCCTAA

CUHV1-F

TTGGGGtTGT CATGGTAGGT TCTTTGCCTA **ACCCCTTGTT** **TCTCCTTCTT** **GTCGACATGA**
AAAGACCACT TTATCAAATA TTTCATCCTC ACTTCATTCA CAATAATCTC TTGATGAGCC
CAACATTTCGT CTGAAACATC CGCACGAGGC AGCCGGAACC ACCAGGCTGT TGGCAACTTA
TTCAAAGTCT CTTCTCTTCA CCCACAGAGA TTTTTTCACA ATACCAACAA ACAATATCCA

TCAAACCGCC

CUHA1-R

TGCGTCATCG TTTGTAactca AGCCTCAATC GAACTTCGCC AGTGCActat GGACGTGCTT
CGACGGtCGG CTGCAAACCT TTGCAACAAA ACCACCGATT CTAGAAGTTT CGTTCATTGC
ATTCCCCCGA CAActGCTAT TATAAAACAT TTAGTTAGTG TAATTGTAAC TGGTCTATCT
CGAGTCTTCG TCTTCATTAC GGATAATTAG CCCGTCGCTG AGGGGGGcAC TTTCTACGCT
CATCCATCCC GCTGAGATC

D.

GCGCCTGGAG ACAAGGTTAC GTGTAATTAT ATACTGACAC ATATCATTGT GAGATGATAA
GAGTTAACAC TGCATTCTGG ATTATTcAGT GTGTGTGAAC AGTGTCAAAC TTAATGTTAG

CUHA13-F

CGCAGTACAG CACATCACTG ACCTGTGTTG AGACTCTACG GAAAAGTCTA ATATCGTAAT
GCACAACAAT AAAAACCATG GTTACATTTT TATTACCAA AAACTAGAAA AACAACATCT
ACCAGAATGA GTAAGTGTGT GAAGTTTAGT TCTACACCAC TTCTAGCAAT AATCCAGCAA
TATGACGGGA GTGGGGGAGA TAATAGAAAC GCTAGAAATG GGCTTTACAC ATTGCATCAA

CUHA13-R

TGAGATGGTT TGCACTTTGG TCTTGACGT GACGTGCAA TGCTTTATCC ATGCGGCTAC
TCCATCTCCC CTCATCTAAC TGACACAAAC ACAGGAATTG TCAGCTGTCA AAGCTNCAGT
ACAGTGAActC TCTGCAACCA TTGTTGTTTT GTGTTGTCAC AGGACCAGGA GCCCTATGGG
TAAAAAGTT GCCAAGTCCC ACCCACCTTC AGCGC

รูปที่ 5.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CUHA2 (A), CUHA12 (B), และ CUHV1 (C) ตำแหน่งและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงโดยใช้ตัวหนา และขีดเส้นใต้

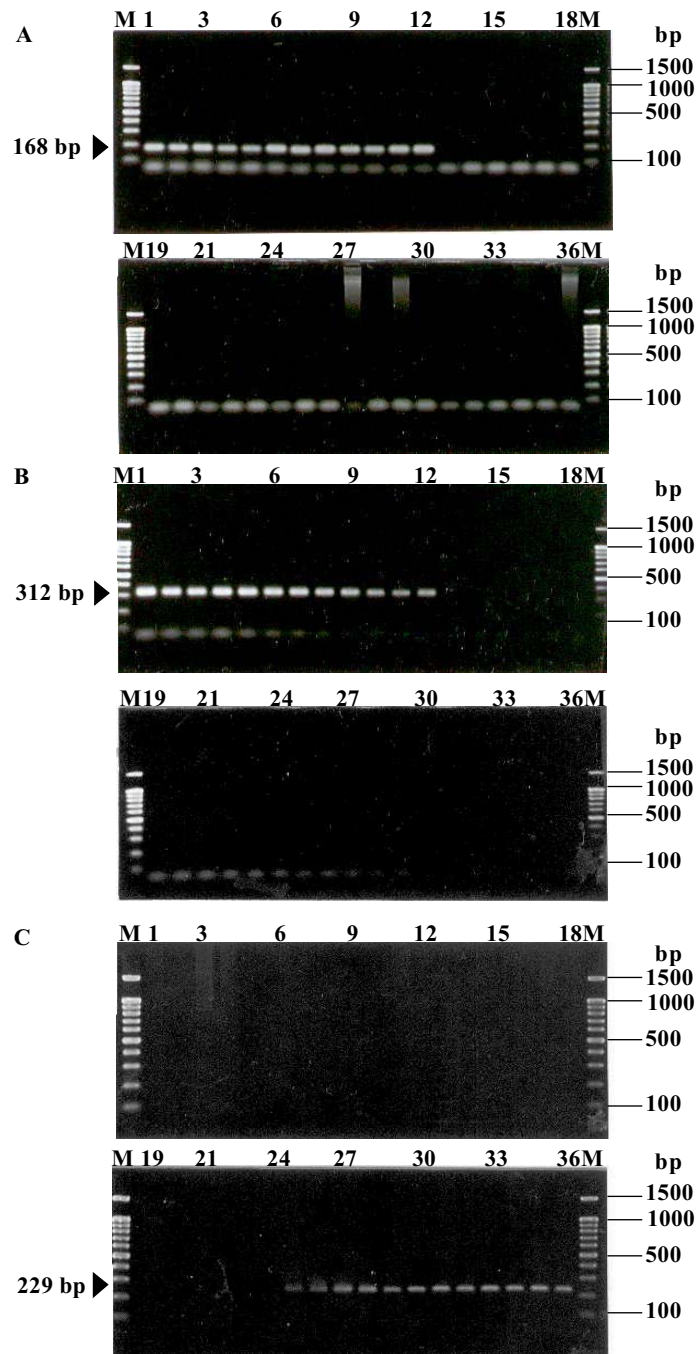
ตารางที่ 5.3 ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากเครื่องหมาย RAPD ที่จำเพาะต่อตัวอย่าง (CUHA11) และจำเพาะต่อชนิดของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* , *H. ovina* และ *H. varia*

Primer	Sequence
CUHA1	F: 5'-GAATCCAACATGCGTCAAAG-3' R: 5'-CTGGAAACAATCGCAGGTCA-3'
CUHA2	F: 5'-TTGTTTCAGCATTCTGTGGCAGTTCT-3' R: 5'-CTTCTTTTTTGCTGACCCTTTGGAG-3'C
CUHA4	F: 5'-TCAGCGAAACCAACCAACAC-3' R: 5'-TTGGACGCAGCTATTCACAT-3'C
CUHA11	F: 5'-CCCCGAGGAGTATACAACTCTTCC-3'C R: 5'-TCGAGTTCTTTTCCACAATGCACC-3'C
CUHA12	F: 5'-CTAATCCCACACAGCCATCACCAG-3' R: 5'- AAGAAGTGACGAAGAGGTAGGCAG-3'
CUHA13	F: 5'-TGACCTGTGTTGAGACTCTACGGA-3'C R: 5'-TGAGGGGAGATGGAGTAGCCGC-3'C
CUHA14	R: 5'-CGTGAAGACAGTTACTGAAAGTGG-3'C R: 5'-ATCGTTTGTGTTATGTCTCCTCTG-3'C
CUHO3	F: 5'-GGGTATCTTCCCACAACAGC-3' R: 5'-GCACTTGCCTACATCCTTTCAC-3'
CUHV1	F: 5'-CCCCTTGTTTCTCCTTCTTG-3' R: 5'-CGATGACGCAGGCGGTTTGA-3'

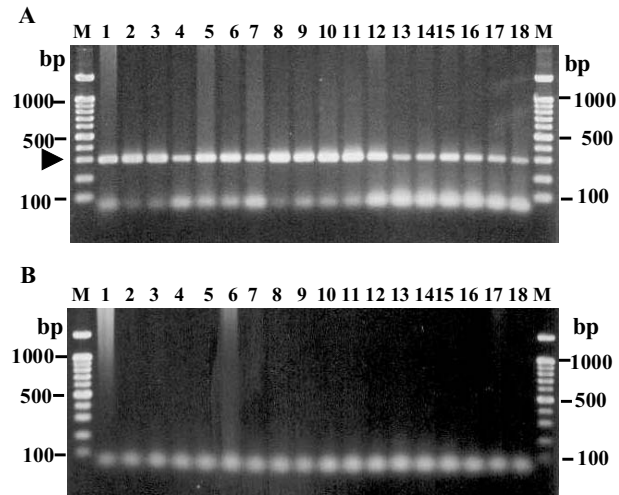
ตารางที่ 5.4 การทดสอบความจำเพาะของ SCAR markers ที่พัฒนาจาก population-specific หรือ species-specific RAPD markers ของ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia*

ไพรเมอร์	ขนาดของ PCR product (bp)	<i>H. asinina</i>				<i>H. ovina</i>	<i>H. varia</i>
		HACAMHE	HACAME	HATRAW	HAPHIE		
CUHA1-F/R	292	+	+	+	+	-	-
CUHA2-F/R*	168	+	+	+	+	-	-
CUHA3-F/R ^a	368	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CUHA4-F/R	290	+	+	+	+	-	-
CUHA5-F/R	264	+	+	+	+	+	+
CUHA6-F/R	103	+	+	+	+	+	+
CUHA7-F/R ^a	554	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CUHA8-F/R ^a	114	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CUHA9-F/R ^a	142	+	+	+	+	+	+
CUHA10-F/R ^a	472	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CUHA11-F/R ^a	417	+	+	+	+	-	-
CUHA12-F/R*	312	+	+	+	+	-	-
CUHA13-F/R	296	+	+	+	+	-	-
CUHA14-F/R	473	+	+	a 515 bp band	a 515 bp band	-	-
CUHA15-F/R ^b	171	+	+	+	+	+	+
CUHO1-F/R	414	+	+	+	+	+	+
CUHO2-F/R	146	+	+	-	-	+ and a 215 bp band	-
CUHO3-F/R*	328	-	-	-	-	+	-
CUHO4-F/R	619	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CUHV1-F/R*	229	-	-	-	-	-	+

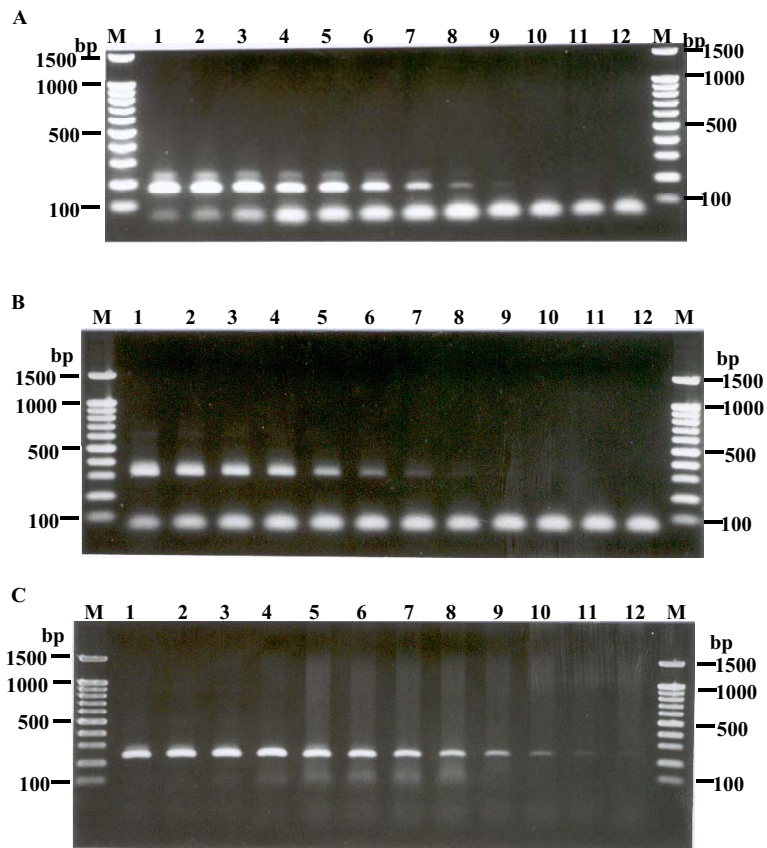
+ = ได้ผลิตภัณฑ์ขนาดตามที่คาดคะเนจากลำดับนิวคลีโอไทด์; - = ไม่ได้ผลิตภัณฑ์; NS = ได้ผลิตภัณฑ์แบบ non-specific; * = ไพรเมอร์ที่นำมาศึกษากับจำนวนตัวอย่างขนาดใหญ่ (N = 216); ^a = ไพรเมอร์ที่พัฒนาจาก HATRAW-specific RAPD markers; ^b = ไพรเมอร์ที่พัฒนาจาก HAPHIE-specific RAPD marker.



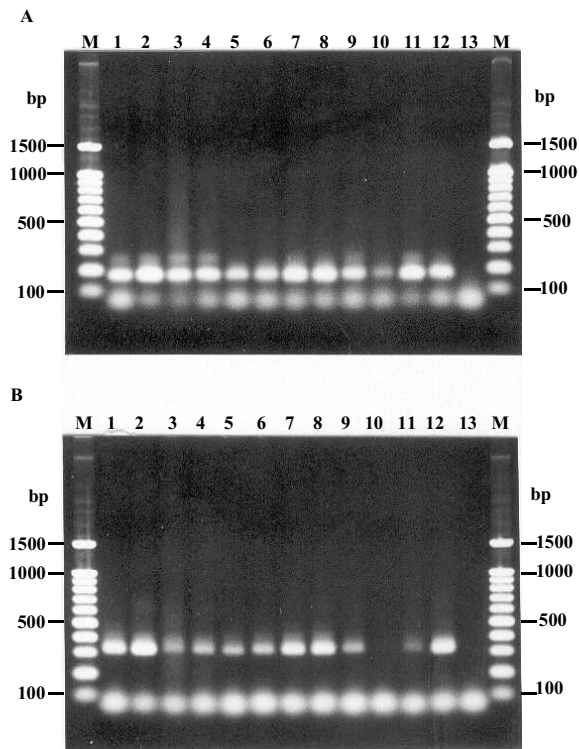
รูปที่ 5.3 agarose gel electrophoresis แสดงความจำเพาะต่อสปีชีส์ของไพรเมอร์ CUHA2 (A) ,CUHA12 (B), และ CUHV1 (C) ที่ทดสอบกับ genomic DNA ของ *H. asinina* (A, B และ C, ช่องที่ 1 - 12) *H. ovina* (A, B และ C, ช่องที่ 13 - 24) และ *H. varia* (A, B และ C, ช่องที่ 25 - 36) ช่อง M แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder



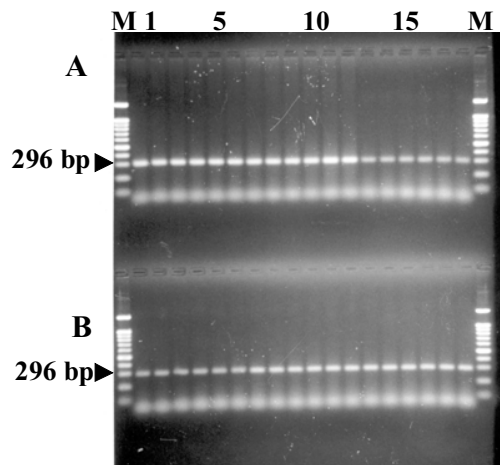
รูปที่ 5.4 Agarose gel electrophoresis ที่แสดงความจำเพาะต่อสปีชีส์ของไพรเมอร์ CUHA13 (A) เมื่อทดสอบกับ genomic DNA ของ *H. asinina* (A, ช่องที่ 1 - 18), *H. ovina* (B, ช่องที่ 1 - 9) และ *H. varia* (B, ช่องที่ 10 - 18) ช่อง M แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder



รูปที่ 5.5 Agarose gel electrophoresis แสดงผลการตรวจสอบความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์ CUHA2 (A) , CUHA12 (B), และ CUHV1 (C) ที่ทดสอบกับ genomic DNA ความเข้มข้นต่างๆของ *H. asinina* และ *H. varia* (25 ng, 10 ng, 5 ng, 2.5 ng, 1 ng; 500 pg, 250 pg, 100 pg, 60 pg, 30 pg, 20 pg, และ 10 pg, ช่องที่ 1 – 12 ตามลำดับ). โดยใช้ 100 bp DNA ladder (ช่อง M) เป็นดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน



รูปที่ 5.6 Agarose gel electrophoresis จากผลของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี Phenol/chloroform (ช่อง 1- 2) และวิธี 5% Chelex extraction (ช่องที่ 3 - 12) ของตัวอย่างแช่แข็ง (ช่องที่ 1 - 4) ลูกหอยที่เก็บในแอลกอฮอล์ (ช่องที่ 5 - 8) ตากแห้ง (ช่องที่ 9 - 10) และ ต้ม (ช่องที่ 11 - 12) ด้วยไพรเมอร์ CUHA2 (A) และ CUHA12 (B) ช่อง 13 แสดง negative control (ไม่ใช่ดีเอ็นเอต้นแบบ) ช่อง M แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder



รูปที่ 5.7 Agarose gel electrophoresis จากผลของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี 5% Chelex extraction ของตัวอย่าง *H. asinina* แซ่แข็ง (ช่องที่ 1 – 12, A), ต้ม (ช่องที่ 12 – 18, A และช่องที่ 1 – 6, B) และ ตากแห้ง (ช่องที่ 7 – 18, B) ด้วยไพรเมอร์ CUHA13 ช่อง M แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

วิจารณ์ผลการทดลอง

การพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮื้อในประเทศไทย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮื้อทั้ง 3 ชนิดในประเทศไทย (*H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia*) ด้วยวิธี PCR-RFLP ของ 18S rDNA และ 16S rDNA และวิธี RAPD-PCR ซึ่งเป็นการทำวิจัยมากกว่าแผนงานที่วางไว้ว่าจะศึกษาเฉพาะ *H. asinina* สำหรับการไม่โครแซทเทลไลต์นั้นไพรเมอร์ที่พัฒนาสำหรับ *H. asinina* ไม่สามารถนำไปใช้กับ *H. ovina* และ *H. varia* จึงไม่ได้เพิ่มงานนอกเหนือจากแผนงานในส่วนนี้

เครื่องหมาย PCR-RFLP ของยีน 16S rDNA และ 18S rDNA สามารถนำมาศึกษาลักษณะพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าฮื้อทั้ง 3 ชนิดได้เป็นอย่างดี โดยในส่วนของ composite haplotypes ของ 16S rDNA นั้นไม่มีรูปแบบที่ซ้ำกันระหว่างชนิดของหอยเป่าฮื้อ (non-overlapping composite haplotypes) ทำให้สามารถใช้เครื่องหมายดังกล่าวเป็น species-specific PCR-RFLP markers ของหอยเป่าฮื้อแต่ละชนิดได้อย่างถูกต้อง อย่างไรก็ตามก็ดี คณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนา species-specific PCR จากความผันแปรของ 16S rDNA สำเร็จ เพื่อลดขั้นตอนที่ต้องทำการตัดชิ้น 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สำหรับวิธี RAPD-PCR ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 128 ไพรเมอร์และสุดท้ายคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* *H. ovina* และ *H. varia* จำนวน 2 ไพรเมอร์ (OPB11 และ UBC101) และไพรเมอร์สำหรับ *H. asinina* ชนิดเดียวจำนวน 5 ไพรเมอร์ (OPB11, UBC101, UBC195, UBC107 และ UBC271) ไพรเมอร์ดังกล่าวให้ขึ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดของหอยเป่าฮื้อ ดังนั้นจึงทำการพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อชนิดแบบ Sequence-characterised amplified region (SCARs) markers จากเครื่องหมาย RAPD

ในส่วนของไมโครแซทเทลไลต์ นำดีเอ็นเอมาสร้างห้องสมุดยีน 3 แบบโดยตัดดีเอ็นเอด้วยวิธีต่างๆ กัน พบว่าห้องสมุดยีนที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอให้ขาดด้วยเอนไซม์ร่วมกัน 3 ชนิด ให้จำนวนโคลนที่ให้ผลบวกมากที่สุด ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่ตัดด้วยหลายเอนไซม์หลายชนิดจะให้ขึ้นดีเอ็นเอที่มีไมโครแซทเทลไลต์ออกมามากที่สุด จากรายงานการศึกษาไมโครแซทเทลไลต์ในปลาของ O'Reilly และ Wright (1995) พบว่าไมโครแซทเทลไลต์ชนิด (GT)_n และ (CT)_n เป็นไมโครแซทเทลไลต์ชนิดที่พบมากที่สุด และ Tiptawonmukul (1996) รายงานว่า (GT)_n เป็นไมโครแซทเทลไลต์ชนิดที่พบมากที่สุดในกลุ่มกุลาค่า *Penaeus monodon* ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ตัวติดตามทั้งสองชนิดนี้ในการตรวจหาไมโครแซทเทลไลต์ผลจากการตรวจหาไมโครแซทเทลไลต์และการทำ dot blot hybridization พบว่าจีโนมของ *H. asinina* มีไมโครแซทเทลไลต์ชนิด (GT)_n มากกว่า (CT)_n และมีปริมาณของไมโครแซทเทลไลต์ทั้งสองชนิดนี้น้อยกว่าในจีโนมของกุลากลาค่า

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการแบ่งแยกประชากรของหอยเป่าฮื้อในประเทศไทย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *H. asinine*, *H. ovina* และ *H. varia* จากความแปรผันของ 16S rDNA และ 18S rDNA

ค่า nucleotide diversity ภายในหอยเป่าฮื้อแต่ละชนิดมีค่าสูงกว่าในหอยตะโกกรม *Crassostrea belcheri* (0.0945%) และ *C. iredalei* (0.0912%) แต่ค่าดังกล่าวยังต่ำกว่าหอยนางรมพันธุ์เล็ก *Saccostrea forskali* (2.8711%), *Striostrea (Parastriostrea) mytiloides* (3.2388%) และกึ่งกุลาค่า *Penaeus monodon* (3.328%) นอกจากนี้การพบค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงในกลุ่มตัวอย่าง *H. asinina* จากโรงเพาะเลี้ยง (HASAMHE, HACAMHE and HAPHIE) คาดว่าน่าจะมาจากการใช้ founders จำนวนมากในการสร้าง stocks ดังกล่าว อย่างไรก็ตามการที่ไม่พบความหลากหลายของ 16S rDNA และ 18S rDNA ในประชากรธรรมชาติที่มาจากเกาะเสม็ด (HASAME) น่าจะมีสาเหตุมาจากการเกิด genetic drift ในกลุ่มตัวอย่างดังกล่าว

จากการศึกษา phylogenetics พบ misclustering ของ composite haplotype BAAAAAB ที่พบใน *H. ovina* จากทะเลอันดามันกับ composite haplotype ของ *H. asinina* ลักษณะดังกล่าวไม่ได้บ่งชี้การเกิด interspecific hybridization แต่น่าจะมีสาเหตุมาจากการใช้จำนวนเอนไซม์ตัดจำเพาะในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮื้อที่น้อยเกินไป แม้ว่าจำนวนเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้สามารถใช้บ่งชี้ชนิดของหอยเป่าฮื้อได้อย่างแม่นยำ ควรมีการเพิ่มจำนวนเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ถูกต้องมากที่สุด

จากการวิเคราะห์ geographic heterogeneity และ F_{ST} จากข้อมูล PCR-RFLP ของ 16S rDNA และ 18S rDNA พบความแตกต่างระหว่าง *H. ovina* ที่มาจากทะเลอันดามันและอ่าวไทยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$) ซึ่งบ่งชี้ว่า *H. ovina* สามารถแบ่งแยกได้เป็น 2 ประชากร (สายพันธุ์) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *H. asinina* ในธรรมชาติ ($P > 0.0021$) แต่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของ HAPHIE ที่เป็น stock ที่มาจากโรงเพาะเลี้ยงกับตัวอย่างกลุ่มอื่นๆ ยกเว้น HACAMHE ($P < 0.0021$) จากข้อมูลของ 16S rDNA บ่งชี้ว่า *H. asinina* มีลักษณะพันธุกรรมแบบ panmictic gene pool (กรุณาเปรียบเทียบกับผลการทดลองจาก RAPD และ ไมโครแซทเทลไลต์ ในบทที่ 2 และ 3 ตามลำดับ) โดยไม่พบ genetic differentiation ใน *H. varia* ($P = 0.7710$) อย่างไรก็ตามจำนวน *H. varia* ที่มาจากพังงา (HVPHAW) มีจำนวนจำกัด ($N = 2$) ดังนั้นผลการทดลองเกี่ยวกับ genetic differentiation ในหอยเป่าฮื้อชนิดนี้ยังคงไม่สามารถสรุปได้

มีรายงานการผสมข้ามชนิด (interspecific hybridisation) ใน *H. rubra* and *H. laevigata* โดยการวิเคราะห์ allozymes อย่างไรก็ตามผลการทดลองจาก PCR-RFLP ของ 16S rDNA ของหอยเป่าฮื้อทั้ง 3 ชนิดไม่ overlap กัน จึงไม่บ่งชี้ bi-directional interspecific hybridisation ระหว่าง *H. asinina*, *H. ovina*

และ *H. varia* อย่างไรก็ตามความเป็นไปได้ในการเกิด unidirectional hybridisation ระหว่าง *H. asinina*, *H. ovina* หรือ *H. varia* เปรียบเทียบหอยเป่าสื่อเพศผู้ต่างชนิดไม่สามารถตรวจสอบด้วยเครื่องหมายจาก mtDNA (เช่น 16S rDNA) สำหรับความผันแปรของ 18S rDNA (nuclear DNA) ที่ศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLP นั้นไม่สามารถใช้ในการแยกชนิดของหอยเป่าสื่อได้ ดังนั้นความเป็นไปได้ในการเกิด unidirectional interspecific hybridization สมควรตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย nuclear DNA ชนิดอื่นๆ

ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษา molecular systematics ของหอยเป่าสื่อจำนวน 27 ชนิด โดยใช้ลำดับ cDNA ของยีน lysin ซึ่งความสัมพันธ์เชิง phylogenetics ของ *H. ovina* and *H. varia* มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกัน อย่างไรก็ตาม *H. asinina* ไม่ได้ใช้ในการทดลองนั้น (Lee และ Vacquier, 1995) จากผลการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าสื่อทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี RAPD-PCR ยืนยันผลการทดลองที่มาจาก PCR-RFLP ว่า *H. asinina* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับ *H. ovina* มากกว่า *H. varia*

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* จากการวิเคราะห์ RAPD-PCR

จากการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าสื่อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ด้วยวิธี RAPD พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงในหอยเป่าสื่อทั้ง 3 ชนิด โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมภายใน *H. ovina* มีค่าสูงกว่า *H. varia* และ *H. asinina* ตามลำดับ ทั้งนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *H. ovina* จากฝั่งทะเลอันดามันมีค่าสูงกว่า *H. ovina* จากอ่าวไทย

เมื่อพิจารณาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากร (genetic diversity and population structure) ของ *H. asinina* พบว่าระดับ polymorphic RAPD bands ของ *H. asinina* มีค่าเท่ากับ 85.20% ซึ่งสูงกว่า ในปูทะเล (*Scylla serrata*, *S. oceanica* และ *S. tranquebarica*; 47.92% - 77.59%) (Klinbunga และคณะ 2000) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*; 24.20% - 47.80%) (Tassanakajon และคณะ 1997) และ ในหอยตระโกรม (*Crassostrea belcheri* และ *C. iredalei*; 53.23% - 77.67%) แต่ค่า polymorphic RAPD bands ดังกล่าวมีค่าต่ำกว่า ในหอยนางรมพันธุ์เล็ก (*Saccostrea cucullata* *S. forskali* และ *Striostrea (Parastriostrea) mytiloides* ในประเทศไทยซึ่งมีค่าเท่ากับ 86.21% - 99.36% (Klinbunga และคณะ 2001).

ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *H. asinina* ที่มาจากโรงเพาะเลี้ยง (P_0 สำหรับ HASAMHE และ HACAMHE และ F_1 for HAPHIE) มีค่าเทียบเคียงกับ *H. asinina* ที่มาจากธรรมชาติ (HACAME, HASAME และ HATRAW) ผลการทดลองยืนยันว่า founders ที่ใช้สร้าง hatchery stocks มีจำนวนมาก โดยผลการวิเคราะห์ geographic heterogeneity แสดง genetic differentiation ระหว่าง *H. asinina* ธรรมชาติที่มาจากทะเลอันดามันและฝั่งอ่าวไทย แต่ไม่พบความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างภายใน

อ่าวไทย (HACAME, HACAMHE, HASAME และ HASAMHE) ($P > 0.0017$) ในภาพรวมพบ genetic differentiation ระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดจากอ่าวไทย (HACAME, HACAMHE, HASAME และ HASAMHE) กับ ตัวอย่างจากทะเลอันดามัน (HATRAW) ($P < 0.0001$) และตัวอย่างโรงเพาะเลี้ยงจากฟิลิปปินส์ (HAPHIE) ($P < 0.0001$) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาไมโครแซทเทลไลต์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *H. asinina* จากไมโครแซทเทลไลต์

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาได้ทั้ง 10 ตำแหน่ง พบว่ามี 4 ตำแหน่งที่มีความหลากหลายในระดับที่ต่ำ (Has4, Has6, Has7 และ Has10) โดยไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่ง Has6 และ Has7 สามารถให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาPCRเฉพาะกับตัวอย่างหอยจากอ่าวไทยแต่ไม่สามารถให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาPCRกับหอยจากตะลิ่ง (HATRAW) และที่ตำแหน่ง Has4 ระดับความไวในการตรวจสอบหอยจากตะลิ่งที่ต่ำกว่าหอยจากอ่าวไทย ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่เกิด mutation ที่บริเวณที่ไพรเมอร์ไปจับในตัวอย่าง HATRAW

ไมโครแซทเทลไลต์ที่เหลือ (Has1, Has2, Has3, Has5, Has8 และ Has9) มีความหลากหลายสูง แต่ที่ตำแหน่ง Has1 ประกอบด้วยไมโครแซทเทลไลต์ 2 บริเวณ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรเนื่องจากขนาดของอัลลีลที่เท่ากันอาจเกิดจากการรวมกันของขนาดอัลลีลที่แตกต่างกันจาก 2 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามก็สามารถใช้ไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่งนี้ในการใช้ตรวจ พ่อ-แม่-ลูก ได้ ส่วนตำแหน่ง Has5 มีจำนวนอัลลีลมากแต่มี heterozygosity ต่ำชี้ให้เห็นว่าอาจจะเกิด null alleles ที่ตำแหน่งนี้ได้ การเกิด null allele เป็นปัญหาสำคัญในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร การวิเคราะห์ segregation และ การวิเคราะห์ พ่อ-แม่-ลูก ในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่ง Has2, Has3 และ Has8 มาใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของ *H. asinina* อย่างไรก็ตามไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 3 ตำแหน่งนี้ก็ควรจะได้ทำการตรวจสอบต่อไปว่ามี null allele หรือไม่ โดยการตรวจสอบตัวอย่างที่เป็นครอบครัว แต่เนื่องจากระบบการเพาะเลี้ยงหอยเป็้อในปัจจุบันเป็นลักษณะ mass spawning คือเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์หลายๆ ตัวอยู่รวมกัน จึงทำให้ไม่มีตัวอย่างครอบครัวสำหรับนำมาทดสอบ อย่างไรก็ตามก็คิดว่าวิธีการเลี้ยงแบบนี้สามารถใช้ไมโครแซทเทลไลต์ประเมินเปอร์เซ็นต์ของการเกิด polyspermy และความน่าจะเป็นของการเกิดการผสมพันธุ์ของ *H. asinina* ที่ต่าง stocks กันได้

เมื่อพิจารณาความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 3 ตำแหน่งในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าทุกๆ ตำแหน่งมีระดับของความหลากหลายสูงทั้งในกลุ่มตัวอย่างหอยเป็้อจากธรรมชาติ (HATRAW, HACAME และ HASAME) และกลุ่มตัวอย่างจากโรงเพาะเลี้ยง (HACAMHE, HASAMHE และ HAPHIE) โดยค่า heterozygosity ต่ำสุดพบในตัวอย่างจากเกาะตะลิ่ง (HATRAW) ขณะที่ heterozygosity สูงสุดพบในตัวอย่างจากโรงเพาะเลี้ยง (P_0) ที่มีพ่อแม่พันธุ์จากกัมพูชา (HACAMHE) การที่พบ heterozygosity สูงในตัวอย่างจากโรงเพาะเลี้ยงทั้งหมดแสดงให้เห็นว่ามีการใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนมากมาใช้ในการเพาะเลี้ยง

จากการพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของจำนวนอัลลีล ค่า effective number of allele และค่าเฉลี่ย heterozygosity พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันในเกือบทุกตัวอย่าง ยกเว้นตัวอย่างจากประเทศฟิลิปปินส์ (หอยเป่าอี้อุ่น F_1) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของจำนวนอัลลีลและ effective number of allele ต่ำที่สุด (3.67 และ 3.58 ตามลำดับ) แต่กลับมีค่า heterozygosity (0.67) สูงกว่าตัวอย่างจากเกาะตะลิงบิง (HATRAW; 0.58) และกัมพูชา (HACAME; 0.62) จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่าง HAPHIE ชุดเดียวกันด้วย PCR-RFLP พบว่ามี haplotype และ nucleotide diversity = 0.8359 และ 0.4910 ตามลำดับ ซึ่งจัดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุดในกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา และผลการศึกษาด้วย RAPD-PCR ยังพบว่า HAPHIE มี genetic distance ภายในกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 0.1865 ซึ่งนับว่ามีค่า genetic distance สูงเป็นอันดับที่ 2 ของตัวอย่าง *H. asinina* ที่ศึกษาทั้งหมด จึงเป็นไปได้ว่าเกิดการคัดเลือกขึ้น (selection) ในตัวอย่าง HAPHI

จากการวิเคราะห์ข้อมูลความถี่ของอัลลีลพบว่าทุกประชากรที่ศึกษาอยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg ที่ทุกตำแหน่งยกเว้นในตัวอย่างจาก HACAME (ที่ตำแหน่ง Has2 และ Has3) และตัวอย่าง HAPHIE (ที่ตำแหน่ง Has8) จีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลต์ทุกตำแหน่งมีความเกี่ยวข้องกันแบบสุ่ม (genotypic equilibrium) และอยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg

Huang และคณะ (2000) ได้ตรวจสอบโครงสร้างทางพันธุกรรมของตัวอย่างหอยเป่าอี้อู *H. rubra* โดยวิธี RAPD-PCR, มินิแซทเทลไลต์จำนวน 2 ตำแหน่ง และไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 3 ตำแหน่ง พบว่าจีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลต์ทุกตำแหน่งไม่อยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg (เนื่องจากรวม Homozygote มากเกินไป) ในทุกตำแหน่งและในทุกกลุ่มตัวอย่างเมื่อใช้ไมโครแซทเทลไลต์ แต่การทดสอบโดยมินิแซทเทลไลต์พบว่าอยู่ในสมดุลทุกๆ ตัวอย่าง

Huang และ Hana (1998) รายงานว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำไมโครแซทเทลไลต์ไปใช้ศึกษาหอยสปีชีส์อื่น แต่การออกนอกสมดุล Hardy-Weinberg ของสปีชีส์เป้าหมาย (*H. rubra*) ซึ่งให้เห็นว่าการวิเคราะห์พันธุกรรมของหอยสปีชีส์อื่นโดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์เหล่านั้นอาจก่อให้เกิดความผิดพลาดได้ ในการศึกษานี้ได้ทดลองทำปฏิกิริยา PCR กับหอยเป่าอี้อู *H. ovina* และ *H. varia* ที่ตำแหน่ง Has2, Has3 และ Has8 ที่พัฒนาจาก *H. asinina* แต่ไม่สามารถให้ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ได้

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *H. asinina* ในแต่ละตัวอย่างพบว่ามี ความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ของ *H. asinina* ที่ไมโครแซทเทลไลต์ทุกๆ ตำแหน่ง ($P < 0.0027$) โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างหอยเป่าอี้อูจากอ่าวไทย ทะเลอันดามัน และฟิลิปปินส์ ($P < 0.0001$) แต่ไม่พบว่ามี ความแตกต่างใน gene pool ของตัวอย่างหอยเป่าอี้อูภายในอ่าวไทย ($P > 0.0027$)

โดยปกติแล้วการกระจายของขนาดอัลลีลของไมโครแซทเทลไลต์ มักจะมีการคาบเกี่ยวกัน (overlapping) ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างเช่นการศึกษาไมโครแซทเทลไลต์ของกิ้งกูดดำ *P. monodon* (Supungul และคณะ 2000) และในผึ้ง *Apis cerana* (Sittipraneed และคณะ 2001) ดังนั้นไมโครแซทเทลไลต์จึงไม่สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับบ่งชี้ geographic origins ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันได้ สำหรับในการศึกษานี้พบว่าการกระจายอัลลีลของไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่ง Has9 ของตัวอย่าง *H. asinina* จากทะเลอันดามัน (HATRAW, 148 - 162 bp) และจากอ่าวไทย (HACAME, 184 - 240 bp) ไม่ overlap กัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าในไมโครแซทเทลไลต์ในตำแหน่งนี้อาจสามารถนำมาใช้แยกแยะ *H. asinina* ที่มาจาก 2 ฝั่งทะเลนี้ได้ อย่างไรก็ตามยังต้องมีการตรวจสอบหอยเป่าชื่อจากทั้ง 2 แหล่งในจำนวนมากกว่านี้ก่อนจึงจะสามารถสรุปผลได้อย่างแน่นอน

ความสามารถในการแบ่งแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างในสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางการค้าเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการจัดการพ่อ-แม่พันธุ์ และโปรแกรมการอนุรักษ์สายพันธุ์ ในการศึกษานี้ได้ศึกษาองค์ประกอบทางพันธุกรรมของ *H. asinina* ในธรรมชาติและที่เพาะเลี้ยง ซึ่งจากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าหอยเป่าชื่อ *H. asinina* จากธรรมชาติควรมีการจัดการแยกออกจากกัน เนื่องจากมีโครงสร้างประชากรทางพันธุกรรม (genetic population structure) ในแง่ของการเพาะเลี้ยงแล้วโปรแกรมการคัดเลือกเพื่อผสมพันธุ์ของ *H. asinina* สามารถทำได้ดียิ่งขึ้นเมื่อมีการใช้ไมโครแซทเทลไลต์ร่วมด้วย เนื่องจากลูกหอยจากพ่อ-แม่หลายๆคู่สามารถเลี้ยงด้วยกันและสามารถติดตามลักษณะ phenotype ที่ต้องการและประมาณค่า heritability ได้

การวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลต์เป็นวิธีที่มีการศึกษากันมากและมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างกันของสิ่งมีชีวิตต่างๆ วิธีนี้เป็นวิธีที่มีประโยชน์หลายด้านในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร โปรแกรมการผสมพันธุ์และการเพาะเลี้ยงเครื่องหมายทางพันธุกรรมมีความสำคัญในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรหลายๆ ด้าน จากการวิเคราะห์ Has2, Has3 และ Has8 ถ้าไม่นับรวมตัวอย่างจากฟิลิปปินส์ (HAPHIE) แล้ว หอยเป่าชื่อธรรมชาติ (*H. asinina*) จากทะเลฝั่งตะวันออกและตะวันตกของไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและมีโครงสร้างประชากรที่ชัดเจน

จากผลการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของ *H. asinina* ด้วย PCR-RFLP ของ 16S rDNA (mtDNA) and 18S rDNA (nuclear DNA) ไม่พบโครงสร้างประชากรจากกลุ่มตัวอย่างจากธรรมชาติ (HACAME, HASAME และ HATRAW) แต่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างโรงเพาะเลี้ยง HAPHIE กับตัวอย่างอื่นๆ ($P < 0.0001$) อย่างไรก็ตามการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *H. asinina* โดยใช้ RAPD-PCR (OPB11, UBC101, UBC195, UBC197 และ UBC271) ให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาโดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างของหอยเป่าฮือ *H. asinina* ธรรมชาติที่พบ โดยการวิเคราะห์ด้วยไมโครแซทเทลไลต์และ RAPD (reproductively isolated gene pools) แต่ไม่พบจากการวิเคราะห์ด้วย mtDNA (16S rDNA, panmictic gene pool) น่าจะเกิดจากการเกิด founder effects มากกว่าที่จะมาจากผลของ biased female gene flow (ซึ่งมาจากการวิเคราะห์ด้วย 16S rDNA) เนื่องจาก planktonic larval stages ที่มีระยะเวลาสั้นและความสามารถในการเคลื่อนที่ต่ำ (migratory ability) ของหอยเป่าฮือ

การพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อชนิดของหอยเป่าฮือ *H. asinina* และ *H. varia*

เครื่องหมายที่จำเพาะต่อ *H. asinina* และ *H. varia* จาก 16S rDNA

จากการศึกษา PCR-RFLP ของ 16S rDNAs พบว่าการบ่งชี้ชนิดของหอยเป่าฮือ *H. asinina*, *H. ovina*, และ *H. varia* ในประเทศไทยสามารถทำได้โดยการตัด 16S rDNA ด้วย *Alu I* หรือใช้ composite haplotypes ของ 16S rDNA ที่ไม่ overlap กันระหว่างชนิดของหอยเป่าฮือ แม้ว่าวิธีนี้จะมีความแม่นยำสูงโดยไม่เกิดข้อผิดพลาดในการบ่งชี้ชนิดของหอยเป่าฮือ แต่ต้องทำการย่อย 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งสามารถลดขั้นตอนดังกล่าวได้

คณะผู้วิจัยจึงทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น 16S rDNA จากตัวแทนหอยเป่าฮือ ที่แสดง composite haplotypes ต่างๆ เมื่อทำ multiple alignment แล้วจึงออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมเมื่อตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ พบว่าสามารถพัฒนา species-specific PCR สำหรับ *H. asinina* และ *H. varia* เป็นผลสำเร็จ โดยมี sensitivity ค่อนข้างสูง (25 pg และ 50 pg ของดีเอ็นเอต้นแบบตามลำดับ)

ก่อนหน้านี้ได้มีการพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อชนิดของหอยเป่าฮือ ชนิดอื่นๆ โดย Muchmore และคณะ (1998) ได้สืบค้น tandemly repeated satellite DNA (ความยาว 290-291 bp) ในหอยเป่าฮือ 5 ชนิด ประกอบด้วย *H. rufescens*, *H. kamtschatkana*, *H. corrugata*, *H. sorenseni*, และ *H. walallensis*) จากนั้นจึงออกแบบ Satellite-specific primers เพื่อตรวจชนิดของหอยเป่าฮือด้วยวิธี direct sequencing ของชิ้น PCR ที่ได้ ซึ่งวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยากและไม่สามารถดำเนินการได้ในเชิงปฏิบัติ

Sweijd และคณะ (1998) ได้พัฒนาเครื่องหมายที่จำเพาะต่อชนิดเพื่อแยก *H. spadicea* ออกจาก *H. midae* ซึ่งเป็นหอยเป่าฮือเศรษฐกิจของแอฟริกาใต้ โดยผู้วิจัยพัฒนาวิธี species-specific PCR และ PCR-RFLP ของยีน lysine โดยเครื่องหมายขนาด 146 bp จาก species-specific PCR สามารถใช้ตรวจสอบชนิดของ *H. midae* ได้ อย่างแม่นยำ

ในการทดลองครั้งนี้สามารถแยกชนิดของ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ออกจากกันได้ อย่างแม่นยำเมื่อใช้วิธี PCR-RFLP ของ 16S rDNA และ species-specific PCR ที่พัฒนาจากความผันแปร ของ 16S rDNA

เครื่องหมายSCARsที่จำเพาะต่อ *H. asinina* และ *H. varia*

แม้ว่าคณะผู้วิจัยสามารถพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อ *H. asinina* และ *H. varia* จาก 16S rDNA ได้สำเร็จ ในมุมมองของการวิจัยคาดคะเนความเป็นไปได้ว่า เครื่องหมายดังกล่าวอาจใช้ ไม่ได้โดยมีประสิทธิภาพหากกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจสอบเกิด interspecific hybridization และ/หรือ backcrossing (ซึ่งปัจจุบันยังไม่พบก็ตาม) เนื่องจาก mtDNA (16S rDNA) นั้นถ่ายทอดเฉพาะทางแม่ (matriarchal transmission) ดังนั้นควรพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อชนิดที่มาจาก nuclear DNA ด้วย

จากการศึกษาRAPD-PCR จำนวน 128 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 27 ไพรเมอร์ สามารถให้ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ในหอยเป่าสีทั้ง 3 ชนิด เมื่อศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ด้วย OPB11 และ UBC101 และ *H. asinina* ด้วย OPA11, UBC101, UBC195, UBC197 และ UBC271 พบ candidate species-specific RAPD markers จำนวน 10, 2 และ 3 ชิ้นใน *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ตามลำดับ และพบเครื่องหมายRAPD ที่น่าจะจำเพาะต่อ HATRAW และ HAPHIE อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบเครื่องหมายขนาด 1650 bp ที่พบเฉพาะในหอย เป่าสี *H. ovina* ที่มาจากอ่าวไทยแต่ไม่พบในตัวอย่างที่จากฝั่งอันดามัน

วิธีRAPD-PCRสามารถให้ข้อผิดพลาดได้ง่ายเมื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะต่อชนิด ของหอยเป่าสีในภายหลัง เนื่องจากมีความ sensitive ต่อสภาวะที่ใช้และมี reproducibility ต่ำ รวมทั้ง ต้องการดีเอ็นเอต้นแบบที่มีคุณภาพดีอีกด้วย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการพัฒนาเครื่องหมายSCARs จาก เครื่องหมายRAPDที่พบในการทดลองนี้ (Weising *et al.*, 1995).

จึงทำการโคลนเครื่องหมายRAPD ทั้งหมด 20 ชิ้น และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ recombinant clones ทั้งหมด 72 โคลนซึ่งพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 33 แบบแสดงว่าชิ้น RAPD ที่มีขนาด เท่ากันประกอบด้วยดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอ ไทด์ที่ได้กับ GenBank ด้วย BlastN และ BlastX พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการโคลนเกือบทั้งหมดเป็น unknown (E values > 10⁻⁴)

จากการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์พบ species-specific SCAR markersจำนวน 3 เครื่องหมายใน *H. asinina* (CUHA2, CUHA12 และ CUHA13) และ 1 เครื่องหมายใน *H. varia* (CUHV1) ซึ่งมีความไวของปฏิกิริยาที่ดี (ประมาณ 20 pg สำหรับ CUHA12 และ CUHV1 และ 100 pg สำหรับCUHA2) เทียบเคียงได้กับ species-specific PCR ที่พัฒนาจาก mtDNA (16S rDNA) เครื่อง

หมายเหตุSCARsที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์รูปแบบต่างๆของ *H. asinina* เพื่อเป็นการทำ quality control ของสินค้าได้

โดยสรุปแล้วคณะผู้วิจัยดำเนินการวิจัยตามแผนงานทุกประการ และศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าฮื้อในประเทศไทยด้วยวิธีชีววิทยาโมเลกุลแบบต่างๆ จนมีความเข้าใจในด้านพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์ในกลุ่มนี้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อชนิดของหอยเป่าฮื้อด้วยวิธีการต่างๆ และสามารถนำไปใช้ตรวจสอบชนิดของหอยเป่าฮื้อในประเทศไทยได้อย่างแม่นยำ

เอกสารอ้างอิง

- Altschmied, J., Hornung, U., Schlupp, I., Gadau, J., Kolb, R., and Scharl, M. (1997). Isolation of DNA suitable for PCR for field and laboratory work. *BioTechniques* 23: 228-229.
- Avise, J.C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman and Hall, London, UK
- Brown, L.D. (1995). Genetic evidence for hybridisation between *Haliotis rubra* and *H. laevigata*. *Mar. Biol.* 123: 89-93.
- Calvalho, G.R., and Hauser, L. (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 4: 326-350.
- Capinpin, E.C., and Corre, K.G. (1996). Growth rate of the Philippine abalone, *Haliotis asinina* fed an artificial diet and macroalgae. *Aquaculture* 144: 81-89.
- Chen, H.C. (1989). Farming the small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. In: 'Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods.' (Ed K. O. Hahn.) pp. 265-83.(CRC Press, Boca Raton, FL, USA.)
- Crow, J.F., and Kimura, M. (1965). Evolution and sexual and asexual populations. *Am. Nature* 99: 439-450.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 612-617.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP : Phylogeny Inference Package (version 3.4) University genetics software for extract tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86 : 248-249.
- Fritsch, P., Hanson, M.A., Spore, C.D., Pack, P.E., and Rieseberg, L.H. (1993). Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 10-20.
- Gordon, H.R. (2000). World abalone supply, markets and pricing: historical, current and future perspectives. 4th International Abalone Symposium, 6 – 11 February 2000, University of Cape Town, Cape Town, South Africa.
- Grunstein, M., and Hogness, D.S. (1975). Colony hybridisation: A method for the isolation of cloned DNAs which contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3961.

- Guo, S.W., and Thompson, E.A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Hadrys, H., Balick, M., and Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1: 55-63.
- Heipel, D.A., Bishop, J.D.D., Brand, A.R., and Thorpe, J.P. (1998). Population genetic differentiation of the great scallop *Pecten maximus* in western Britain investigated by randomly amplified polymorphic DNA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 162: 163-171.
- Holmes, D.S., and Quigley, M. (1981). The rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-197.
- Huang B.X., and Hanna, P.J. (1998). Identification of three polymorphic microsatellite loci in blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach), and detection in other abalone species. *J. Shellfish Res.* 17: 795-799.
- Huang, B.X., Peakall, R., and Hanna, P.J., (2000). Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Mar. Biol.* 136: 207-216.
- Jarayabhand, P., and Paphavasit, N. (1996). A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture* 140: 159-168.
- Jarayabhand, P., Pripue, P., Klinbunga, S., and Tassanakajon, A. (2002). Identification of species-diagnostic markers of abalone in Thailand using PCR-RFLP of 16S rDNA. *Fisheries Sci.* 68 (suppl II): 1091-1094.
- Kirby, V.L., and Powers, D. A. (1998). Identification of microsatellites in the California red abalone, *Haliotis rufescens*. *J. Shellfish Res.* 17: 801-804.
- Klinbunga, S., Ampayup, P., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P., and Yoosukh, W (2000). Development of species-specific markers of the tropical oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand. *Mar. Biotechnol.* 2: 476-484.
- Klinbunga, S., Ampayup, P., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P., and Yoosukh W (2001). Genetic diversity and molecular markers of cupped oysters (Genera *Crassostrea*, *Saccostrea* and *Striostrea*) in Thailand revealed by RAPD analysis. *Mar. Biotechnol.* 3: 133-144.

- Klinbunga, S., Boonyapakdee, A., and Pratoomchat, B. (2000). Genetic diversity and species-diagnostic markers of mud crabs (Genus *Scylla*) in Eastern Thailand determined by RAPD analysis. *Mar. Biotechnol.* 2: 180-187.
- Klinbunga, S., Pripue, P., Khamnamtong, N., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P., and Menasveta, P. (2003). Genetic diversity and molecular markers of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in Thailand. *Mar. Biotechnol.* 5: 505-517.
- Klinbunga, S., Sodsuk, S., Penman, D. J., and McAndrew, B. J. (1996). An improved protocol for total DNA isolation and visualization of mtDNA RFLP(s) in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Thai J. Aquat. Sci.* 3: 36-41.
- Lee, Y.H., and Vacquier, V.D. (1995). Evolution and systematics in Haliotidae (Mollusca: Gastropoda): inferences from DNA sequences of sperm lysin. *Mar. Biol.* 124: 267-278.
- Leighton, D.L., and Lewis, C.A. (1982). Experimental hybridization in abalones. *Int. J. Inver. Rep. Dev.* 5: 273-282
- Lynch, M. (1990). The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.* 7: 478-484.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
- Metz, E.C., Robles-Sikisaka, R., and Vacquier, V.D. (1998). Nonsynonymous substitution in abalone sperm fertilization genes exceeds substitution in introns and mitochondrial DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 10676-10681.
- Miller, K.M., Laberee, K., Kaukinen, K.H., Li, S., and Withler, R.E. (2001). Development of microsatellite loci in pinto abalone (*Haliotis kamtschatkana*). *Mol. Ecol. Notes* 1: 315-317.
- Muchmore, M.E., Moy, G.W., Swanson, W.J., and Vacquier, V.D. (1998). Direct sequencing of genomic DNA for characterization of a satellite DNA in five species of Eastern Pacific abalone. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7: 1-6.
- Naganuma, T., Hisadome, K., Shiraishi, K. and Kojima, H. (1998). Molecular distinction of two resemblant abalones, *Haliotis discus discus* and *Haliotis discus hannai* by 18S rDNA sequences. *J. Mar. Biotechnol.* 6: 59-61.
- Nateewathana, A., and Bussarawit, S. (1988). Abundance and distribution of abalone along the Andaman Sea coast of Thailand. *Kasetsart J. (Natural Science)* 22: 8-15.

- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press: New York, USA.
- Nei, M., and Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- O'Reilly, P., and Wright, J.M. (1995). The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *J. Fish Biol.* 47(supplA): 29-55.
- Raymond, M., and Rousset, F. (1995). GENEPOP (Version 1.2): a population Reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 : 406-425.
- Rice, W.R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sekino, M., and Hara, M. (2001). Microsatellite DNA loci in Pacific abalone *Haliotis discus discus* (Mollusca, Gastropoda, Haliotidae). *Mol. Ecol. Notes* 1: 8-10.
- Selvamani, M.J.P., Degnan, S.M., and Degnan, B.M. (2001). Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: parentage assignment in aquaculture. *Mar. Biotechnol.* 3: 478-485.
- Selvamani, M.J.P., Degnan, S.M., Paetkau, D., and Degnan, B.M. (2000). Highly polymorphic microsatellite loci in the Heron Reef population of the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Mol Ecol* 9: 1184-1186.
- Shephred, S. A., and Brown, L. D. (1993). What is an abalone stock: implication for the role of refugia in conservation. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 50: 2001-2009.
- Singhagraiwan, T., and Doi, M. (1993). Seed production and culture of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linne. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand, 32 pp.
- Supungul, P., Sootanan, P., Klinbunga, S., Kamonrat, W., Jarayabhand, P., and Tassanakajon, A. (2000). Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Mar. Biotechnol.* 2: 339-347.
- Sweijid, N.A., Bowie, R.C.K., Lopata, A.L., Marinaki, A.M., Harley, E.H., and Cook, P.A. (1998). A PCR technique for forensic, species-level identification of abalone tissue. *J. Shellfish Res.* 17: 889-895.

- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., and Boonsaeng, V. (1998). Genetic structure in wild populations of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Mar. Biotechnol.* 6: 249-254.
- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Rimpanitchayakit, V., Jarayabhand, P., and Boosaeng, V. (1997). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6: 110-115.
- Tiptawonnukul, A. (1996). *Characterization of microsatellite DNA in giant tiger prawn Penaeus monoson genome*. (Master's Thesis, Department of Biochemistry, Graduate School, Chulalongkorn University), 122 pp.
- Tookvinas, S., Leknim, V., Donyadol, Y., Predalampabut, Y., and Paengmark, P. (1986). A survey of species and distribution of abalone (*Haliotis* spp.) in Surat Thani, Nakhon Si Thammarat and Songkla. Tech. Rep. No. 1/1986 NICA, 16 pp.
- Vacquier, V.D., Carner, K.R., and Stout, C.D. (1990). Species-specific sequences of abalone lysin, the sperm protein that creates a hole in the egg envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5792-5796.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., and Higuch, R. (1994) Chelex[®] 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic materials, *Biotechniques* 10: 506-513.
- Weir, B. S., and Cockerham, C. C. (1984). Estimation *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Weising, K., Nybom, H., Wolf, K., and Meyer, W. (1995). *DNA Fingerprinting in Plant and Fungi*. CRC Press, Boca Raton, USA
- Welsh, J., and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wright, S. (1978). *Evolution and the Genetics of populations*, vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improve M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19. *Gene* 33, 103-119.

ภาคผนวก 1

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการ และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1. การเก็บตัวอย่างหอยเป่าอื้อ สำหรับการศึกษารหัสพันธุศาสตร์ ประชากร	1. เก็บตัวอย่างหอยเป่าอื้อในประเทศไทย 2. เก็บตัวอย่างหอยเป่าอื้อจากต่างประเทศ	1. เก็บตัวอย่าง <i>H. asinina</i> <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> จากแหล่งต่างๆ 2. เก็บตัวอย่าง <i>H. asinina</i> จากประเทศไทย ลีปวินส์	1. ได้ตัวอย่างหอยเป่าอื้อ <i>H. asinina</i> <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> จากแหล่งต่างๆ สำหรับการศึกษารหัสพันธุศาสตร์ 2. ได้ตัวอย่างหอยเป่าอื้อ <i>H. asinina</i> จากฟิลิปปินส์สำหรับศึกษาเปรียบเทียบกับหอยเป่าอื้อ <i>H. asinina</i> ของประเทศไทย
2. การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าอื้อชนิด <i>H. asinina</i> โดยไมโครแซทเทลไลต์			

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
	<ol style="list-style-type: none"> 1. สร้างห้องสมุดยีนและคัดเลือกไมโครแซทเทลไลต์ที่เหมาะสม 2. หาลำดับไมโครแซทเทลไลต์ที่ได้และออกแบบไพรเมอร์ 3. ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของ <i>H. asinina</i> ในประเทศไทย 	<ol style="list-style-type: none"> 1. สร้างห้องสมุดยีนจำนวน 3 libraries ประกอบด้วย ห้องสมุดจาก <i>Alu I</i> ห้องสมุดจากการ vortex และ sonication ของ genomic DNA และ ห้องสมุดจาก mixed restriction enzymes 2. หาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 68 โคลน ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 14 คู่ โดยมีไพรเมอร์ที่ให้ผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 10 คู่ 3.1 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ <i>H. asinina</i> จำนวน 6 กลุ่มตัวอย่างด้วย ไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 3 ตำแหน่ง (Has2 Has3 และ Has8) 3.2 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ <i>H. asinina</i> จำนวน 4 กลุ่มตัวอย่างด้วย ไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 6 ตำแหน่ง (Has1 Has2 Has3 Has4 Has5 และ Has8) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. ได้ห้องสมุดยีนจำนวน 3 libraries โดยได้โคลนที่ไม่มีโครแซทเทลไลต์จำนวน 0.20%, 1.46% และ 0.43% จากโคลนที่ตรวจสอบจำนวน 2510 โคลน 3487 โคลน และ 4564 โคลน ตามลำดับ 2. ได้ไมโครแซทเทลไลต์สำหรับศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของ <i>H. asinina</i> จำนวน 10 ตำแหน่ง 3. พบโครงสร้างประชากรทางพันธุกรรมของ <i>H. asinina</i> จากฝั่งทะเลอ่าวไทยฝั่งทะเลอันดามัน และ จากฟิลิปปินส์ ซึ่งบ่งบอกว่า <i>H. asinina</i> ในน่านน้ำไทยแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
<p>3. การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของ <i>H. asinina</i> ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี</p>	<p>1. ค้นหาเครื่องหมายที่จำเพาะต่อชนิดและกลุ่มประชากรของ <i>H. asinina</i>.</p>	<p>3.3 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ <i>H. asinina</i> จำนวน 2 กลุ่มตัวอย่าง ด้วยไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 8 ตำแหน่ง (Has1 Has2 Has3 Has4 Has5 Has8 Has9 และ Has10)</p>	<p>1. พบเครื่องหมายRAPDที่แสดงความจำเพาะต่อสายพันธุ์ <i>H. asinina</i> และ <i>H. varia</i> จำนวน 10, 2 และ 3 ขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบเครื่องหมายRAPD ที่แสดงความจำเพาะต่อตัวอย่างของ <i>H. asinina</i> จากจังหวัดศรีสะเกษและฟิลิปปินส์จำนวน 3 และ 2 ขึ้น และเครื่องหมาย RAPD ที่แสดงความจำเพาะของ <i>H. ovina</i> จาก ต่อมุดมตัวอย่างของ <i>H. ovina</i> จาก ฟังทะเลอ่าวไทยอีก 1 ขึ้นตามลำดับ</p>

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
2. ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของ <i>H. asinina</i> , <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> .	2. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ <i>H. asinina</i> , <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> ด้วยโปรแกรม OPAL1 และ UBC101 และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเขี้ยวชื่อ <i>H. asinina</i> เพียงชนิดเดียว ด้วยโปรแกรม OPB11 UBC101 UBC195 UBC197 และ UBC271	2.1 พบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงในหอยเขี้ยวชื่อทั้ง 3 ชนิด 2.2 พบโครงสร้างประชากรทางพันธุกรรมของ <i>H. asinina</i> จากฝั่งทะเลอ่าวไทยฝั่งทะเลอันดามัน และ จากฟิลิปปินส์ ซึ่งบ่งบอกว่า <i>H. asinina</i> ในน่านน้ำไทยแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน 2.3 พบโครงสร้างประชากรทางพันธุกรรมอย่างชัดเจนของ <i>H. asinina</i> จากฝั่งทะเลอ่าวไทย และฝั่งทะเลอันดามัน 2.4 ไม่พบโครงสร้างประชากรทางพันธุกรรมของ <i>H. varia</i>	

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
3. โคลนและวิเคราะห์ลักษณะเครื่องหมายอาร์เอพีดีที่จำเพาะต่อ <i>H. asinina</i>	3. โคลนและวิเคราะห์ลักษณะเครื่องหมายอาร์เอพีดีที่จำเพาะต่อ <i>H. asinina</i>	3. ทำการโคลนเครื่องหมายRAPDที่แสดงความจำเพาะต่อหอยเป่าชื่อ <i>H. asinina</i> , <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> จำนวน 10, 2 และ 3 ขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำการโคลนเครื่องหมาย RAPD ที่แสดงความจำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างของ <i>H. asinina</i> จำนวน 5 ขึ้น และเครื่องหมาย RAPD ที่แสดงความจำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างของ <i>H. ovina</i> จากฝั่งทะเลอ่าวไทยอีก 1 ขึ้น	3. พบโคลนที่มีนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันทั้งหมด 39 โคลน จึงทำการออกแบบ primers จำนวน 20 คู่ เพื่อพัฒนา species-specific SCAR markers
4. ตรวจสอบความจำเพาะของเครื่องหมายอาร์เอพีดีต่อ <i>H. asinina</i> เทียบกับ <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> .	4. ตรวจสอบความจำเพาะของเครื่องหมายอาร์เอพีดีต่อ <i>H. asinina</i> เทียบกับ <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> .	4.1 ตรวจสอบความจำเพาะของเครื่องหมาย SCAR ที่พัฒนาจาก RAPD กับ <i>H. asinina</i> จำนวน 4 กลุ่มตัวอย่าง และ <i>H. varia</i> จำนวน 1 กลุ่มตัวอย่าง ($N = 4$ ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง) จากนั้นนำเครื่องหมาย SCAR ที่แสดงความจำเพาะต่อชนิดของหอยเป่าชื่อมาทำการตรวจสอบในตัวอย่างหอยเป่าชื่อทั้ง 3 ชนิดจากแหล่งต่างๆ จำนวน 216 ตัว	4.1 ได้เครื่องหมาย SCAR ที่แสดงความจำเพาะกับ <i>H. asinina</i> จำนวน 3 เครื่องหมาย ประกอบด้วย CUHA2, CUHA12 และ CUHA13 โดย CUHA2, CUHA12 สามารถตรวจดีเอ็นเอของ <i>H. asinina</i> ได้ตั้งแต่ 100 pg ขึ้นไป โดย CUHA2, CUHA12 สามารถบ่งบอกชนิดของหอยเป่าชื่อ <i>H. asinina</i> ในตัวอย่างที่ผ่านการต้ม การตากแห้ง การเก็บ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
-		<p>1. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ <i>H. asinina</i> <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> ด้วย PCR-RFLP ของ 16S rDNA และ 18S rDNA</p>	<p>1.1 พบความหลากหลายหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำใน <i>H. asinina</i> และ <i>H. ovina</i> เมื่อศึกษาด้วย 16S rDNA อย่างไรก็ตามเมื่อรวมผลจาก 18S rDNA ด้วยจะพบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงในหอยเป่าชื่อทั้ง 2 ชนิด</p> <p>1.2 พบความหลากหลายหลายทางพันธุกรรมที่สูงใน <i>H. varia</i> เมื่อศึกษาด้วย 16S rDNA เมื่อรวมผลจาก 18S rDNA ด้วยจะพบความหลากหลายหลายทางพันธุกรรมที่สูงในหอยเป่าชื่อทั้ง 2 ชนิด</p> <p>1.3 พบโครงสร้างประชากรทางพันธุกรรมของ <i>H. ovina</i> จากฝั่งทะเลอ่าวไทยและอันดามันเมื่อศึกษาด้วย 16S rDNA เพียงอย่างเดียว และเมื่อรวมผลของ 16S rDNA และ 18S rDNA ด้วยกัน</p>

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
-		<p>2. ค้นหาเครื่องหมายที่จำเพาะต่อชนิดและกลุ่มตัวอย่างของ <i>H. asinina</i>, <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i>. จาก รูปแบบการกระจายตัวของ PCR-RFLP จาก 16S rDNA และ 18S rDNA ในตัวอย่างที่ทำการศึกษา</p>	<p>2. ได้เครื่องหมาย PCR-RFLP ของ 16S rDNA (composite haplotypes) สำหรับบ่งบอกชนิดของ <i>H. asinina</i>, <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i>. อย่างแม่นยำ แต่ใช้เวลาก่อนข้างมากเนื่องจากต้องทำ PCR ของ 16S rDNA ก่อนนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และวิเคราะห์ผลด้วย agarose gel electrophoresis จึงทำการพัฒนา species-specific PCR จาก 16S rDNA</p>
-		<p>3. ทำการโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากตัวแทนหอยเป่าชื่อ <i>H. asinina</i>, <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> ซึ่งแสดง genotypes ที่พบทั้งหมด จากการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการพัฒนาเครื่องหมายที่จำเพาะต่อชนิดของหอยเป่าชื่อ <i>H. asinina</i>, <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i></p>	<p>3. ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ใน <i>H. asinina</i>, <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> เพื่อนำไปพัฒนา species-specific PCR ในหอยเป่าชื่อแต่ละชนิด</p>

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
-		<p>4. ตรวจสอบความจำเพาะของเครื่อง หมายทางพันธุกรรมที่ได้กับตัวแทนของ ตัวอย่าง <i>H. asinina</i> <i>H. ovina</i> และ <i>H.</i> <i>varia</i>. จากนั้นทำการขยายตัวอย่างเพื่อขึ้น ชั้นความจำเพาะของเครื่องหมายโมเลกุล ที่ได้</p>	<p>4.1 ได้ species-specific PCR ที่ แสดงความจำเพาะกับ <i>H. asinina</i> และ <i>H. varia</i> จาก 16S rDNA โดย สามารถตรวจดีเอ็นเอของ <i>H.</i> <i>asinina</i> ได้ตั้งแต่ 25 pg ขึ้นไปและ ตรวจดีเอ็นเอของ <i>H. varia</i> ได้ตั้งแต่ 50 pg ขึ้นไป</p> <p>4.2 ไม่พบเครื่องหมาย SCAR ที่ แสดงความจำเพาะต่อ <i>H. ovina</i></p>

ภาคผนวก 2

การใช้เครื่องมือทางพันธุกรรมที่สืบค้นและพัฒนาในกิจกรรมต่างๆ	ประสิทธิภาพในการใช้ประโยชน์ของเครื่องมือทางพันธุกรรมที่สืบค้นและพัฒนา	ประโยชน์และประสิทธิภาพของเครื่องมือทางพันธุกรรมที่สืบค้นและพัฒนา	ความเหมาะสมของเครื่องมือใช้เครื่องมือทางพันธุกรรมในแต่ละกิจกรรม	วิธีการใช้เครื่องมือทางพันธุกรรมที่ได้ประโยชน์สูงสุด
1. การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป่าอื้อในธรรมชาติ	1.1 PCR-RFLP ของ rDNA	-พบว่า <i>H. asinina</i> และ <i>H. varia</i> มี gene pool แบบ panmictic ในขณะที่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง <i>H. ovina</i> จากฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งทะเลอ่าวไทย	-	-สำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ของหอยเป่าอื้อทั้ง 3 ชนิดนั้น RAPD จะมีความเหมาะสมที่สุด
1.2 PCR-RFLP ของ rDNA	-พบว่า <i>H. varia</i> มี gene pool แบบ panmictic ในขณะที่ <i>H. asinina</i> มีความแตกต่างระหว่างประชากรในทะเลไทย กับตัวอย่างจากฟิลิปปินส์ และ <i>H. ovina</i> มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างจากฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งอ่าวไทย	+	-เมื่อต้องการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของ <i>H. asinina</i> เพียงชนิดเดียวควรใช้ microsatellites ร่วมกับ RAPD เนื่องจาก microsatellites ใน <i>H. asinina</i> ที่พัฒนาเป็น compound microsatellites	
1.3 RAPD	-พบว่า <i>H. varia</i> มี gene pool แบบ panmictic ในขณะที่ <i>H. asinina</i> มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากฝั่งทะเลอันดามัน ฝั่งทะเลอ่าวไทย และ ตัวอย่างจากฟิลิปปินส์ นอกจากนี้พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง <i>H. ovina</i> จากฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งทะเลอ่าวไทย	+++		

การใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สืบค้นและพัฒนาในกิจกรรมต่างๆ	ประโยชน์และประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สืบค้นและพัฒนา	ความเหมาะสมของการเลือกใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในแต่ละสถานการณ์	วิธีการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมให้ได้ประโยชน์สูงสุด
1.4 Microsatellites	-บ่งชี้ว่า <i>H. asinina</i> มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากฝั่งทะเลอันดามัน ฝั่งทะเลอ่าวไทย และ ตัวอย่างจากฟิลิปปินส์	++	
2. การบำรุงพันธุ์ประชากรของหอยเป่าฮือในธรรมชาติ			
2.1 PCR-RFLP ของ 16S rDNA	-บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ และบ่งชี้ว่า gene pool ของ <i>H. asinina</i> ฝั่งฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งอ่าวไทยเป็น panmictic (โดยพันธุกรรมของ <i>H. asinina</i> จากฟิลิปปินส์ไม่มีความแตกต่างกับ <i>H. asinina</i> ของประเทศไทย) ทำให้การบำรุงพันธุ์สามารถใช้ founders จากแหล่งใดแหล่งหนึ่งในการศึกษาเกี่ยวกับ <i>H. asinina</i> จากฟิลิปปินส์	-	-การบำรุงพันธุ์ (stock enhancement) ใน <i>H. asinina</i> ควรใช้ microsatellites และ RAPD ในการตรวจสอบ genetic diversity และใช้ RAPD ซึ่งให้เครื่องหมายที่จำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างที่จำเพาะกับหอยเป่าฮือ <i>H. asinina</i> จากฝั่งทะเลอันดามัน (HATRAW) ขนาด 650 คู่

การใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ สืบค้นและพัฒนาในกิจกรรมต่างๆ	ประโยชน์และประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สืบ ค้นและพัฒนา	ความเหมาะสมของ การเลือกใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในแต่ละ สถานการณ์	วิธีการใช้เครื่องหมายพันธุ กรรมให้ได้ประโยชน์สูงสุด ในกิจกรรมต่างๆ
2.2 PCR-RFLP ของ 18S rDNA	<p>-บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงใน <i>H. varia</i> แต่บ่งชี้ ว่า gene pool ของ <i>H. varia</i> ในฝั่งทะเลอันดามันเป็น panmictic ทำให้ การบำรุงพันธุ์สามารถใช้ founders จากแหล่งใดแหล่งหนึ่งในการ ศึกษา</p> <p>-บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงกว่าการวิเคราะห์ ด้วย PCR-RFLP ของ 16S rDNA และบ่งชี้ว่า gene pool ของ <i>H.</i> <i>asimina</i> ฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งอ่าวไทยเป็น panmictic (โดย พันธุกรรมของ <i>H. asimina</i> จากฟิลิปปินส์มีความแตกต่างกับ <i>H.</i> <i>asimina</i> ของประเทศไทย) ทำให้การบำรุงพันธุ์ <i>H. asimina</i> ใน สามารถใช้ founders จากแหล่งใดแหล่งหนึ่งในการศึกษานี้ยก เว้นหอยเป้าออกจากฟิลิปปินส์</p> <p>-บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงกว่าการวิเคราะห์ ด้วย PCR-RFLP ของ 16S rDNA และบ่งชี้ว่า <i>H. ovina</i> จากชลบุรี (HOCHOE) และตรัง (HOTRAW) มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ทำให้การบำรุงพันธุ์ควรใช้ founders จาก local populations ที่ ต้องการบำรุงพันธุ์</p>	+	<p>เบส ด้วยไพรเมอร์ UBC195 ขนาด 450 และ 850 คู่เบส ด้วยไพรเมอร์ UBC271 ในการตรวจสอบ การปนเปื้อนทางพันธุ กรรมระหว่างสายพันธุ์ที่ แตกต่างกัน ของ <i>H.</i> <i>asimina</i> -สำหรับการบำรุงพันธุ์ของ <i>H. ovina</i> นั้น การใช้ RAPD ร่วมกับ PCR-RFLP ของ 16S rDNA จะทำให้การ ประเมิน genetic diversity และการปนเปื้อนทางพันธุ กรรมระหว่าง <i>H. ovina</i> จากฝั่งทะเลอันดามัน</p>

การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมที่ สืบค้นและพัฒนาในกิจกรรมต่างๆ	ประโยชน์และประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สืบ ค้นและพัฒนา	ความเหมาะสมของ การเลือกใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในแต่ละ สถานการณ์	วิธีการใช้เครื่องหมายพันธุ กรรมให้ได้ประโยชน์สูงสุด ในกิจกรรมต่างๆ
<p>- บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงกว่าการวิเคราะห์ด้วย PCR-RFLP ของ 16S rDNA อย่างมากใน <i>H. varia</i> แต่ยังคงบ่งชี้ว่า gene pool ของ <i>H. varia</i> ในฝั่งทะเลอันดามันเป็น panmictic ทำให้การบำรุงพันธุ์สามารถใช้ founders จากแหล่งใดแหล่งหนึ่งในการศึกษา</p> <p>- บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง และบ่งชี้ว่า <i>H. asinina</i> จากฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งอ่าวไทยมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม (โดยพันธุกรรมของ <i>H. asinina</i> จากฟิลิปปินส์มีความแตกต่างกับ <i>H. asinina</i> ของประเทศไทย) ทำให้การบำรุงพันธุ์ต้องใช้ founders จาก local populations ที่ต้องการบำรุงพันธุ์</p> <p>- บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง และบ่งชี้ว่า <i>H. ovina</i> จากฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งอ่าวไทยมีความแตกต่างทางพันธุกรรม ทำให้การบำรุงพันธุ์ต้องใช้ founders จาก local populations ที่ต้องการบำรุงพันธุ์</p>	++	และอ่าวไทยมีประสิทธิ ภาพสูงสุด	
2.3 RAPD		++	- การบำรุงพันธุ์ของ <i>H. varia</i> นั้นสามารถใช้ความรู้พื้นฐานจาก RAPD เพียงเทคนิคเดียวก็เพียงพอ

การใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ สืบค้นและพัฒนาในกิจกรรมต่างๆ	ประโยชน์และประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สืบ ค้นและพัฒนา	ความเหมาะสมของ การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในแต่ละ สถานการณ์	วิธีการใช้เครื่องหมายพันธุ กรรมให้ได้ประโยชน์สูงสุด ในกิจกรรมต่างๆ
3.1 PCR-RFLP ของ 16S rDNA	- บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ นอกจากนั้น mitochondrial DNA เป็น haploid จึงไม่ค่อยมีประโยชน์ต่อ breeding programme มากนัก		
3.2 PCR-RFLP ของ 18S rDNA	- บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม 18S rDNA เป็นมีระดับdiversityที่ต่ำกว่าที่จะใช้ติดตามใน ระดับ individual จึงไม่ค่อยมีประโยชน์ต่อ breeding programme มากนัก	-	
3.3 RAPD	- บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงมาก อย่างไรก็ตาม RAPD จัดเป็น dominant markers ทำให้การติดตามความสัมพันธ์ ทางพันธุกรรม (genetic relationships) มีความยุ่งยากในเชิงปฏิบัติ แม้ว่าในบางกรณีจะมีประโยชน์ต่อ breeding programme ก็ตาม	+	
3.4 Microsatellites	- บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงมาก และแสดง genotypes ในลักษณะ codominant markers (homozygotes สามารถแยกออกจาก heterozygotes) ทำให้การติดตามความ สัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) มีความไม่ยุ่งยาก และมีประโยชน์สูงสุดต่อ breeding programme	+++	

การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมที่ สืบค้นและพัฒนาในกิจกรรมต่างๆ	ประโยชน์และประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สืบ ค้นและพัฒนา	ความเหมาะสมของ การเลือกใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในแต่ละ สถานการณ์	วิธีการใช้เครื่องหมายพันธุ กรรมให้ได้ประโยชน์สูงสุด ในกิจกรรมต่างๆ
<p>4. การเลือก founder populations</p> <p>สำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ของ หอยเป่าอื้อชนิด <i>H. asinina</i></p> <p>4.1 PCR-RFLP ของ 16S rDNA</p> <p>4.2 PCR-RFLP ของ 18S rDNA</p> <p>4.3 RAPD</p>	<p>-บ่งชี้ว่า <i>H. asinina</i> มี gene pool แบบ panmictic (โดยพันธุกรรม ของ <i>H. asinina</i> จากฟิลิปปินส์ไม่มีความแตกต่างกับ <i>H. asinina</i> ของประเทศไทย) ทำให้สามารถเลือก founders จากแหล่งใด แหล่งหนึ่งในประเทศไทยการศึกษา -บ่งชี้ว่า มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร <i>H.</i> <i>asinina</i> ในทะเลไทย กับตัวอย่างจากฟิลิปปินส์ ทำให้สามารถ เลือก founders ใน breeding programme จากแหล่งใดแหล่งหนึ่งใน ประเทศไทยการศึกษา -บ่งชี้ว่า <i>H. asinina</i> มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชา กรจากฝั่งทะเลอันดามัน ฝั่งทะเลอ่าวไทย และ ตัวอย่างจากฟิลิ ปปินส์ ทำให้ควรรเลือก founders ใน breeding programme จาก หลายๆแหล่งในประเทศไทย</p>	-	<p>-RAPD ให้ข้อมูลความ หลากหลายทางพันธุกรรม และแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างกลุ่มตัวอย่างเช่น เดียวกับ microsatellites แต่ สามารถดำเนินการได้ง่าย กว่ามาก จึงควรใช้ RAPD ในการตรวจสอบ inbred natural populations ของ <i>H.</i> <i>asinina</i></p>

การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมที่ สืบค้นและพัฒนาในกิจกรรมต่างๆ	ประโยชน์และประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สืบ ค้นและพัฒนา	ความเหมาะสมของ การเลือกใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในแต่ ละสถานการณ์	วิธีการใช้เครื่องหมายพันธุ กรรมให้ได้ประโยชน์สูงสุด ในกิจกรรมต่างๆ
4.4 Microsatellites	- บ่งชี้ว่า <i>H. asinina</i> มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากฝูงทะเลอันดามัน ฝั่งทะเลอ่าวไทย และ ฝูงอย่างจากฟิลิปปินส์ ทำให้คัดเลือก founders ใน breeding programme จากหลายๆแหล่งในประเทศไทย	++	
5. เครื่องหมายที่จำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างหรือประชากรของหอยเป่า			
5.1 PCR-RFLP ของ 16S rDNA	- รูปแบบ composite haplotype จากการย่อย 16S rDNA ด้วย enzymes 4 ชนิด (<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Hae</i> III, and <i>Alu</i> I) สามารถแยก <i>H. ovina</i> จากฝูงทะเลอ่าวไทย (ABBB) ออกจาก <i>H. ovina</i> จากฝูงอันดามัน (AAAB และ AABB) ก็ได้ โดยไม่มีข้อผิดพลาด	+++	- ควรใช้ RAPD สำหรับ <i>H. asinina</i> เนื่องจากพบ เครื่องหมายที่จำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างจากทะเลอันดามัน
5.2 PCR-RFLP ของ 18S rDNA	- รูปแบบการย่อยของ 18S rDNA ด้วย enzyme เพียงชนิดและ composite haplotypes จากการย่อยด้วย enzyme ทั้ง 3 ชนิด. (<i>Alu</i> I, <i>Taq</i> I, and <i>Hae</i> III) ไม่สามารถระบุเครื่องหมายที่จำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างของหอยเป่าชื่อ <i>H. asinina</i> <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i>	-	- สำหรับ <i>H. ovina</i> สามารถใช้ RAPD และ/หรือ PCR-RFLP ของ 16S rDNA - ไม่พบเครื่องหมายที่จำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างใน <i>H. varia</i>

การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมที่สืบค้นและพัฒนาในกิจกรรมต่างๆ	ประโยชน์และประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สืบค้นและพัฒนา	ความเหมาะสมของการเลือกใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในแต่ละสถานการณ์	วิธีการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมให้ได้ประโยชน์สูงสุด
5.3 RAPD	-เครื่องหมายRAPD ที่จำเพาะกับหอยเป่าชื่อ <i>H. asinina</i> จากฝั่งทะเลอันดามัน (HATRAW) ขนาด650 คู่เบสจากไพรเมอร์ UBC195 เครื่องหมายขนาด 450 และ 850 คู่เบส จากไพรเมอร์ UBC271 -เครื่องหมายRAPD ที่จำเพาะกับหอยเป่าชื่อ <i>H. asinina</i> จากฟิลิปปินส์ขนาด 1000 และ 680 คู่เบส จากไพรเมอร์ UBC197 และขนาด 415 คู่เบส ด้วย UBC195 -นอกจากนี้ยังพบเครื่องหมายRAPD ที่จำเพาะกับหอยเป่าชื่อ <i>H. ovina</i> จากฝั่งทะเลอ่าวไทย ขนาด 1650 คู่เบสจากไพรเมอร์ UBC195	+++	
5.4 Microsatellites	-ไม่พบเครื่องหมายที่จำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างหรือประชากรของหอยเป่าชื่อ <i>H. asinina</i>	-	
6. การทำ quality control ของผลิตภัณฑ์ของหอยเป่าชื่อ	6.1 PCR-RFLP ของ 16S rDNA	+++	-ในการตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์ของหอยเป่าชื่อชนิด <i>H. asinina</i> และ <i>H. varia</i> ควรใช้เครื่องหมาย

การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมที่สืบค้นและพัฒนาในกิจกรรมต่างๆ	ประโยชน์และประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สืบค้นและพัฒนา	ความเหมาะสมของเครื่องมือใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในแต่ละสถานการณ์	วิธีการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมให้ได้ประโยชน์สูงสุด ในกิจกรรมต่างๆ
6.2 PCR-RFLP ของ 18S rDNA	จากการย่อย 16S rDNA ด้วย enzymes 4 ชนิด (<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Hae</i> III, and <i>Alu</i> I) สามารถแยก <i>H. asinina</i> <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> ออกจากกันได้ 100% โดยไม่มีข้อผิดพลาด -รูปแบบการย่อยของ 18S rDNA ด้วย enzyme เพียงชนิดและ composite haplotype จากการย่อย 18S rDNA ด้วย enzyme 3 ชนิด (<i>Alu</i> I, <i>Taq</i> I, and <i>Hae</i> III) ไม่สามารถแยก <i>H. asinina</i> <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> ออกจากกันได้ -ให้ขึ้น RAPD ที่จำเพาะกับ <i>H. asinina</i> <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> จำนวน 10, 2 และ 3 ขึ้น ตามลำดับ	-	พันธุกรรมที่พัฒนาจาก 16S rDNA ก่อน ในกรณีที่มีความสงสัยเกี่ยวกับผลการทดลองเนื่องจากผลรบกวนที่อาจมาจาก interspecific hybridization ควรตรวจสอบตัวอย่างดังกล่าวเพิ่มเติมด้วย เครื่องหมาย SCAR ที่พัฒนามาจาก RAPD
6.3 RAPD	- microsatellites ทั้งหมดที่พัฒนาใน <i>H. asinina</i> ไม่ให้ PCR product ใน <i>H. ovina</i> และ <i>H. varia</i> -เครื่องหมายพันธุกรรม จาก 16S rDNA จำนวน 1 เครื่องหมาย สามารถบ่งชี้ชนิดของ <i>H. asinina</i> ได้ 100% โดยไม่มีข้อผิดพลาด โดยมีความอ่อนไหวของการตรวจสอบเมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ ประมาณ 25 ng ขึ้นไป	++	-ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของ <i>H. ovina</i> ต้องทำการตรวจสอบด้วย PCR-RFLP ของ 16S rDNA
6.4 Microsatellites		-	
6.5 เครื่องหมาย SCAR ที่จำเพาะต่อชนิดของหอยเป่าสือที่พัฒนาจาก 16S rDNA		+++	

การใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ สืบค้นและพัฒนาในกิจกรรมต่างๆ	ประโยชน์และประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สืบ ค้นและพัฒนา	ความเหมาะสมของ การเลือกใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในแต่ละ สถานการณ์	วิธีการใช้เครื่องหมายพันธุ กรรมให้ได้ประโยชน์สูงสุด ในกิจกรรมต่างๆ
6.6 เครื่องหมาย SCAR ที่ จำเพาะต่อชนิดของหอย เปลือกที่พัฒนาจาก RAPD	-เครื่องหมายพันธุกรรมจาก 16S rDNA จำนวน 1 เครื่องหมาย สามารถบ่งชี้ชนิดของ <i>H. varia</i> ได้ โดยไม่มีข้อผิดพลาด โดยมี ความว่องไวของการตรวจสอบเมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบประมาณ 50 ng ขึ้นไป -เครื่องหมาย SCAR จากเครื่องหมาย RAPD จำนวน 3 เครื่อง หมาย สามารถบ่งชี้ชนิดของ <i>H. asinina</i> ได้โดยไม่มีข้อผิดพลาด โดยมีความว่องไวของการตรวจสอบเมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ ประมาณ 100 ng ขึ้นไป -พัฒนาเครื่องหมาย SCAR จากเครื่องหมาย RAPD จำนวน 1 เครื่องหมาย สามารถบ่งชี้ชนิดของ <i>H. varia</i> ได้โดยไม่มีข้อผิดพลาด โดยมีความว่องไวของการตรวจสอบเมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ ประมาณ 20 ng ขึ้นไป	+++	

+++ = เหมาะสมอย่างยิ่ง, ++ = เหมาะสมในบางกรณี, - = ไม่เหมาะสม

ภาคผนวก 2

ผลงานการตีพิมพ์จากโครงการ

International publications

1. Jarayabhand, P., Pripue, P., Klinbunga, S., and Tassanakajon, A. (2002). Identification of species-diagnostic markers of abalone in Thailand using PCR-RFLP of 16S rDNA. *Fisheries Sci.* 68 (suppl. II): 1091-1094
2. Klinbunga, S., Pripue, P., Khamnamtong, N., Puanglarp, N., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P., Hirono, I., Aoki, T. and Menasveta, P. (2003). Genetic diversity and molecular markers of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in Thailand. *Mar. Biotechnol.* 5: 505-517
3. Klinbunga, S., Amparyup, P., Thamrunthanakit, S., Tassanakajon, A., Hirono, I., Aoki, T., Jarayabhand, P. and Menasveta, P. (2004). Population Genetics and Species-Specific Markers of the Tropical Abalone (*Haliotis asinina*) in Thailand. *Mar Biotechnol* 6: S360-S364.
4. Klinbunga, S., Amparyup, P., Leelatanawit, L. Aoki, T., Hirono, I., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Menasveta, P. (2004). Species identification of the tropical abalone (*Haliotis asinina*, *Haliotis ovina* and *Haliotis varia*) in Thailand using RAPD and SCAR markers. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37: 213-222
5. Tang, S., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Jarayabhand, P. and Menasveta, P. (2004). Population structure of tropical abalone (*Haliotis asinina*) in coastal waters of Thailand using microsatellite markers. *Mar. Biotechnol.* 6: 604-611
6. Tang, S., Popongwiwat, A., Klinbunga, S., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Menasveta, P. (2005). Genetic heterogeneity of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) revealed by RAPD and microsatellite analyses. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38: 182-190

International conferences

1. Tassanakajon, A., Tang S. and Klinbunga, S. (2002). Genetic variation in tropical abalone *Haliotis asinina* determined by microsatellite markers. World Aquaculture 2002, 23-27 April 2002, Beijing, China, p.753
2. Jarayabhand, P., Klinbunga, S., Tassanakajon, A., Aoki, T., Hirono, I. And Tiravanich, S. (2003). Selective breeding program for growth rate in the tropical abalone *Haliotis asinina*: combination among classical and molecular genetics. Marine Biotechnology Conference 2003. Nippon Convention Center, Chiba, Japan. 21 – 27 September 2003. p. 87 (oral presentation).

National conferences

1. Tang, S., Klinbunga, S. and Tassanakajon, A. (2001). Development of microsatellites markers in tropical abalone *Haloptis asinina*. 27th Congress on Science and Technology of Thailand. p. 520.
2. Amparyup, P., Klinbunga, S., Tassanakajon, A. and Jarayabhand, P. (2002). Species-specific markers of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) 28th Congress on Science and Technology of Thailand. p. 515.
3. Pripue, P., Khamnamtong, N., Klinbunga, S., Tassanakajon, A. and Jarayabhand, P. (2002). Molecular markers for differentiation of abalone in Thailand based on 16S rDNA variation. 28th Congress on Science and Technology of Thailand. p. 437.
4. Amparyup, P., Khamnamtong, B., Klinbunga, S., Puanglarp, N., Tassakajon, A., Jarayabhand, P. and Menasveta, P. (2003) Development of species-diagnostic markers of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in Thailand. 29th Congress on Science and Technology of Thailand (oral presentation).

Identification of Species-Diagnostic Markers of Abalone in Thailand Using PCR-RFLP of 16S rDNA

PADERMSAK JARAYABHAND¹, PARICHART PRIPUE², NEERAWAN KHAMNUMTONG³, SIRAWUT KLINBUNGA³ AND ANCHALEE TASSANAKAJON⁴

¹ Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand (padermsak@hotmail.com) ² Programme of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand, ³ Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Bangkok 10400, Thailand and ⁴ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

SUMMARY: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of 16S ribosomal (r) DNA was used to identify species-specific markers of three abalone species; *Haliotis asinina*, *H. ovina* and *H. varia* in Thailand. A total of 10 composite haplotypes were found across geographically different samples of these abalone. Species-specific composite haplotypes of each abalone were found. Intraspecific genetic differentiation was clearly observed in *H. ovina* but not in *H. asinina* and *H. varia*. The 16S rDNA of an individual representing major composite haplotypes AAAA, ABBB, AAAB, BABG and BABC were cloned and sequenced. Comparisons of 16S rDNA sequences suggest the possibility of developing a species-specific PCR for each abalone species.

KEY WORDS: genetic markers, PCR-RFLP, 16S rDNA, abalone

INTRODUCTION

Abalone are economically important marine gastropods currently being cultured worldwide. Three species of tropical abalone; *Haliotis asinina*, *H. ovina* and *H. varia* are found in Thai waters.¹⁾ Of these, *H. asinina* is the most promising species being initially cultured in Thailand at present. Nevertheless, relatively little is known about the basic knowledge of the genetic diversity and population structure of this species. This information is essential for the construction of an appropriate management scheme leading to sustainable culturing activity of *H. asinina* in Thailand.

Appropriate genetic markers can be used to elevate the culture and management efficiency of abalone in Thailand. The success of aquacultural activity of commercially important species requires the basic knowledge on stock structure and the use of suitable molecular genetic markers to establish broodstock management programmes in wild populations of exploited species.^{2,3)}

Restriction analysis of mtDNA has been successfully used to estimate levels of genetic diversity and to identify population differentiation in several commercially important marine species, for example; the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*⁴⁾, the American oyster *Crassostrea*

*virginica*⁵⁾ and the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*.⁶⁾

Since mtDNA is haploid and transmitted maternally, the effective population size estimated from mtDNA is generally smaller than that estimated from nuclear markers, such as allozymes and nuclear DNA.⁶⁾ This increases its sensitivity to inbreeding and bottleneck effects compared to nuclear DNA markers.⁷⁾

Species-specific markers also play the important roles to prevent supplying incorrect abalone larvae for the industry and for quality control of cultured abalone from Thailand. These markers are necessary for the development of monospecific farming of *H. asinina* in Thailand.

The objectives of this study were determination of intraspecific genetic differentiation and molecular genetic markers showing species-specific nature with *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* in Thailand.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Specimens representing *H. asinina* ($N = 47$) and *H. ovina* ($N = 64$) were collected from the east (Gulf of Thailand) and the west (The Andaman Sea) coasts of peninsular Thailand. Additional *H. asinina* specimens

were collected from Cambodia ($N = 23$) and Philippines ($N = 14$). The *H. varia* abalone ($N = 25$) were also collected from the Andaman Sea.

DNA extraction

Total DNA was extracted from the adductor muscle of each abalone using a phenol-chloroform-proteinase K method described by Klinbunga *et al.*²⁾ DNA concentration was spectrophotometrically determined and kept at 4° C until required.⁸⁾

Polymerase chain reaction (PCR) and restriction analysis

The 16S ribosomal (r) DNA of each abalone was amplified by PCR using primers 16S-F; 5'-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3' and 16S-R1; -5'-CCGGTCTGAACTCAGATCATGT-3'.⁹⁾ Specimens which were not successfully amplified with those primers were then amplified with 16S-F and 16S-R2; 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAGATCACGT-3'.¹⁰⁾ according to the conditions described by Klinbunga *et al.*³⁾

Eight microlitres (approximately 250 ng) of the amplification product were separately digested with *Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III and *Alu* I, using standard conditions.⁸⁾ The digests were electrophoretically analysed through 2.0% agarose (*Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III) or 3.0 % MetaPhor agarose gels (*Alu* I) and visualised under a UV light after ethidium bromide staining.

Restriction profiles of 16S rDNA digested with each restriction enzyme were alphabetically coded in order of appearance. Each abalone was then assigned a four letter code to describe its composite haplotype.

Cloning of 16S rDNA fragments

The 16S rDNA gene segment was amplified from representative individuals having major composite haplotypes; AAAA, ABBB, AAAB, BABG and BABC. A 580 bp fragment was excised and recovered from the electrophoresed gel individually. The gel-eluted DNA was digested with proteinase K (50 µg/ml in the presence of 0.5% SDS) at 65°C for 1h followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. DNA was cloned using a T-A cloning method.¹¹⁾

One-tenth volume of each ligation reaction was electrotransformed to *E. coli* XL-1 BLUE. Recombinant clones were selected by a *lac Z'* system following standard protocols.⁸⁾ Five recombinant clones were unidirectional sequenced. DNA sequences were aligned using Clustal W.¹²⁾ The

divergence between pairs of sequences was estimated using Kimura's two-parameter model.¹³⁾

RESULTS

Digestion of 16S rDNA (approximately 580 bp in length) with *Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III and *Alu* I provided 2, 2, 2 and 7 restriction patterns, respectively (Table 1). A total of 10 composite haplotypes were found across overall specimens (Table 2). These composite haplotypes could differentiate the species origins of abalone in Thailand unambiguously. No overlapping haplotypes were found between different abalone species. Two composite haplotypes; AAAA and AAAB, were specifically found in *H. asinina* whereas haplotypes ABBB, AAAB and AABG were restricted to *H. ovina*.

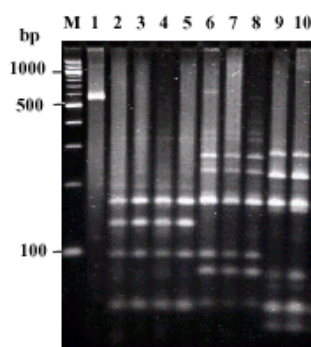


Fig. 1 RFLP patterns of 16S rDNA of *H. asinina* (pattern A, lanes 1-5), *H. ovina* (pattern B, lanes 6-8) and *H. varia* (patterns G, lanes 9-10) digested with *Alu* I. Lanes M and 1 were a 100 bp DNA ladder and undigested 16S rDNA, respectively.

The remaining composite haplotypes (BABG, BABC, BABD, BABF and AABG) were only found in *H. varia*. A lack of geographic heterogeneity was observed in *H. asinina* even though samples originating from Cambodia and Philippines were included. Conversely, genetic differentiation between *H. ovina* from the Andaman Sea (west) and Gulf of Thailand (east) were clearly observed. Differentiation of *H. varia* could not be examined because it is found only in the Andaman Sea.

The 16S rDNA gene segment of representatives of *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* showed relatively high diversity. Interspecific sequence divergence between pairs of 16S rDNA sequences was 10.65% (between AAAA and AAAB) to 13.42% (between AAAA and BABC).

sequences described by Youn-Ho and Vacquier.¹⁴⁾ Our results indicated that PCR-RFLP can also be unambiguously used for identification of species origins of Thai abalone. Moreover, large genetic divergence was observed between different species but lower divergence was observed intraspecifically (3.19% between ABBB and AAAB in *H. ovina* and 1.11% between BABC and BABG in *H. varia*). Sequences of the amplified 16S rDNA of individuals showing major composite haplotypes indicated the possibility of developing rapid and reliable species-specific PCR of abalone in Thailand.

The ability to identify the species origins of Thai abalone is crucial for broodstock management and conservation programmes in these taxa. Following which, these molecular markers can also be used for comparisons of growth performance among three abalone species in communal setting conditions. Our results illustrated the existence of population subdivisions in *H. ovina* but not in *H. asinina* suggesting that levels of gene flow in these species are different. High genetic diversity in a discontinuously distributed species like *H. varia* was surprisingly observed.

PCR-RFLP analysis is a promising approach for population genetic and systematic studies in various taxa.^{3, 17, 18)} Genetic markers found in this study can also identify the species origin of abalone seed accurately. In addition, the PCR-RFLP approach can be further used for evaluation of genetic diversity levels of three abalone species in Thailand.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) and the Department of Biochemistry, Faculty of Science for providing facilities required by the experiments. This research is supported by the Thailand Research Funds (TRF) project 4320015 awarded to SK and AT.

REFERENCES

1. Jarayabhand P, Paphavasit N. A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture* 1996; **140**: 159-168.
2. Klinbunga S, Penman DJ, McAndrew BJ, Tassanakajon A. Mitochondrial DNA diversity in three populations of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Mar. Biotechnol.* 1999; **1**: 113-121.
3. Klinbunga S, Siludjai D, Wuthijinda W, Tassanakajon A, Jarayabhand A, Menasveta P. Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mtDNA-RFLP analyses. *Mar. Biotechnol.* 2001; **3**: (in press).

4. Edwards CA, Skibinski DOF. Genetic variation of mitochondrial DNA in mussel (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) populations from South West England and South Wales. *Mar. Biol.* 1987; **94**: 547-556.
5. Small MP, Chapman RW. Intraspecific variation in the 16S ribosomal gene of *Crassostrea virginica*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1997; **6**: 189-196.
6. Birky CW, Jr, Furest P, Maruyama T. Organelle gene diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics* 1989; **121**: 613-627.
7. O'Connell M, Dillon MC, Wright JM, Bentzen P, Merkouris S, Seeb J. Genetic structuring among Alaskan Pacific herring populations identified using microsatellite variation. *J. Fish. Biol.* 1998; **53**: 150-163.
8. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 546 pp.
9. Palumbi SR, Martin A, Pomano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G. *The Simple Fool's Guide to PCR, version 2*. University of Hawaii, Zoology Department, Honolulu, HI, 1991.
10. Small MP, Chapman RW. Intraspecific variation in the 16S ribosomal gene of *Crassostrea virginica*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1997; **6**: 189-196.
11. Hoelzel AR, Green A. Population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. In: Hoelzel AR (ed) *Molecular Genetic Analysis of Populations*, Oxford: Oxford University Press, 1991, pp.159-187
12. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, position-specific gap penalties and weight metric choices. *Nucleic Acids Res.* 1994; **22**: 4673-4680.
13. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; **16**: 111-120.
14. Youn-Ho L, Vacquier VD. Evolution and systematics in *Haliotidae* (Mollusca: Gastropoda): inference from DNA sequences of sperm lysin. *Mar. Biol.* **1995**; **124**: 267-278.
15. Vacquier VD, Carner KR, Stout CD. Species-specific sequences of abalone lysin, the sperm protein that creates a hole in the egg envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; **87**: 5792-5796.
16. Sweijid NA, Bowie RCK, Lopata AL, Marinaki AM, Harley EH, Cook PA. A PCR technique for forensic, species-level identification of abalone tissue. *J. Shellfish Res.* 1998; **17**: 889-895.
17. White LR, McPherson BA, Stauffer Jr, JR. Molecular genetic identification tools for the unionids of French Creek, Pennsylvania. *Malacologia* 1996; **38**: 181-202.
18. Wilson RR, Donaldson KA. Restriction digest of PCR-amplified mtDNA from fin clips is an assay for sequence genetic "tag" among hundreds of fish in wild populations. *Mol Mar. Biol. Biotechnol.* 1998; **7**: 39-47.

Identification of Species-Diagnostic Markers of Abalone in Thailand Using PCR-RFLP of 16S rDNA

PADERMSAK JARAYABHAND¹, PARICHART PRIPUE², NEERAWAN KHAMNUMTONG³, SIRAWUT KLINBUNGA³ AND ANCHALEE TASSANAKAJON⁴

¹ Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand (padermsak@hotmail.com) ² Programme of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand, ³ Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Bangkok 10400, Thailand and ⁴ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

SUMMARY: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of 16S ribosomal (r) DNA was used to identify species-specific markers of three abalone species; *Haliotis asinina*, *H. ovina* and *H. varia* in Thailand. A total of 10 composite haplotypes were found across geographically different samples of these abalone. Species-specific composite haplotypes of each abalone were found. Intraspecific genetic differentiation was clearly observed in *H. ovina* but not in *H. asinina* and *H. varia*. The 16S rDNA of an individual representing major composite haplotypes AAAA, ABBB, AAAB, BABG and BABC were cloned and sequenced. Comparisons of 16S rDNA sequences suggest the possibility of developing a species-specific PCR for each abalone species.

KEY WORDS: genetic markers, PCR-RFLP, 16S rDNA, abalone

INTRODUCTION

Abalone are economically important marine gastropods currently being cultured worldwide. Three species of tropical abalone; *Haliotis asinina*, *H. ovina* and *H. varia* are found in Thai waters.¹⁾ Of these, *H. asinina* is the most promising species being initially cultured in Thailand at present. Nevertheless, relatively little is known about the basic knowledge of the genetic diversity and population structure of this species. This information is essential for the construction of an appropriate management scheme leading to sustainable culturing activity of *H. asinina* in Thailand.

Appropriate genetic markers can be used to elevate the culture and management efficiency of abalone in Thailand. The success of aquacultural activity of commercially important species requires the basic knowledge on stock structure and the use of suitable molecular genetic markers to establish broodstock management programmes in wild populations of exploited species.^{2,3)}

Restriction analysis of mtDNA has been successfully used to estimate levels of genetic diversity and to identify population differentiation in several commercially important marine species, for example; the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*⁴⁾, the American oyster *Crassostrea*

*virginica*⁵⁾ and the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*.⁶⁾

Since mtDNA is haploid and transmitted maternally, the effective population size estimated from mtDNA is generally smaller than that estimated from nuclear markers, such as allozymes and nuclear DNA.⁶⁾ This increases its sensitivity to inbreeding and bottleneck effects compared to nuclear DNA markers.⁷⁾

Species-specific markers also play the important roles to prevent supplying incorrect abalone larvae for the industry and for quality control of cultured abalone from Thailand. These markers are necessary for the development of monospecific farming of *H. asinina* in Thailand.

The objectives of this study were determination of intraspecific genetic differentiation and molecular genetic markers showing species-specific nature with *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* in Thailand.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Specimens representing *H. asinina* ($N = 47$) and *H. ovina* ($N = 64$) were collected from the east (Gulf of Thailand) and the west (The Andaman Sea) coasts of peninsular Thailand. Additional *H. asinina* specimens

were collected from Cambodia ($N = 23$) and Philippines ($N = 14$). The *H. varia* abalone ($N = 25$) were also collected from the Andaman Sea.

DNA extraction

Total DNA was extracted from the adductor muscle of each abalone using a phenol-chloroform-proteinase K method described by Klinbunga *et al.*²⁾ DNA concentration was spectrophotometrically determined and kept at 4° C until required.⁸⁾

Polymerase chain reaction (PCR) and restriction analysis

The 16S ribosomal (r) DNA of each abalone was amplified by PCR using primers 16S-F; 5'-CGCTGTTTAAACAAAAACAT-3' and 16S-R1; -5'-CCGGTCTGAACTCAGATCATGT-3'.⁹⁾ Specimens which were not successfully amplified with those primers were then amplified with 16S-F and 16S-R2; 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAGATCACGT-3'.¹⁰⁾ according to the conditions described by Klinbunga *et al.*³⁾

Eight microlitres (approximately 250 ng) of the amplification product were separately digested with *Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III and *Alu* I, using standard conditions.⁸⁾ The digests were electrophoretically analysed through 2.0% agarose (*Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III) or 3.0 % MetaPhor agarose gels (*Alu* I) and visualised under a UV light after ethidium bromide staining.

Restriction profiles of 16S rDNA digested with each restriction enzyme were alphabetically coded in order of appearance. Each abalone was then assigned a four letter code to describe its composite haplotype.

Cloning of 16S rDNA fragments

The 16S rDNA gene segment was amplified from representative individuals having major composite haplotypes; AAAA, ABBB, AAAB, BABG and BABC. A 580 bp fragment was excised and recovered from the electrophoresed gel individually. The gel-eluted DNA was digested with proteinase K (50 µg/ml in the presence of 0.5% SDS) at 65°C for 1h followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. DNA was cloned using a T-A cloning method.¹¹⁾

One-tenth volume of each ligation reaction was electrotransformed to *E. coli* XL-1 BLUE. Recombinant clones were selected by a *lac Z'* system following standard protocols.⁸⁾ Five recombinant clones were unidirectional sequenced. DNA sequences were aligned using Clustal W.¹²⁾ The

divergence between pairs of sequences was estimated using Kimura's two-parameter model.¹³⁾

RESULTS

Digestion of 16S rDNA (approximately 580 bp in length) with *Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III and *Alu* I provided 2, 2, 2 and 7 restriction patterns, respectively (Table 1). A total of 10 composite haplotypes were found across overall specimens (Table 2). These composite haplotypes could differentiate the species origins of abalone in Thailand unambiguously. No overlapping haplotypes were found between different abalone species. Two composite haplotypes; AAAA and AAAB, were specifically found in *H. asinina* whereas haplotypes ABBB, AAAB and AABBB were restricted to *H. ovina*.

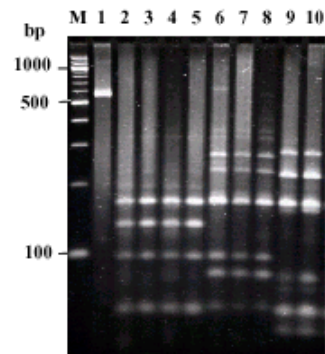


Fig. 1 RFLP patterns of 16S rDNA of *H. asinina* (pattern A, lanes 1-5), *H. ovina* (pattern B, lanes 6-8) and *H. varia* (patterns G, lanes 9-10) digested with *Alu* I. Lanes M and 1 were a 100 bp DNA ladder and undigested 16S rDNA, respectively.

The remaining composite haplotypes (BABG, BABC, BABB, BABF and AABGG) were only found in *H. varia*. A lack of geographic heterogeneity was observed in *H. asinina* even though samples originating from Cambodia and Philippines were included. Conversely, genetic differentiation between *H. ovina* from the Andaman Sea (west) and Gulf of Thailand (east) were clearly observed. Differentiation of *H. varia* could not be examined because it is found only in the Andaman Sea.

The 16S rDNA gene segment of representatives of *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* showed relatively high diversity. Interspecific sequence divergence between pairs of 16S rDNA sequences was 10.65% (between AAAA and AAAB) to 13.42% (between AAAA and BABC).

Table 1 Restriction patterns of 16S rDNA of *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* digested with *Alu* I, *Bam* HI, *Eco* RI and *Hae* III

Enzyme	Pattern observed (bp)
<i>Bam</i> HI	A: 580 B: 380, 200
<i>Eco</i> RI	A: 580 B: 300, 280
<i>Hae</i> III	A: 375, 125, 80 B: 500, 80
<i>Alu</i> I	A: 175, 140, 95, 50, 35 B: 175, 175, 95, 80, 50 C: 175, 175, 50 D: 175, 140, 50, 35 E: 175, 140, 95, 95, 50 F: 220, 140, 80, 50, 35 G: 220, 175, 80, 50, 35

Table 2 Geographic distribution of composite haplotypes (arranged from 16S rDNA digested with *Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III and *Alu* I, respectively) among geographically different samples of three species of abalone

Haplotype	Geographic distribution						
	<i>H. asinina</i>			<i>H. ovina</i>		<i>H. varia</i>	
	A	G	C	P	A	G	A
AAAA	25	17	23	14	-	-	-
AAAE	3	2	-	-	-	-	-
ABBB	-	-	-	-	38	-	-
AAAB	-	-	-	-	-	25	-
AABB	-	-	-	-	-	-	1
BABG	-	-	-	-	-	-	15
BABC	-	-	-	-	-	-	7
BABD	-	-	-	-	-	-	1
BABF	-	-	-	-	-	-	1
AABG	-	-	-	-	-	-	1

Abbreviations: A = the Andaman sea, G = Gulf of Thailand, C = Cambodia, P = Philippines

DISCUSSION

Species-diagnostic markers of three species of abalone (*H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia*) in Thailand were successfully identified based on restriction analysis of the amplified 16S rDNA with *Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III and *Alu* I.

Common composite haplotypes with high frequencies were observed in each species allowing the use of these RFLP markers as species-diagnostic markers for classification of *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* at different stages of development.

Distribution patterns of composite haplotypes in *H. asinina* indicated a lack of intraspecific population structure of this species over vast geographic areas. Our results also suggest that *H. asinina* is probably a high gene flow species. In contrast, region-specific composite haplotypes were observed in *H. ovina* originating from different coastal sides of peninsular Thailand, but not within each coast (data not shown).

BABC CGCCTGTTNACCAAAAAACA-GGCTCCTCGGTCAATTAGTGTGGATGGGAAGTCGGACCTG
 BABG CCCTGTTNACCAAAAAACATGGCTCCTCGGTCAATTAGTGTGGATGGGAAGTCGGACCTG
 AAAA CGCTGTTNACCAAAAA-CATGGCTCCTGTT--TGTTAGNCG-NATANGNAGTCGGACCTG
 AAAB CGCCTGTTTAAACAAAAACATGGCTCCTCGGTGTCTGAGT-GGATGAGGAGTCGGACCTG
 ABBB CGCCTGTTTAAACAAAAACATGGCTCCTCGGTGTTGAGT-GGATGGGAGTCGGACCTG
 * * * * *
 BABC CCCGGTGACCTACGGGTTAAACGGGCCGGGTACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAAT-
 BABG CCCGGTGACCTACGGGTTAAACGGG-TAACCGG-CCCGGTACACTGCCGG--CAAAGGTAGCACAAAT
 AAAA CCCGGTGACCTACGGGT-AAACGG-CCCGG-ACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAAT-
 AAAB CCCGGTGACTACGGGTTAAACGGCCGGGTACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAAT-
 ABBB CCCGGTGACTACGGGTTAAACGGCCCGG-TACACTGACCGTGCAAAGGTAGCACAAAT
 * * * * *
 BABC CACTTGCCTTTAATTGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTT
 BABG CACTTGCCTTTAATTGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTT
 AAAA CACTTGCCTTTAATTGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTT
 AAAB CACTTGCCTTTAATTGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTT
 ABBB CACTTGCCTTTAATTGGAGGCTGGTATGAATGGTTTGACGAGGGCTGAGCTGTCTCTTT
 * * * * *
 BABC TGAATATTTAAAAATTAACCTTCT-AGTGAAAAGGCTTAGATTAGCTGAGGACGAGA
 BABG TGAATATTTAAAAATTAACCTTCTTAGTGTAAAAGGCTTAGATTAGCTGAGGACGAGA
 AAAA TGAATATTTAAAAATTAACCTTCT-AGTGAAAAGGCTTAGATTAGCTGAGGACGAGA
 AAAB TGAATATTTAAAAATTAACCTTCT-AGTGAAAAGGCTTAGATTAGCTGAGGACGAGA
 ABBB TGAATATTTAAAAATTAACCTTCT-AGTGAAAAGGCTTAGATTAGCTGAGGACGAGA
 * * * * *
 BABC AGACCCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAATGAAGGGGTGTCCTCGAATAAGTTAGAGAGC
 BABG AGACCCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAATGAAGGGGTGTCCTCGAATAAGTTAGAGAGC
 AAAA AGACCCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAATGAAGGGGTGTCCTCGAATAAGTTAGAGAGC
 AAAB AGACCCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAATGAAGGGGTGTCCTCGAATAAGTTAGAGAGC
 ABBB AGACCCCTGTTGAGCTTTAGTGTGGAATGAAGGGGTGTCCTCGAATAAGTTAGAGAGC
 * * * * *
 BABC TCAGGTTTGTTCATCCTTTAGTTGGGGTACTGGGGAACATAAGAACTTCCCTGTT
 BABG TCAGGTTTGTTCATCCTTTAGTTGGGGTACTGGGGAACATAAGAACTTCCCTGTT
 AAAA TTAAGTTTATTTTACATCCTTTAGTTGGGGTACTGGGGAACATAAGAACTTCCCTGTT
 AAAB TTAAGTTTATTTTACATCCTTTAGTTGGGGTACTGGGGAACATAAGAACTTCCCTGTT
 ABBB TTAAGTTTATTTTACATCCTTTAGTTGGGGTACTGGGGAACATAAGAACTTCCCTGTT
 * * * * *
 BABC TATAGTTAATTATTTTCGGTTTTCTGACTAAGGATCCAGATTGCTGATTTCGGAAAA
 BABG TATAGTTAATTATTTTCGGTTTTCTGACTAAGGATCCAGATTGCTGATTTCGGAAAA
 AAAA TATTACTGGGTT---TGGCTTGCTAGCTAATGATCCGGCATTGCTGATTTCGGAAAA
 AAAB T-TTAGTAATTAATTTGGTCTGCTGACTGATGATCCGGCATTGCTGATTTCGGAAAA
 ABBB T-TTAGTAGATTGAATTTGGTCTGCCGACTGATGATCCGGCATTGCTGATTTCGGAAAA
 * * * * *
 BABC AGTTACCACAGGGATAACAGC-GTAATCTTTCTGG-AGAGTTCACATTGAAGAA-GGGT
 BABG AGTTACCACAGGGATAACAGC-GTAATCTTTCTGG-AGAGTTCACATTGAAGAA-GGGT
 AAAA AGTTACCACAGGGATAACAGC-GTAATCTTTCTGG-AGAGTTCACATTGAAGAA-GGGT
 AAAB AGTTACCACAGGGATAACAGC-GTAATCTTTCTGG-AGAGTTCACATTGAAGAA-GGGT
 ABBB AGTTACCACAGGGATAACAGC-GTAATCTTTCTGG-AGAGTTCACATTGAAGAA-GGGT
 * * * * *
 BABC TTGCGACCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTGAGGGGTGAGCAGCTTTCCTGG-TTGGT
 BABG TTGCGACCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTGAGGGGTGAGCAGCTTTCCTGG-TTGGT
 AAAA TTGCGACCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTGAGGGGTGAGCAGCTTTCCTGG-TTGGT
 AAAB TTGCGACCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTGAGGGGTGAGCAGCTTTCCTGG-TTGGT
 ABBB TTGCGACCTCGATGTTGGATTAAGGTGTCCTGAGGGGTGAGCAGCTTTCCTGG-TTGGT
 * * * * *
 BABC CTGTTCCGACCATTAACACCTTACGTGATCTGATCTGAGTTCAGACCGG
 BABG CTGTTCCGACCATTAACACCTTACGTGATCTGATCTGAGTTCAGACCGG
 AAAA CTGTTCCGACCATTAACACCTTACGTGATCTGATCTGAGTTCAGACCGG
 AAAB CTGTTCCGACCATTAACACCTTACGTGATCTGATCTGAGTTCAGACCGG
 ABBB CTGTTCCGACCATTAACACCTTACGTGATCTGATCTGAGTTCAGACCGG
 * * * * *

Fig. 2 Sequences of 16S rDNA amplified from *H. asinina* individuals possessing AAAA, *H. ovina* possessing ABBB and AAAB, and *H. varia* possessing BABC and BABG composite haplotypes.

Distributions of *H. ovina* composite haplotypes clearly indicated the existence of intraspecific genetic differentiation in this species. The most common haplotypes ABBB and AAAB in *H. ovina* were different by 2 restriction sites while the rare composite haplotype AABB was the intermediate haplotype between those composite haplotypes. The highest level of genetic diversity was found in *H. varia*. Five composite haplotypes were found in a relatively small sample size ($N = 25$) of *H. varia* compared to 2 and 3 composite haplotypes from *H. asinina* ($N = 84$) and *H. ovina* ($N = 64$), respectively.

The cDNA sequences of the sperm lysin protein previously used for systematic studies of *Haliotis* species showed unusual divergence between species but was highly conserved within species suggesting its high species-specific nature.^{14,15} Recently, Sweijd *et al.*¹⁶ successfully developed species-specific PCR for *H. midae* and *H. spadicea* based on lysin

sequences described by Youn-Ho and Vacquier.¹⁴⁾ Our results indicated that PCR-RFLP can also be unambiguously used for identification of species origins of Thai abalone. Moreover, large genetic divergence was observed between different species but lower divergence was observed intraspecifically (3.19% between ABBB and AAAB in *H. ovina* and 1.11% between BABC and BABG in *H. varia*). Sequences of the amplified 16S rDNA of individuals showing major composite haplotypes indicated the possibility of developing rapid and reliable species-specific PCR of abalone in Thailand.

The ability to identify the species origins of Thai abalone is crucial for broodstock management and conservation programmes in these taxa. Following which, these molecular markers can also be used for comparisons of growth performance among three abalone species in communal setting conditions. Our results illustrated the existence of population subdivisions in *H. ovina* but not in *H. asinina* suggesting that levels of gene flow in these species are different. High genetic diversity in a discontinuously distributed species like *H. varia* was surprisingly observed.

PCR-RFLP analysis is a promising approach for population genetic and systematic studies in various taxa.^{3, 17, 18)} Genetic markers found in this study can also identify the species origin of abalone seed accurately. In addition, the PCR-RFLP approach can be further used for evaluation of genetic diversity levels of three abalone species in Thailand.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) and the Department of Biochemistry, Faculty of Science for providing facilities required by the experiments. This research is supported by the Thailand Research Funds (TRF) project 4320015 awarded to SK and AT.

REFERENCES

- Jarayabhand P, Paphavasit N. A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture* 1996; **140**: 159-168.
- Klinbunga S, Penman DJ, McAndrew BJ, Tassanakajon A. Mitochondrial DNA diversity in three populations of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Mar. Biotechnol.* 1999; **1**: 113-121.
- Klinbunga S, Siludjai D, Wuthijinda W, Tassanakajon A, Jarayabhand A, Menasveta P. Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mtDNA-RFLP analyses. *Mar. Biotechnol.* 2001; **3**: (in press).
- Edwards CA, Skibinski DOF. Genetic variation of mitochondrial DNA in mussel (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) populations from South West England and South Wales. *Mar. Biol.* 1987; **94**: 547-556.
- Small MP, Chapman RW. Intraspecific variation in the 16S ribosomal gene of *Crassostrea virginica*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1997; **6**: 189-196.
- Birky CW, Jr, Furest P, Maruyama T. Organelle gene diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics* 1989; **121**: 613-627.
- O'Connell M, Dillon MC, Wright JM, Bentzen P, Merkouris S, Seeb J. Genetic structuring among Alaskan Pacific herring populations identified using microsatellite variation. *J. Fish. Biol.* 1998; **53**: 150-163.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 546 pp.
- Palumbi SR, Martin A, Pomano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G. *The Simple Fool's Guide to PCR, version 2*. University of Hawaii, Zoology Department, Honolulu, HI, 1991.
- Small MP, Chapman RW. Intraspecific variation in the 16S ribosomal gene of *Crassostrea virginica*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1997; **6**: 189-196.
- Hoelzel AR, Green A. Population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. In: Hoelzel AR (ed) *Molecular Genetic Analysis of Populations*, Oxford: Oxford University Press, 1991, pp.159-187
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, position-specific gap penalties and weight metric choices. *Nucleic Acids Res.* 1994; **22**: 4673-4680.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; **16**: 111-120.
- Youn-Ho L, Vacquier VD. Evolution and systematics in *Haliotidae* (Mollusca: Gastropoda): inference from DNA sequences of sperm lysin. *Mar. Biol.* 1995; **124**: 267-278.
- Vacquier VD, Carner KR, Stout CD. Species-specific sequences of abalone lysin, the sperm protein that creates a hole in the egg envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; **87**: 5792-5796.
- Sweijd NA, Bowie RCK, Lopata AL, Marinaki AM, Harley EH, Cook PA. A PCR technique for forensic, species-level identification of abalone tissue. *J. Shellfish Res.* 1998; **17**: 889-895.
- White LR, McPherson BA, Stauffer Jr, JR. Molecular genetic identification tools for the unionids of French Creek, Pennsylvania. *Malacologia* 1996; **38**: 181-202.
- Wilson RR, Donaldson KA. Restriction digest of PCR-amplified mtDNA from fin clips is an assay for sequence genetic "tag" among hundreds of fish in wild populations. *Mol Mar. Biol. Biotechnol.* 1998; **7**: 39-47.

Genetic Diversity and Molecular Markers of the Tropical Abalone (*Haliotis asinina*) in Thailand

S. Klinbunga,^{1*} P. Pripue,² N. Khamnamtong,¹ N. Puanglarp,¹ A. Tassanakajon,³ P. Jarayabhand,^{4,5} I. Hirono,⁶ T. Aoki,⁶ and P. Menasveta^{1,5}

¹Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency, 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Patthumthani 12120, Thailand

²Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁴Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁵Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁶Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Fisheries, Konan 4-5-7, Tokyo 108-8477, Japan

Abstract: Genetic diversity of abalone in Thailand, *Haliotis asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*, was analyzed by polymerase chain reaction (PCR) of 18S and 16S rDNAs, with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). Species-specific RAPD markers were found in each abalone species. Restriction analysis of 18S (nuclear) ribosomal DNA with *AluI*, *TaqI*, and *HaeIII* and 16S (mitochondrial) rDNA with *BamHI*, *EcoRI*, *HaeIII*, and *AluI* gave 12 and 13 digestion patterns, respectively. A total of 49 composite haplotypes were found. A dendrogram obtained by the unweighted pair-group method with arithmetic mean, constructed from divergence between pairs of composite haplotypes, revealed reproductively isolated gene pools of these abalone and indicated that *H. asinina* and *H. ovina* are genetically closer than *H. varia*. When *H. varia* was discovered owing to small sample sizes, geographic heterogeneity analysis and F_{ST} estimate indicated clear genetic differentiation between *H. ovina* originating from the Andaman Sea (west) and the Gulf of Thailand (east, $P < 0.0001$), whereas partial differentiation was observed between the Philippines and the remaining *H. asinina* samples ($P < 0.0021$). The amplified 16S rDNAs of individuals representing composite haplotypes found in this study were cloned and sequenced. A neighbor-joining tree constructed from sequence divergence of 16S rDNA accurately allocated those sequences according to species origins of abalone. Species-specific PCR based on 16S rDNA polymorphism was successfully developed in *H. asinina* and *H. varia* but not in *H. ovina*.

Keywords: abalone, PCR, RAPD, genetic diversity, population differentiation.

INTRODUCTION

Abalone are marine gastropods occurring in tropical and temperate areas, particularly in the subtidal zones (Geiger, 1998). At least 20 species of abalone distributed worldwide are commercially important. Most of these are large species harvested from natural stocks (Jarayabhand and Paphavasit, 1996).

Abalone has been farmed commercially for the last few decades in various parts of the world (Shepherd et al., 1992). Overexploitation of natural abalone resulted in the rapid development of abalone aquaculture in several Asian countries (Jarayabhand and Paphavasit, 1996). Three abalone species are found in Thailand: *Haliotis asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*. Only *H. asinina* and *H. ovina* are found along the eastern coasts of the upper Gulf of Thailand, but all 3 species occur in the Andaman Sea (Tookwinas et al., 1986; Nateewathana and Bussarawit, 1988).

Thus far, there have been no publications concerning genetic diversity and population structure of Thai abalone. This information is essential for the construction of appropriate breeding programs, broodstock selection, and management schemes (stock structure analysis and phylogenetic studies) leading to sustainable culturing of abalone in Thailand. Additionally, species-specific markers can be used for quality control to prevent incorrect use of abalone larvae and abalone species in canning (Sweijd et al., 1998).

Among abalone in Thai waters, *H. asinina* provides the highest percentage (85%) of meat weight relative to total weight, compared with 40% and 30% for *H. ovina* and *H. varia*, respectively (Singhagruiwan and Doi, 1993). Therefore, *H. asinina* has a high value for the "cocktail-sized" (40–70 mm) abalone market, as is true for *H. diversicolor supertexta* in Taiwan (Jarayabhand and Paphavasit, 1996). It is a target species currently promoted for commercial culture in Thailand.

There have been few published population genetics studies in abalone. Huang et al. (2000) analyzed genetic structure of 100 blacklip abalone, *H. rubra* (Leach) from 9 sites along the Victorian coast and another site at Eden (New South Wales, Australia) using randomly amplified polymorphic DNA and polymerase chain reaction (RAPD-PCR) (UBC101, UBC135, UBC149, UBC159, UBC169, and M13), 2 minisatellites (GHR and MIPR), and 3 microsatellites (RUBGT1, RUBCA1, and RUBGACA1). All DNA markers revealed significant population subdivision within *H. rubra*. Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium



Figure 1. Map indicating sample collection sites of abalone; *H. asinina*, *H. ovina*, *H. varia* were used in this study. Dots represent geographic locations (excluding the Philippines sample) from which at least one abalone species was collected (see Table 1 for abbreviations of sample sites). Samet Island (SAM) is located in Rayong (RAY) province.

were observed at all microsatellite loci across all investigated populations, whereas results from minisatellite analysis of those samples conformed to Hardy-Weinberg equilibrium.

Hamm and Burton (2000) determined allelic frequencies of 400 individuals of the black abalone (*H. cracherodii*) from 7 geographic sites of southern and central California (Vandenberg Marine Ecological Reserve, Cambria, San Simeon, Big Creek Marine Ecological Reserve, Carmel Point, Point Pinos, and Scotts Creek) using allozymes (*GPI**, *AAT-1**, and *PGM**) and COI sequences. Allelic frequencies among sites were significantly different

Table 1. Sample Collection Sites and Sample Sizes of Abalone Specimens Used in This Study

Geographic origin	Abbreviation	Sample size (N)
<i>H. asinina</i>		
Samet Island, Rayong (Gulf of Thailand)	HASAME	12
P ₀ stock, Samet Island, Rayong (Gulf of Thailand)	HASAMHE	19
Cambodia (east of peninsular Thailand)	HACAME	21
P ₀ stock, Cambodia (east of peninsular Thailand)	HACAMHE	15
Talibong Island, Trang (Andaman Sea)	HATRAW	28
F ₁ , Philippines (SEAFDEC, Iloilo)	HAPHIE	20
<i>H. ovina</i>		
Sichang Island, Chon Buri (Gulf of Thailand)	HOCHOE	24
Samet Island, Rayong (Gulf of Thailand)	HOSAME	18
Churk Island, Trang (Andaman Sea)	HOTRAW	18
Similan Island, Phangnga (Andaman Sea)	HOPHAW	11
<i>H. varia</i>		
L-Island, Phuket (Andaman Sea)	HVPHUW	21
Similan Island, Phangnga (Andaman Sea)	HVPHAW	2
Total (N)		209

at all 3 loci. Genetic distance was found to be independent from geographic distance over approximately 300 km of the sampling range. The COI sequences ($N = 51$) obtained from 5 of the overall investigated populations did not reveal population differentiation in this species.

Partial sequences of 18S rDNA were used to differentiate closely related abalone, *H. discus discus* and *H. discus hannai*. The amplified 18S rDNAs (forward primer, 5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3'; and reverse primer, 5'-TGA TCC TCC TGC AGG TTC A-3') were directly sequenced and multiple-aligned with those of *H. madaka* and *H. gigantea* and a land gastropod (*Limicolaria kambeul*). The inferred 18S rDNA phylogeny indicated that *H. discus discus* and *H. discus hannai* are closely related but distinguishable at the subspecies level (Naganuma et al., 1998).

The cDNA sequences of a lysin gene of 27 abalone species were compared, and 22 of 27 investigated taxa were clearly distinguishable by at least 20 nucleotide differences. The lysin sequences are almost identical between *H. makada* and *H. discus hannai*, *H. conicopora* and *H. rubra*, *H. diversicolor supertexta* and *H. diversicolor aquatilis*, and *H. tuberculata lamellosa* and *H. tuberculata tuberculata*. (Lee and Vacquire 1995).

The objective of this study was to evaluate the levels of genetic diversity and population differentiation of *H. asinina* compared with those of *H. ovina* and *H. varia* using RAPD-PCR as well as polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

analysis of 18S and 16S rDNAs. Representative individuals of abalone exhibiting 16S rDNA composite haplotypes found in this study were cloned and sequenced. Species-specific PCR based on polymorphism of 16S rDNA for *H. asinina* and *H. varia* was developed.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Tropical abalone, *H. asinina* ($N = 59$), *H. ovina* ($N = 71$), and *H. varia* ($N = 23$), were collected over their geographic distribution in Thailand (Figure 1 and Table 1). In addition, *H. asinina* from Cambodia (HACAME, $N = 21$ and HACAMHE, $N = 15$) and the Philippines (HAPHIE, $N = 20$) were also sampled. Specimens from the Thai and Cambodian and Philippine hatchery stocks were established from approximately 100 and 200 founders of the local populations, respectively. Specimens were kept at -30°C until required.

DNA Extraction

Total DNA was extracted from the adductor muscle of each abalone using a phenol-chloroform-proteinase K method (Klinbunga et al., 1996). The concentration of extracted DNA was spectrophotometrically estimated using a SPECTRONIC Genesys 5 spectrophotometer (Milton Roy). DNA was stored at 4°C until needed.

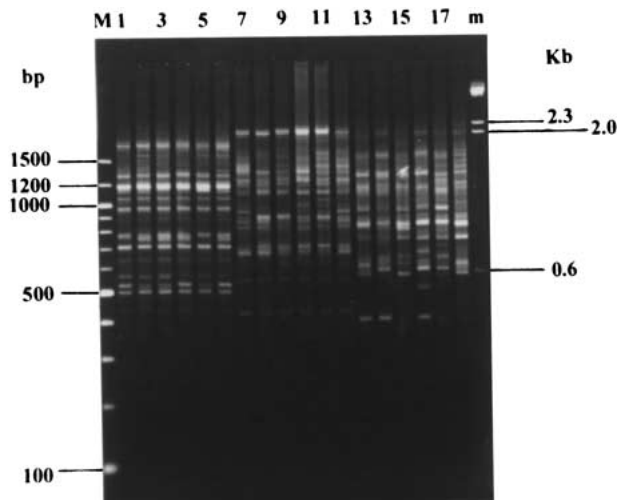


Figure 2. RAPD patterns resulting from amplification of genomic DNA of *H. asinina* (lanes 1–6), *H. ovina* (lanes 7–12), and *H. varia* (lanes 13–18) with the primer YN73. Lane M is a 100 bp ladder; lane m, λ -HindIII.

RAPD-PCR

Three selected minisatellite primers (INS, 5'-ACA GGG GTG TGG GG-3'; M13, 5'-GAG GGT GGN GGN TCT-3'; and YN73, 5'-CCC GTG GGG CCG CCG-3'; Heath et al., 1993) were analyzed against *H. asinina* ($N = 25$), *H. ovina* ($N = 25$), and *H. varia* ($N = 20$) individuals. RAPD-PCR was performed in a 25- μ l reaction volume containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 100 μ M of each dNTP, 0.2 μ M (INS and YN73) or 0.4 μ M (M13) of each primer, 1 unit of *AmpliTaq* DNA polymerase (PerkinElmer Cetus) and 25 ng of DNA template. PCR was performed in an Omnigene-E thermal cycler (Hybaid) using conditions described by Klinbunga et al. (2000).

PCR of 16S and 18S rDNAs

Two gene regions, 16S rDNA (mitochondrial gene) and 18S rDNA (nuclear gene, 18F, 5'-TGG ATC CGG GCA AGT CTG GTG CC-3'; and 18R, 5'-TGA AGT CAA GGG CAT CAC AGA CC-3'), of each abalone were analyzed by PCR-RFLP. The 16S rDNA was amplified using primers 16S_{F1} (5'-CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT-3') and 16S_{R1} (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ATG T-3') (Palumbi et al., 1991). Specimens that were not successfully amplified with those primers (1%) were then amplified with 16S_{F1} and 16S_{R2} primers (5'-GGT CTG AAC TCA GAT CAG ATC ACG T-3') (Small and Chapman, 1997). PCR was performed in 50 μ l containing 10 mM Tris-

Table 2. Restriction Fragment Patterns Resulting from Digestion of 18S and 16S rDNAs of *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* with Restriction Endonucleases

rDNA/Enzyme	Pattern Observed (bp)
<i>Alu</i> 18S I	A: 680, 520, 410, 350, 290, 250, 240, 110
	B: 520, 410, 290, 250, 110, 110
	C: 680, 520, 410, 290, 250, 110
	D: 650, 520, 410, 350, 290, 250, 240, 110
	E: 520, 410, 350, 290, 250, 240, 110
	F: 520, 410, 350, 290, 250, 110
<i>Taq</i> 18S I	A: 410, 270, 210, 80
	6: 500, 410, 410, 270, 210, 80
	C: 500, 410, 270, 210, 80
	D: 500, 500, 410, 270, 210, 80
<i>Hae</i> 18S III	A: 390, 210, 200
	B: 390, 210, 200, 180
<i>Bam</i> 18S HI	A: 580
<i>Eco</i> 16S RI	B: 380, 200
	A: 580
<i>Hae</i> 16S III	B: 300, 280
	A: 380, 120, 80
<i>Alu</i> 16S I	B: 500, 80
	A: 175, 140, 95, 50
	B: 175, 175, 95, 80, 50
	C: 220, 175, 80, 50, 35
	D: 175, 175, 50
	E: 175, 140, 95, 80, 50
	F: 220, 140, 80, 50, 35
G: 175, 140, 50, 35	

HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM (18S rDNA), or 2 mM (16S rDNA) of MgCl₂, 200 μ M of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, 0.5 μ M of each primer, 1 unit of *DyNAzyme* II DNA polymerase (Finnzymes), and 25 ng of DNA template, using amplification conditions according to Klinbunga et al. (2002).

Restriction Enzyme Digestion and Agarose Gel Electrophoresis

The 16S rDNA and gel-eluted 18S rDNA amplification products were screened against 24 restriction endonucleases (*Acs*I, *Alu*I, *Bam*HI, *Bfr*I, *Bgl*II, *Bst*EII, *Cla*I, *Dde*I, *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hind*III, *Hinf*I, *Kpn*I, *Mbo*I, *Nde*I, *Pst*I, *Rsa*I, *Sal*I, *Sma*I, *Ssp*I, *Swa*I, *Taq*I, and *Vsp*I). Three (*Alu*I, *Taq*I, and *Hae*III) and 4 polymorphic enzymes (*Bam*HI, *Eco*RI, *Hae*III, and *Alu*I) were found for the amplified 18S

and 16S rDNAs, respectively. Digestion of PCR products was performed in a 15-µl reaction for 6 to 12 hours using the conditions recommended by the manufacturers (Promega and New England Biolabs). The digest was electrophoresed through 2% agarose gel or 3% Metaphor (*AluI*-digested 16S rDNA) at 4 V/cm. The restricted DNA was visualized under a UV transilluminator after ethidium bromide staining (Maniatis et al., 1982)

Cloning and Sequencing of 16S rDNA of Abalone

The 16S rDNA segment amplified from an individual representing each composite haplotype was fractionated through a 1.5% agarose gel, excised, and eluted from the gel using a Prep-A-Gene DNA purification kit (Bio-Rad). The eluted DNA was purified by phenol-chloroform extraction and recovered by ethanol precipitation before being ligated to pGEM-T easy vector (Promega) at 4°C for 16 hours. One-tenth volume of each ligation was electrotransformed to *Escherichia coli* XL1-BLUE (Dower et al., 1988). Recombinant clones were selected by a lacZ' system following standard protocols (Maniatis et al., 1982). A 580-bp insert was verified by digestion of the recombinant plasmid with *Eco* RI. Recombinant clones were sequenced for both directions using an automated DNA sequencer (Li-COR).

Species-Specific PCR and Sensitivity Test

A reverse primer for each abalone was designed and tested in combination with the 16S_{F1} primer for examining species specificity against DNA of target and nontarget species (*N* = 75, 64, and 20 for *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*, respectively). Species-specific PCR was performed by pre-denaturation at 94°C for 3 minutes followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 minute, annealing at 60°C (65°C for *H. varia*-specific primers) for 1 minute, and extension at 72°C for 1 minute. The final extension was performed at the same temperature for 7 minutes. The amplified 16S rDNA was electrophoretically analyzed through 1.6% agarose gels. The sensitivity test was examined against 2-fold dilutions (12.25 pg to 25 ng) of DNA template of the target species.

Data Analysis

Restriction patterns generated from each restriction endonuclease were given letter designations alphabetically according to their appearance. The composite haplotypes

Table 3. Frequency Distribution of Composite Haplotypes of *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* Resulting from Restriction Analysis of 16S rDNA with *Bam*HI, *Eco*RI, *Hae*III, and *AluI*

Composite Haplotype	<i>H. asinina</i>										<i>H. ovina</i>				<i>H. varia</i>			
	HASAMHE (N = 19)	HASAME (N = 12)	HATRAW (N = 28)	HACAMHE (N = 15)	HACAME (N = 21)	HAPHIE (N = 20)	HOCHOE (N = 24)	HOSAME (N = 18)	HOTRAW (N = 18)	HOPHAW (N = 11)	HVPHUW (N = 21)	HVPHAW (N = 2)	HOSAME (N = 18)	HOTRAW (N = 18)	HOPHAW (N = 11)	HVPHUW (N = 21)	HVPHAW (N = 2)	
I AAAAA	0.8421 (16)	1.0000 (12)	0.9286 (26)	1.0000 (15)	1.0000 (21)	1.0000 (20)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
II AAAAE	0.1579 (3)	—	0.0714 (2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
III ABBB	—	—	—	—	—	—	1.0000 (24)	1.0000 (18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
IV AAAB	—	—	—	—	—	—	—	—	0.944 (17)	1.0000 (11)	—	—	—	—	—	—	—	
V AABB	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0556 (1)	—	—	—	—	—	—	—	—	
VI BABD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2381 (5)	0.5000 (1)	—	
VII BABC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.6191 (13)	0.5000 (1)	—	
VIII BABG	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0476 (1)	—	—	
IX BABF	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0476 (1)	—	—	
X AABC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0476 (1)	—	—	

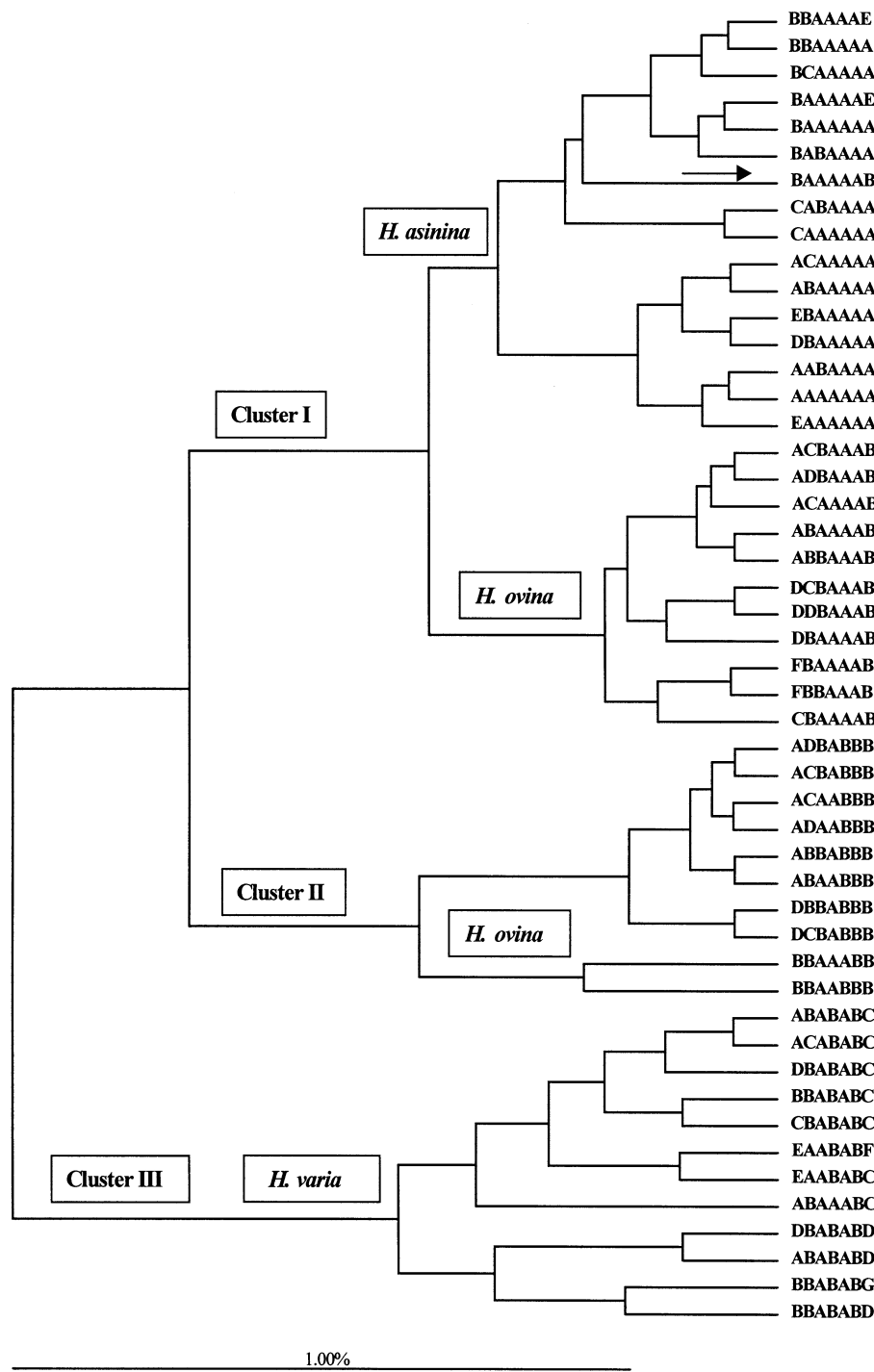


Figure 3. A UPGMA dendrogram indicating genetic relationships between composite haplotypes of *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* based on PCR-RFLP of 18S and 16S rDNAs. Arrow indicates misclustering of *H. ovina* composite haplotype (BAAAAAB) into those of *H. asinina*.

were constructed from combinations of restriction patterns of 18S and 16S rDNAs, respectively. The genetic distance between composite haplotypes (d), haplotype (h), and nucleotide diversity (π) within geographic samples and nucleotide divergence between samples (d_A) were calculated (Nei and Li, 1979; Nei and Tajima, 1981; Nei, 1987) using REAP (McElroy et al., 1991). An unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) dendro-

gram (Sneath and Sokal, 1973) based on the percentage of genetic distance between pairs of composite haplotypes (PCR-RFLP) was constructed using Neighbor in PHYLIP 3.56c (Felsenstein, 1993). Additionally, 16S nucleotide sequences were aligned using CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). The divergence between pairs of sequences was estimated using Kimura's (1980) 2-parameter model. A neighbor-joining tree (Saitou and Nei, 1987) was con-

Table 4. Haplotype and Nucleotide Diversity Within Samples of *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* Determined by Restriction Analysis of 18S and 16S rDNAs

Sample	Haplotype diversity \pm SE	Nucleotide diversity ($\times 100$)
<i>H. asinina</i>		
HASAME	0.0000 \pm 0.0000	0.0000
HASAMHE	0.7511 \pm 0.0508	0.3139
HACAME	0.3391 \pm 0.0898	0.1715
HACAMHE	0.7816 \pm 0.0518	0.4809
HATRAW	0.7065 \pm 0.0536	0.3758
HAPHIE	0.8359 \pm 0.0288	0.4910
<i>H. ovina</i>		
HOCHOE	0.6241 \pm 0.0679	0.1897
HOSAME	0.7937 \pm 0.0392	0.1903
HOTRAW	0.8317 \pm 0.0417	0.4073
HOPHAW	0.8831 \pm 0.0293	0.4222
<i>H. varia</i>		
HVPHUW	0.9013 \pm 0.0248	0.8114
HVPHAW	0.6667 \pm 0.2041	0.6057
Average	0.6762 \pm 0.0057	0.3716 \pm 0.0000

structured. Geographic heterogeneity analysis between pairs of geographic samples were analyzed using a Monte-Carlo simulation (Roff and Bentzen, 1989) implemented in REAP (McElroy et al., 1991). F_{ST} statistics were calculated using GENEPOP (Raymond and Rousset, 1995).

RESULTS

Using minisatellite primers, we found *H. asinina*-specific fragments (1450 bp, 1000 bp, and 780 bp from INS and 1190 bp, 980 bp, 710 bp, and 500 bp from YN73), *H. ovina*-specific fragments (2100 bp and 420 bp from YN73), and *H. varia*-specific fragment (820 bp from YN73) (Figure 2).

Twenty-five restriction patterns were generated from analysis of 16S (580 bp) and 18S rDNAs (900 bp) of 209 individuals of 3 abalone species. Digestion of 18S rDNA with *Alu* I and *Taq* I revealed the existence of intraindividual polymorphism in these taxa (Table 2). Restriction analysis of 16S rDNA with *Eco* RI indicated that all specimens of abalone except *H. ovina* from the Gulf of Thailand possessed pattern A. Therefore, the geographic origin of *H. ovina* from the east and west coasts of peninsular Thailand could be simply determined by this enzyme digestion. Differentiation of *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* at the interspecific level can be carried out by digestion of 16S rDNA with *Alu* I.

Patterns A (95.65%) and E (4.35%) were restricted to *H. asinina*, whereas *H. ovina* exhibited pattern B (100%). Four restriction patterns (C, 65.21%; D, 26.09%; F, 4.35%; and G, 4.35%) were observed in *H. varia* (Table 2).

Considering only 16S rDNA, 10 composite haplotypes were generated and did not overlap between different species (Table 3). A total of 49 composite haplotypes were observed when digestion patterns of 18S rDNA were included. Distributions of 18S rDNA composite haplotypes alone overlapped between different species of abalone.

A UPGMA dendrogram constructed from genetic distance between pairs of 18S and 16S rDNA composite haplotypes of *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* precisely allocated 48 composite haplotypes according to their species origins. Only BAAAAAB found in *H. ovina* misclustered with *H. asinina* composite haplotypes (Figure 3).

The average haplotype diversity and nucleotide diversity within samples of 3 abalone were 0.6762% (0.0000%–0.9013%) and 0.3716% (0.0000%–0.8114%), respectively (Table 4). The percentage of nucleotide divergence between geographic samples of different species (0.81%–2.81%) was greater than that between geographic samples within a given species (0.00%–0.47% within *H. asinina*, 0.00%–1.07% within *H. ovina*, and –0.02% within *H. varia*, respectively).

Disregarding HVPHAW, in which only 2 specimens were examined, geographic heterogeneity across overall samples was significant ($P < 0.0001$), indicating the existence of genetic differentiation of abalone in this study. Genetic heterogeneity between geographic samples of different abalone species was also statistically significant ($P < 0.0021$). Within *H. asinina*, significant differences between the Philippine samples and the remaining samples (except HACAMHE) were found ($P < 0.0021$). In contrast, strong genetic differentiation between *H. ovina* originating from the Andaman Sea and the Gulf of Thailand was observed ($P < 0.0001$, Table 5). Analysis of population differentiation using the F_{ST} estimate provided concordant conclusions (Table 6).

A neighbor-joining tree based on sequence divergence between composite haplotypes of different abalone species allocated sequences (Figure 4) of composite haplotypes AAAA and AA AE (*H. asinina*), AAAB, AAB B, and AB B B (*H. ovina*), and AABC, BABC, BABD, BABF, and BABG (*H. varia*) accurately according to their species origins (Figure 5). Species-specific PCR was successfully developed in *H. asinina* and a small sample of *H. varia*, but not in *H. ovina* (Figure 6). The sensitivity of detection for primers specific to *H. asinina* and *H. varia* was approximately 25 pg and 50 pg, respectively (Figure 7).

Table 5. Geographic Heterogeneity Analysis of *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* Based on PCR-RFLP of 16S rDNA (above diagonal) and 18S plus 16S rDNAs (below diagonal)

	HASAMHW	HASAME	HATRAW	HACAMHE	HACAME	HAPHIE	HOCHOE	HOSAME	HOTRAW	HOPHAW	HVPHUW	HVPHAW
HASAMHE	—											
HASAME	0.0184^{ns}	—										
HATRAW	0.0087^{ns}	0.1371^{ns}	—									
HACAMHE	0.0106^{ns}	0.0086^{ns}	0.2670^{ns}	—								
HACAME	0.0293^{ns}	0.5741^{ns}	0.0657^{ns}	0.0035^{ns}	—							
HAPHIE	0.0007*	0.0003*	<0.0001*	0.0085^{ns}	0.0001*	—						
HOCHOE	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	—					
HOSAME	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.1264^{ns}	0.1264^{ns}	—				
HOTRAW	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	—			
HOPHAW	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.3668^{ns}	—		
HVPHUW	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	—	
HVPHAE	0.0639^{ns}	0.0102^{ns}	0.0172^{ns}	0.0572^{ns}	0.0114^{ns}	0.0100^{ns}	0.0328^{ns}	0.0784^{ns}	0.1565^{ns}	0.1249^{ns}	0.7710^{ns}	—

^{ns}Not significant; **P* < 0.0021 following a sequential Bonferroni method (Rice, 1989).

DISCUSSION

Species-Diagnostic Markers of *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*

PCR-RFLP of 18S and 16S rDNAs provided useful information on species identification, population differentiation, and genetic diversity of the abalone we investigated. Restriction analysis of 16S rDNA was sufficient for species identification of *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*. Species-diagnostic markers were found from both single (16S rDNA–*AluI*) and multiple enzyme digestions (composite haplotypes of 16S rDNA).

Muchmore et al. (1998) identified tandemly repeated satellite DNA (290–291 bp in length) in 5 species of eastern Pacific abalone (*H. rufescens*, *H. kamtschakana*, *H. corrugata*, *H. sorenseni*, and *H. walallensis*). Satellite-specific primers were designed and used to determine the consensus sequences of 5 abalone species by direct sequencing of the PCR product.

Sweijd et al. (1998) developed species-specific markers for differentiation of a commercially exploited abalone in South Africa, *H. midae*, and a sympatrically congeneric species, *H. spadicea*, for quality control of exported abalone based on species-specific PCR and PCR-RFLP approaches. PCR primers designed from cDNA of the lysin gene sequences specifically amplified a 1300-bp fragment from genomic DNA of dried, cooked, and fresh abalone tissues. A 146-bp fragment was used to verify whether canned abalone was *H. midae*. Discrimination of these abalone could also be carried out by restriction analysis of a 1300-bp fragment with *CfoI*, *DraI*, *TaqI*, and *HinI*.

Species-specific PCR based on 16S rDNA polymorphism, which is more accurate and convenient than that based on RAPD analysis, was successfully developed in *H. varia* (100% amplification success without any false positives) and *H. asinina* (100% with a false positive from a single individual of *H. varia*), but not in *H. ovina* (68.75% with extensive false-positive results from *H. asinina* and *H. varia*). As a result, both *H. varia*- and *H. asinina*-specific primers should be used concurrently to eliminate misidentification problems.

Genetic Diversity of Abalone in Thai Waters

Analysis of genetic diversity and differentiation of various organisms is essential for genetic research, including indi-

Table 6. Estimated F_{ST} (and P value) Between Pairs of Geographic Samples of Each Abalone Based on Restriction Analysis of 18S and 16S rDNAs

Geographic samples	18S rDNA	16S rDNA
HASAMHE-HASAME	0.2563 (0.0083 ^{ns})	0.0699 (0.2656 ^{ns})
HASAMHE-HATRAW	0.0668 (0.0388 ^{ns})	-0.0058 (0.6350 ^{ns})
HASAMHE-HACAMHE	0.0744 (0.0483 ^{ns})	0.0895 (0.2385 ^{ns})
HASAMHE-HACAME	0.0862 (0.0686 ^{ns})	0.1208 (0.0977 ^{ns})
HASAMHE-HAPHIE	0.1591 (0.0008*)	0.1160 (0.1059 ^{ns})
HASAME-HATRAW	0.1641 (0.0141 ^{ns})	-0.0074 (0.5693 ^{ns})
HASAME-HACAMHE	0.2934 (0.0022 ^{ns})	Not possible
HASAME-HACAME	0.0437 (0.2712 ^{ns})	Not possible
HASAME-HAPHIE	0.4535 (<0.0001*)	Not possible
HATRAW-HACAMHE	0.0052 (0.3347 ^{ns})	0.0051 (0.5347 ^{ns})
HATRAW-HACAME	0.0497 (0.0747 ^{ns})	0.0224 (0.4999 ^{ns})
HATRAW-HAPHIE	0.1801 (<0.0001*)	0.0199 (0.5035 ^{ns})
HACAMHE-HACAME	0.1512 (0.0058 ^{ns})	Not possible
HACAMHE-HAPHIE	0.0560 (0.0566 ^{ns})	Not possible
HACAME-HAPHIE	0.3302 (<0.0001*)	Not possible
HOCHOE-HASAME	0.0385 (0.1173 ^{ns})	Not possible
HOCHOE-HOTRAW	0.1296 (0.0035*)	0.9525 (<0.0001*)
HOCHOE-HOPHAW	0.1046 (0.0226 ^{ns})	1.0000 (<0.0001*)
HOSAME-HOTRAW	0.0285 (0.1754 ^{ns})	0.9444 (<0.0001*)
HOSAME-HOPHAW	-0.0017 (0.4295 ^{ns})	1.0000 (<0.0001*)
HOTRAW-HOPHAW	-0.0134 (0.5747 ^{ns})	-0.0299 (1.0000 ^{ns})
HVPHUW-HVPHAW	0.0876 (0.3125 ^{ns})	-0.2409 (1.0000 ^{ns})

^{ns}Not significant; * $P < 0.0042$ following a sequential Bonferroni method (Rice, 1989).

viduality and parentage, population genetics, phylogenetics, molecular taxonomy and systematics, and evolutionary studies (Avice, 1994).

Only 2 specimens from HVPHAW were analyzed; therefore, results from this geographic sample were not considered. Moreover, interpretation of allelic variation was not possible for restriction analysis of 18S rDNA with *AluI* and *TaqI* owing to the existence of intraindividual polymorphism in these taxa. As a result, genetic distances between individuals carrying different 18S rDNA haplotypes were estimated using the band-sharing method, similar to data from 16S rDNA polymorphism (mtDNA).

The nucleotide diversity within each abalone species was greater than that of the large oysters *Crassostrea belcheri* (0.0945%) and *C. iredalei* (0.0912%), but much lower than that of the small oysters *Saccostrea forskali* (2.8711%) and *Striostrea (Parastriostrea) mytiloides* (3.2388%), and the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (3.328%) (Klinbunga et al., 2001, 2002). High levels of genetic diversity in hatchery stocks of *H. asinina* (HASAMHE, HACAMHE,

and HAPHIE) should result from the use of a large number of founders to establish those stocks. In contrast, a lack of genetic heterogeneity in HASAME probably resulted from genetic drift in that geographic sample.

Misclustering of a composite haplotype of *H. ovina* (BAAAAAB) originating from the Andaman Sea with those of *H. asinina* probably resulted from the insufficient number of restriction endonucleases used in this study. Although species identification was successful, estimation of genetic diversity levels in abalone should be re-examined using additional gene regions or restriction endonucleases for more accurate results.

Population Differentiation of *H. asinina* and *H. ovina*

The nucleotide divergence between geographic samples within each species was extremely low, implying a low degree of intraspecific population differentiation in abalo-

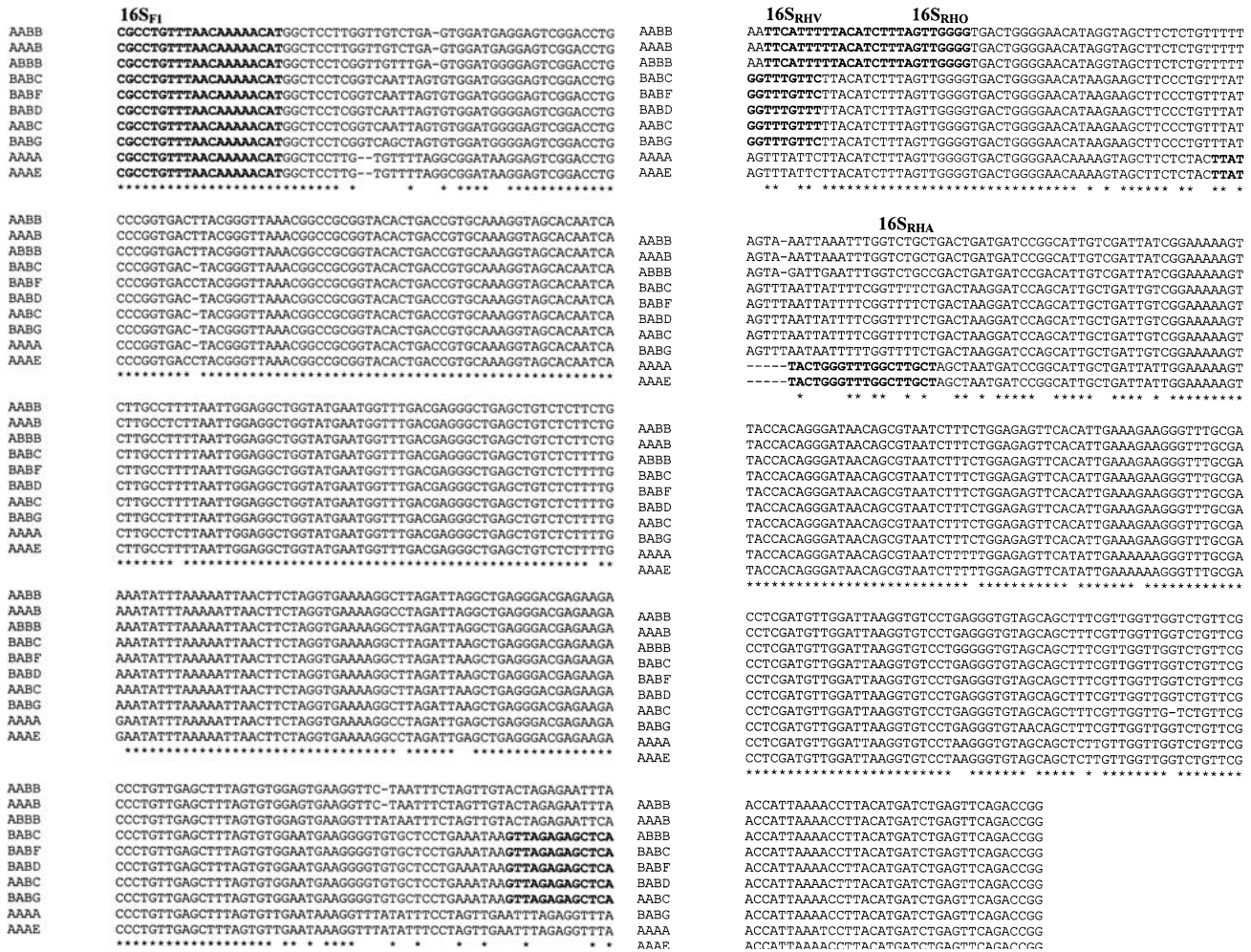


Figure 4. Sequence alignment of abalone individuals exhibiting different composite haplotypes of 16S rDNA (accession numbers AY163250–AY163259). Asterisks indicate identical bases among compared sequences. Regions used to design primers for development of species-specific PCR are illustrated in boldface.

ne. This was consistent with population genetic studies of *H. cracherodii* along the central California coast, where low genetic distance (0.001–0.057) resulted from allozyme (*GPI**, *AAT-I**, and *PGM**) and COI sequence divergence of specimens collected from a geographic distance covering about 300 km (Hamm and Burton, 2000). Conversely, larger nucleotide divergence between abalone species was observed. The percentage of nucleotide divergence between pairs of samples from different species was 0.81% to 2.81%. Naganuma et al. (1998) examined divergence of COI between *H. discus discus* and *H. discus hannai* and found that the sequence divergence between these morphologically similar taxa was 0.8%.

Large genetic discontinuity was found between *H. ovina* originating from the west (the Andaman Sea) and the east (the Gulf of Thailand) of peninsular Thailand, reflecting strong genetic differentiation in these species. This

was consistently supported by geographic heterogeneity and F_{ST} analyses ($P < 0.0001$). Genetic population structure within *H. asinina* was observed between the Philippines and the remaining samples except for HACAMHE ($P < 0.0021$). A lack of population differentiation was found in small sample sizes of *H. varia* ($P = 0.7710$).

Huang et al. (2000) investigated population differentiation of the blacklip abalone (*H. rubra*) using RAPD-PCR (UBC101, UBC135, UBC149, UBC159, UBC169, and M13), minisatellites (GHR and MIPR), and microsatellites (RBUGT1, RUBCA1, and RUBGACA1). All types of DNA markers revealed intraspecific genetic differentiation in that species relating to relatively short larval stages and limited dispersion of abalone.

Disregarding the Philippines sample, a panmictic gene pool was found in *H. asinina*. Therefore, establishment of the appropriate propagated stock of *H. asinina* in our

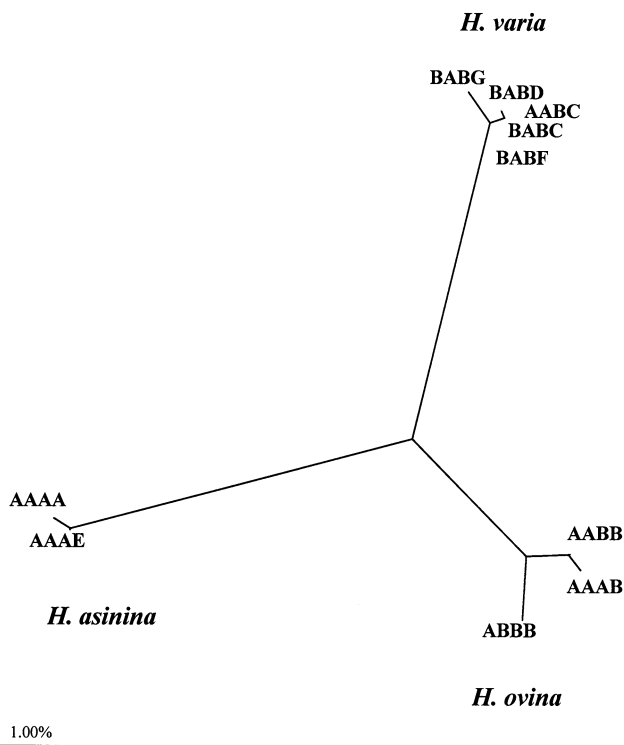


Figure 5. A neighbor-joining tree indicating relationships between abalone possessing different 16S rDNA composite haplotypes based on pairs of nucleotide sequence divergence.

hatchery does not require samples from several geographic locations. Conversely, strong differentiation between *H. ovina* from different coastal regions suggested that these populations should be treated as separate management units.

Hybridization between 2 species of abalone (*H. rubra* and *H. laevigata*) and gene introgression into a gene pool of the other was reported using allozyme analysis (Brown, 1995). There was no evidence of interspecific hybridization of abalone in this study. PCR-RFLP of 16S rDNA suggested a lack of bidirectional interspecific hybridization due to complete disassociation of mtDNA composite haplotypes between *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*. Nevertheless, the possibility of unidirectional hybridization between females of *H. asinina*, *H. ovina*, or *H. varia* with males of different species could not be completely eliminated because this circumstance cannot be examined using mtDNA markers. The 18S rDNA polymorphism based on PCR-RFLP was not suitable for species discrimination in abalone. Therefore, additional nuclear DNA markers should be used for further analysis.

Previously, molecular evolution and systematics of 27 abalone species were examined using cDNA sequences of the lysin gene. Phylogenetic relationships indicated that *H. ovina* and *H. varia* were sister taxa. However, *H. asinina*

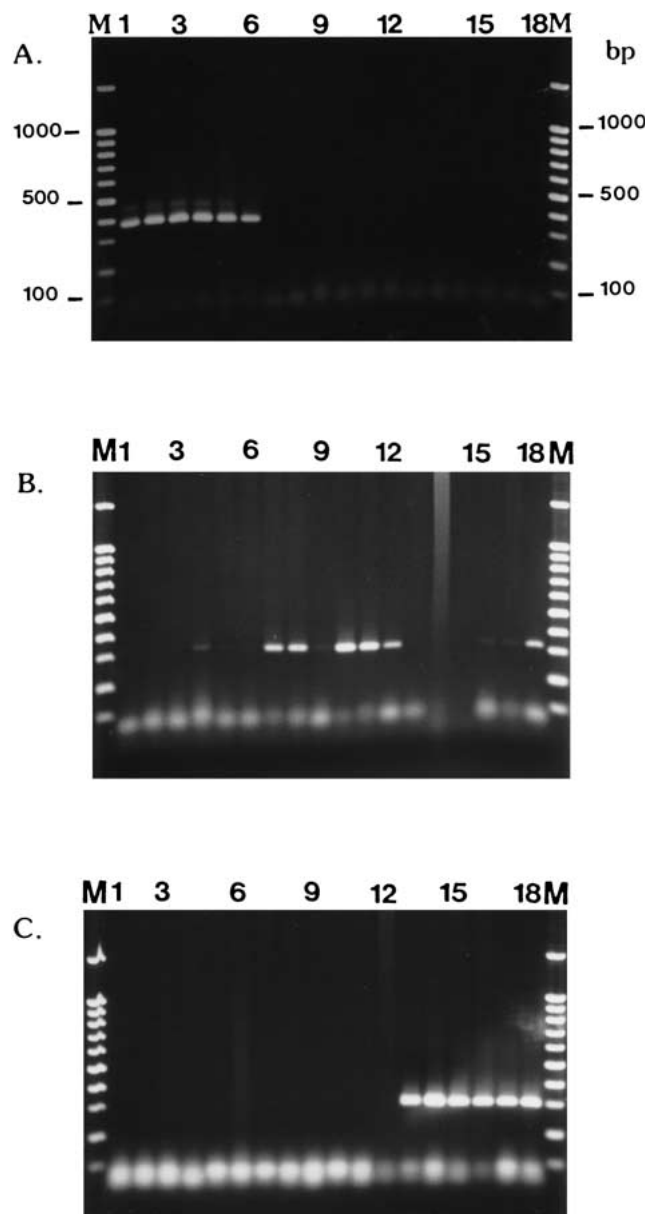


Figure 6. Agarose gel electrophoresis showing species-specific PCR of *H. asinina* (lanes 1–6), *H. ovina* (lanes 7–12), and *H. varia* (lanes 13–18) using primers 16S_{F1} + 16S_{RHA} (A) 16S_{F1} + 16S_{RHO} (B), and 16S_{F1} + 16S_{RHV} (C). A 100-bp DNA ladder (lanes M) was used as the DNA marker.

was not included in that study (Lee and Vacquier, 1995). The topology of UPGMA dendrograms between composite haplotypes, geographically different samples (data not shown), and species (data not shown), based on PCR-RFLP of 18S and 16S rDNAs and a neighbor-joining tree from 16S DNA sequences, indicated that *H. asinina* and *H. ovina* are genetically closer than *H. varia*. Results were contradictory to those from a karyotyping study of chromosomes of these 3 abalone in Thailand (Jarayabhand et al., 1998), in

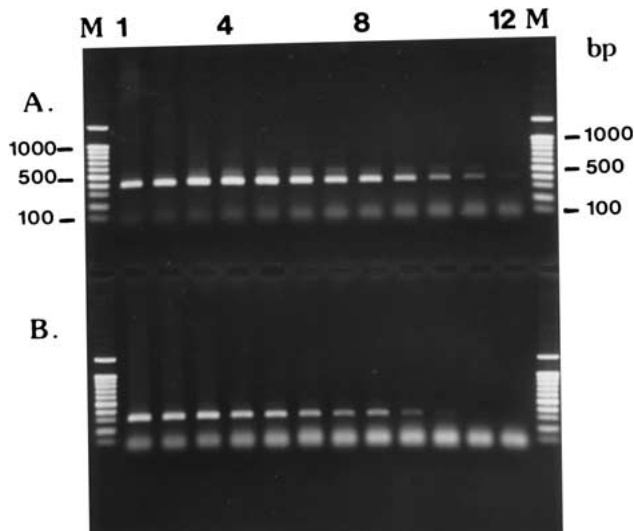


Figure 7. Sensitivity of $16S_{F1} + 16S_{RHA}$ of (A) and $16S_{F1} + 16S_{RHV}$ of (B) primers was examined against 2-fold dilutions of *H. asinina* and *H. varia* DNA template (25, 12.5, 6.25, 3.125, and 1.56 ng; 781.25, 390.625, 195.31, 97.65, 48.82, 24.41, and 12.21 pg, corresponding to lanes 1–12, respectively). Ten microliters of the PCR product was electrophoresed through 1.0% agarose gels and stained with ethidium bromide. A 100-bp DNA ladder (lanes M) was used as a marker.

which *H. asinina* and *H. varia* were regarded as more closely related species. Nevertheless, a parallel study based on RAPD analysis confirms interspecific genetic relationships of Thai abalone based on PCR-RFLP (A. Pongviwat, personal communication).

Restriction analysis of mtDNA has been successfully used to estimate levels of genetic diversity or to identify population differentiation in several commercially important marine species in Thailand including cupped oysters, *C. belcheri*, *C. iredalei*, *S. cucullata*, *S. forskali*, and *S. mytiloides* (Klinbunga et al., 2002), and the black tiger prawn *P. monodon* (Klinbunga et al., 2001). The ability to identify species origins of Thai abalone is crucial for the construction of broodstock management and conservation programs in these taxa. These molecular markers could also be included for estimating heritability and for comparisons of growth performance among 3 abalone species in communal settings, to establish an effective selective breeding program for abalone in Thailand.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technol-

ogy Development Agency (NSTDA), and Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for providing facilities required by our experiments. This work is supported by the Thailand Research Funds (TRF) project 4320015 awarded to S.K. and A.T. and by the JSPS to S.K.

REFERENCES

- Awise, J.C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution.*, San Francisco, Calif.: Chapman and Hall.
- Brown, L.D. (1995). Genetic evidence for hybridisation between *Haliotis rubra* and *H. laevigata*. *Mar Biol* 123:89–93.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127–6145.
- Felsenstein, J. (1993). *PHYLIP (Phylogenetic Inference Package) Version 3.5c.*, London, U.K.: Department of Genetics, University of Washington.
- Geiger, D.L. (1998). Recent genera and species of the family Haliotidae Rafinesque, 1815 (Gastropoda: Vetigastropoda). *Nautilus* 111:85–116.
- Hamm, D.E., and Burton, R.S. (2000). Population genetics of black abalone, *Haliotis cracheradii*, along the central California coast. *J Exp Mar Biol Ecol* 254:235–247.
- Heath, D.D., Iwama, O.K., and Delvin, R.H. (1993). PCR primed with VNTR core sequences yields species-specific patterns and hypervariable probes. *Nucleic Acids Res* 21:5782–5785.
- Huang, B.X., Peakall, R., and Hanna, P.J. (2000). Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Mar Biol* 136:207–216.
- Jarayabhand, P., and Paphavasit, N. (1996). A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture* 140:159–168.
- Jarayabhand, P., Yom-La, R., and Pongviwat, A. (1998). Karyotypes of marine molluscs in the family Haliotidae found in Thailand. *J Shellfish Res* 17:761–764.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Biol* 16:111–120.
- Klinbunga, S., Sodsuk, S., Penman, D., and McAndrew, B.J. (1996). An improved protocol for total DNA isolation and visu-

- alization of mtDNA RFLP(s) in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Thai J Aquat Sci* 3:36–41.
- Klinbunga, S., Boonyapakdee, A., and Pratoomchat, B. (2000). Genetic diversity and species-diagnostic markers of mud crabs (genus *Scylla*) in eastern Thailand determined by RAPD analysis. *Mar Biotechnol* 2:180–187.
- Klinbunga, S., Siludjai, D., Wudthijinda, W., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P., and Menasaveta, P. (2001). Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mitochondrial DNA RFLP analyses. *Mar Biotechnol* 3:428–438.
- Klinbunga, S., Khamnamtong, N., Tassanakajon, A., Puanglarp, N., Jarayabhand, P., and Yoosukh, W. (2002). Molecular genetic identification tools for three commercially cultured oysters (*Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, and *Saccostrea cucullata*) in Thailand. *Mar Biotechnol* 5:27–36.
- Lee, Y.H., and Vacquier, V.D. (1995). Evolution and systematics in Haliotidae (Mollusca: Gastropoda): inferences from DNA sequences of sperm lysin. *Mar Biol* 124:267–278.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, San Francisco, Calif.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- McElroy, D., Moran, P., Bermingham, E., and Kornfield, I. (1991). REAP; The Restriction Enzyme Analyses Package, Version 4.0.
- Muchmore, A.E., Moy, G.W., Swanson, W.J., and Vacquier, V.D. (1998). Direct sequencing of genomic DNA for characterization of a satellite DNA in five species of Eastern Pacific abalone. *Mol Mar Biol Biotechnol* 7:1–6.
- Naganuma, T., Hisadome, K., Shiraiishi, K., and Kojima, H. (1998). Molecular distinction of two resemblant abalones, *Haliotis discus discus* and *Haliotis discus hannai* by 18S rDNA sequences. *J Mar Biotechnol* 6:59–61.
- Nateewathana, A., and Bussarawit, S. (1988). Abundance and distribution of abalones along the Andaman Sea coast of Thailand. *Kasetsart J (Natural Sci)* 22:8–15.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*, Cold Spring Harbor, N.Y.: Columbia University Press.
- Nei, M., and Li, W. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5269–5273.
- Nei, M., and Tajima, F. (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97:145–163.
- Palumbi, S.R., Martin, A., Pomano, S., McMillan, W.O., and Grabowski, G. (1991). *The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2*, New York, N.Y.: Zoology Department.
- Raymond, M., and Rousset, F. (1995). GENEPOP (Version 1.2): population genetic software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:248–249.
- Rice, W.R. (1989). Analyzing tables for statistical tests. *Evolution* 41:223–225.
- Roff, D.A., and Bentzen, P. (1989). The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problems of small samples. *Mol Biol Evol* 6:539–545.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425.
- Shepherd, S.A., Lowe, D., and Partington, D. (1992). Studies of southern Australian abalone (genus *Haliotis*), 13: larval dispersal and recruitment. *J Exp Mar Biol Ecol* 164:247–260.
- Singhgraiwan, T., and Doi, M. (1993). *Seed production and culture of a tropical abalone, Haliotis asinina Linne'*, University of Hawaii.: Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Small, M.P., and Chapman, R.W. (1997). Intraspecific variation in the 16S ribosomal gene of *Crassostrea virginica*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 6:189–196.
- Sneath, P.H.A., and Sokal, R.R. (1973). *Numerical Taxonomy*, Thailand.: W.H. Freeman and Co.
- Sweijd, N.A., Bowie, R.C.K., Lopata, A.L., Marinaki, A.M., Harley, E., and Cook, P.A. (1998). A PCR technique for forensic, species-level identification of abalone tissue. *J Shellfish Res* 17:889–895.
- Thompson, J.D., Higgin, D.G., and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, position-specific penalties and weight metric choices. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680.
- Tookwinas, S., Leknim, V., Donyadol, Y., Predalampabut, Y., and Paengmark, P. (1986). A survey of species and distribution of abalone (*Haliotis* spp) in Surat Thani, Nakhon Si Thammarat and Songkla. Technical Report No. 1/1986, NICA.

Population Genetics and Special-Specific Markers of Tropical Abalone (*Haliotis asinina*) in Thailand

Sirawut Klinbunga,¹ Piti Amparyup,² Supaporn Thamrungratnakit,² Anchalee Tassanakajon,³ Ikuo Hirono,⁵ Takashi Aoki,⁵ Padermsak Jarayabhand,^{4,6} and Piamsak Menasveta^{1,4}

¹Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

²Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁴Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁵Laboratory of Genome Science, Graduate School of Marine Science and Technology,

Tokyo University of Marine Science and Technology, Kanari 4-5-7, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan

⁶Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Abstract: Genetic diversity and population differentiation of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) were analyzed by restriction analysis of 16S and 18S ribosomal DNAs and randomly amplified polymorphic DNA with polymerase chain reaction (RAPD-PCR). Using restriction analysis we observed a lack of population differentiation between natural *H. asinina* samples in coastal Thai waters ($P > 0.0083$). Conversely, RAPD analysis using primers OPB11, UBC101, UBC195, UBC197, and UBC271 illustrated significant differentiation between natural *H. asinina* from the Andaman Sea (HATRAW) and the Gulf of Thailand (HASAME and HACAME) ($P < 0.0001$). In addition, species-specific markers were found from both analyses. Species-specific PCR for identification of *H. asinina* was further developed and tested against a large number of target and nontarget (*H. ovina* and *H. varia*) species. Results indicated successful development of reproducible species-diagnostic markers for *H. asinina*.

Keywords: abalone, species-specific markers, RAPD-PCR, SCARs.

INTRODUCTION

Three species of tropical abalone, *Haliotis asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*, are found in Thai waters. Both *H. asinina* and

H. ovina are distributed along the east coast of the upper Gulf of Thailand, and all 3 species occur in the Andaman Sea (Jarayabhand and Paphavasit, 1996). Among the abalone *H. asinina* provides the highest percentage of muscle weight (85%) relative to total weight, compared approximately 40% and 30% for *H. ovina* and *H. varia*, respectively (Singhagruiwan and Doi, 1993).

Appropriate genetic markers can be used to increase the efficiency of culture and management of abalone

These data were presented at the Marine Biotechnology Conference 2003 in Chiba, Japan, September 21–27.

Corresponding author: Sirawut Klinbunga; e-mail: sirawut@biotec.or.th



Figure 2. Agarose gel electrophoresis illustrating species specificity of CUHA13 testing against genomic DNA of *H. asinina* (A top, lanes 1–8), *H. ovina* (B bottom, lanes 1–9), and *H. varia* (B bottom, lanes 10–18). A 100-bp ladder (lane M) was used as a DNA marker.

N = 8; HASAMHE, *N* = 40; HATRAW, *N* = 24; and HAPHIE, *N* = 24), 83 individuals of *H. ovina* (Chonburi, *N* = 24, and Samet Island, *N* = 24; located in the Gulf of Thailand; and Trang, *N* = 20, and Similan Island, *N* = 15, located in the Andaman Sea), and 32 individuals of *H. varia* (Phuket, *N* = 29, and Similan Island, *N* = 3, located in the Andaman Sea). The expected amplification product was only observed in *H. asinina* (100%) (Figure 2). Therefore a species-specific RAPD-derived marker was also successfully developed in *H. asinina*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Thailand Research Funds (TRF) project 4320015 awarded to S.K. and A.T. and partially supported by the JSPS. Student grants are from the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, TRF (P.A.) and the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand (S.T.).

REFERENCES

- Avisé, J.C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. London, U.K: Chapman and Hall.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:612–617.
- Jarayabhand, P., and Paphavasit, N. (1996). A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture* 140:159–168.
- Klinbunga, S., Ampayup, P., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P., and Yoosukh, W. (2001). Genetic diversity and molecular markers of commercial oysters (genera *Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striosstrea*) in Thailand determined by RAPD analysis. *Mar Biotechnol* 3:133–144.
- Klinbunga, S., Khamnanong, N., Tassanakajon, A., Puanglarn, N., Jarayabhand, P., and Yoosukh, W. (2003). Molecular genetic identification tools for three commercially cultured oyster (*Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iridulei*, and *Saccostrea cucullata*) in Thailand. *Mar Biotechnol* 5:27–36.
- Lynch, M. (1990). The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol Biol Evol* 7:478–484.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- McElroy, D., Moran, P., Birmingham, E., and Kornfield, I. (1991). REAP: The Restriction Enzyme Analysis Package, Version 4.0. *Genet* 11:107–112.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, N.Y: Columbia University Press.
- Nei, M., and Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc Acad Sci U S A* 76:5269–5273.
- Raymond, M., and Rousset, F. (1995). GENEPOP (Version 1.2): population Genetic Software for Exact Tests and Ecumenical. *J Hered* 86:248–249.
- Rice, W.R. (1989). Analyzing tables for statistical tests. *Evolution* 41:223–225.
- Roff, D.A., and Bentzen, P. (1989). The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problems of small samples. *Mol Biol Evol* 6:539–545.
- Singhagruiwan, T., and Doi, M. (1993). Seed production and culture of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand.

Table 2. Genetic Heterogeneity Analysis of *H. asinina* Based on PCR-RFLP of 16S rDNA (above diagonal) and 16S and 18S rDNAs (below diagonal)*

	HASAMHW	HASAME	HATRAW	HACAMHE	HACAME	HAPHIE
HACAMHE	—	0.2586 ^{ns}	0.6413 ^{ns}	0.2368 ^{ns}	0.1002 ^{ns}	0.1062 ^{ns}
HACAME	0.0184 ^{ns}	—	0.5681 ^{ns}	1.0000 ^{ns}	1.0000 ^{ns}	1.0000 ^{ns}
HATRAW	0.0087 ^{ns}	0.1371 ^{ns}	—	0.5341 ^{ns}	0.4989 ^{ns}	0.4994 ^{ns}
HACAMHE	0.0106 ^{ns}	0.0086 ^{ns}	0.2670 ^{ns}	—	1.0000 ^{ns}	1.0000 ^{ns}
HACAME	0.0293 ^{ns}	0.5741 ^{ns}	0.0657 ^{ns}	0.0035 ^{ns}	—	1.0000 ^{ns}
HAPHIE	0.0007*	0.0003*	<0.0001*	0.0085 ^{ns}	0.0001*	—

*Significance level was adjusted to $P < 0.0083$ following a sequential Bonferroni method (Rice, 1989). *Significant; ns, not significant.

Table 3. Average Genetic Distance (below diagonal) and Genetic Heterogeneity Analysis (above diagonal) Between Different Samples of *H. asinina* Based on RAPD Analysis

	HASAMHE	HASAME	HACAMHE	HACAME	HATRAW	HAPHIE
HASAMHE	—	$P > 0.0017^{ns}$	$P > 0.0017^{ns}$	$P > 0.0017^{ns}$	$P < 0.0001^*$	$P < 0.0001^*$
HASAME	0.0270	—	$P > 0.0017^{ns}$	$P > 0.0017^{ns}$	$P < 0.0001^*$	$P < 0.0001^*$
HACAMHE	0.0263	0.0317	—	$P > 0.0017^{ns}$	$P < 0.0001^*$	$P < 0.0001^*$
HACAME	0.0156	0.0219	0.0234	—	$P < 0.0001^*$	$P < 0.0001^*$
HATRAW	0.2381	0.2314	0.2096	0.2309	—	$P < 0.0001$
HAPHIE	0.2219	0.2129	0.2236	0.2067	0.1797	—

*Significant; ns, not significant.

Considering the life history, larval development, and dispersing ability of *H. asinina*, contradictory results on patterns of genetic differentiation of natural *H. asinina* based on analysis of mitochondrial DNA (16S rDNA, clonal) and nuclear DNA (RAPD-PCR, reproductively mixed) are likely to have resulted from female founder effects (rather than biased female gene flow) in this species.

Species-Diagnostic Markers of *H. asinina*

The expected 386-bp band generated from 16S_{RHA} and 16S_{RHA} was observed in all *H. asinina* specimens without any false positives in *H. ovina* and *H. varia* (Figure 1). Therefore, a species-diagnostic PCR based on 16S rDNA polymorphism was successfully developed in *H. asinina*.

Ten fixed RAPD markers found in different samples of *H. asinina* (1400 and 800 bp from OPB11; 1700, 1325, and 1000 bp from UBC101; 760 bp from UBC195; 1400 and 1000 bp from UBC197; and 1000 and 650 bp from UBC271) were cloned, and 2 to 5 recombinant clones from each marker were sequenced for both directions. Nineteen different nucleotide sequences were found, indicating that each RAPD



Figure 1. Agarose gel electrophoresis illustrating *H. asinina*-specific PCR (lanes 1–6) using primers 16S_{RHA} and 16S_{RHA}. Negative amplification was observed in *H. ovina* (lanes 7–12) and *H. varia* (lanes 13–18). A 100-bp DNA ladder (lanes M) was used as the DNA marker.

fragment represented comigrating fragments having different nucleotide sequences.

Fifteen pairs of primers were designed (CUHA1–CUHA15) and tested for species specificity. Seven pairs of primers (CUHA1, CUHA2, CUHA4, CUHA11, CUHA12, CUHA13, and CUHA14) were successfully amplified in *H. asinina* but not *H. ovina* and *H. varia*. CUHA13 primers were further examined against 120 individuals of *H. asinina* (HACAME, $N = 16$; HACAMHE, $N = 8$; HASAME,

5'-TGA GGG GAG ATG GAG TAC CCG C-3') were further examined against different samples of *H. asinina* ($N = 120$), *H. ovina* ($N = 83$), and *H. varia* ($N = 32$).

Data Analysis

For restriction analysis haplotype (h) and nucleotide diversity (π) within samples and nucleotide divergence between samples (d_A) were calculated (Nei, 1987) using REAP (McElroy et al., 1991). Genetic heterogeneity between pairs of samples was analyzed using a Monte-Carlo simulation (Roff and Bentzen, 1989) implemented in REAP. F_{ST} statistics were calculated using GENEPOP (Raymond and Rousset, 1995).

Each RAPD fragment is treated as an independent character (0/1). The similarity index within and between samples was calculated (Nei, and Li, 1979). Genetic distance between paired samples was then calculated as $D'_{ij} = 1 - S'_{ij}$ (Lynch, 1990). Genetic heterogeneity and F_{ST} statistics between pairs of samples were analyzed using TFPGA (available at <http://www.public.asu.edu/~mmilic8/TFPGA.htm>).

RESULTS AND DISCUSSION

Genetic Diversity and Population Differentiation of *H. asinina* Based on 16S and 18S rDNA Polymorphism

Only one restriction pattern was observed from digestion of 16S rDNA of *H. asinina* with *Bam*HI, *Eco*RI, and *Hae*III, but these restriction enzymes were polymorphic when *H. ovina* and *H. varia* were included. Two patterns were found from *Alu*I-digested 16S rDNA of *H. asinina* (A, 175, 140, 95 and 50 bp; and E, 175, 140, 95, 80, and 50 bp). These restriction patterns were not observed in *H. ovina* (pattern B) and *H. varia* (patterns C, D, F, and G) and can be used as species-diagnostic RFLP markers for abalone in coastal Thai waters (data not shown). Digestion of 18S with *Alu*I, *Taq*I, and *Hae*III provided 6, 4, and 2, restriction patterns shared across samples, respectively.

Considering only 16S rDNA polymorphism, 2 mitotypes (AAAA and AAAE) were generated and shared between different conspecific samples of *H. asinina*. Therefore haplotype and nucleotide diversity within each sample were zero except those in HASAMHE (0.271 and 0.1014%) and HATRAW (0.1351 and 0.0497%). Genetic heterogeneity and F_{ST} analyses suggested a lack of intraspecific popula-

Table 1. Haplotype and Nucleotide Diversity Within Samples of *H. asinina* Determined by Restriction Analysis of 16S rDNAs

Sample	Haplotype diversity \pm SE	Nucleotide diversity
HASAME	0.0000 \pm 0.0000	0.0000
HASAMHE	0.7511 \pm 0.0508	0.4910
HACAME	0.3391 \pm 0.0898	0.2014
HACAMHE	0.7816 \pm 0.0518	0.4910
HATRAW	0.7065 \pm 0.0536	0.4910
HAPHIE	0.8359 \pm 0.0288	0.4910

tion differentiation in natural *H. asinina* samples (HACAME, HASAME, and HATRAW; $P > 0.0083$).

A total of 15 composite haplotypes of *H. asinina* were generated when 18S rDNA haplotypes were included in the analysis. Haplotype and nucleotide diversity within samples of *H. asinina* based on 16S and 18S rDNA polymorphisms were 0.0000 to 0.7511 and 0.0000% to 0.4910%, respectively (Table 1). Genetic heterogeneity and F_{ST} analyses did not reveal significant differences between natural samples from the Andaman Sea and those from the Gulf of Thailand ($P > 0.0083$, Table 2). High levels of genetic diversity in hatchery samples of *H. asinina* (HASAMHE, HACAMHE, and HAPHIE) should result from the use of a large number of founders to establish those stocks. In contrast, genetic drift in the natural HASAME geographic sample may have caused a lack of genetic polymorphism.

Genetic Diversity and Population Differentiation of Natural *H. asinina* Based on RAPD Analysis

A total of 113 RAPD fragments (250–2300 bp in length) were generated across all samples. The percentage of polymorphic bands of each primer was comparable (81.25–86.96%) except that of OPA11 (90.48%). Low genetic distance was found between natural samples in the Gulf of Thailand (0.0219), but greater distance was found between those samples and HATRAW (0.2096–0.2314, Table 3). All RAPD primers showed significant heterogeneity between HACAME and HASAME from the Gulf of Thailand and HATRAW from the Andaman Sea ($P < 0.0001$, Table 3) but not within the Gulf of Thailand samples ($P > 0.0083$). This indicated that the gene pool of natural *H. asinina* in Thai waters was reproductively differentiated into the Andaman Sea and the Gulf of Thailand stocks.

land. Sustainable aquaculture of commercially important species requires basic knowledge of the stock structure and use of suitable molecular genetic markers to establish broodstock management program for exploited species (Avisé, 1994). In addition, species-specific markers have important roles in quality control by preventing incorrect use of abalone larvae in the culture industry and to identify abalone species in canning.

The objectives of this study were to evaluate levels of genetic diversity and population differentiation of *H. asinina* using polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) (16S and 18S rDNA) and randomly amplified polymorphic DNA with polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and to develop reproducible species-diagnostic markers of *H. asinina* in coastal Thai waters.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Local abalone *H. asinina* ($N = 111$) were collected from wild populations in Samet Island (HASAME, $N = 12$), Cambodia (HACAME, $N = 21$), and Trang (TRAW, $N = 28$), and from hatchery samples including F_0 stocks (offspring of wild-caught broodstock) established from Samet Island (HASAMHE, $N = 19$) and Cambodia (HACAMHE, $N = 15$) samples and F_1 originating from the Philippines (HAPHIE, $N = 20$). The hatchery stocks of *H. asinina* were established from mass spawning of approximately 100 founders (HASAMHE and HACAMHE) and 200 founders (HAPHIE) of local populations.

DNA Extraction

DNA was extracted from a piece of the foot muscle of abalone using a phenol-chloroform-proteinase K method (Klinbunga et al., 2003). The concentration of extracted DNA was spectrophotometrically estimated. DNA was stored at 4°C until needed.

Cloning of rDNAs, Restriction Enzyme Digestion, and Electrophoresis

For cloning of rDNA, 16S rDNA ($16S_{F1}$, 5'-CGC CTC TTT AAC AAA TTT-3'; and $16S_{R1}$, 5'-CCG GTC TGA AACT CAG ATC ATGT-3') and

18S rDNA ($18S_{F1}$, 5'-TGG ATC CCG GCA AGT CTG GTG CC-3'; and $18S_{R1}$, 5'-TGA AGT CAA GGG CAT CAC AGA CC-3'), of each abalone were amplified according to Klinbunga et al. (2003). The 16S rDNA and gel-eluted 18S rDNA amplification products were restricted with 4 polymorphic enzymes (*Bam*HI, *Eco*RI, *Hae*III, and *Alu*I) and 3 polymorphic enzymes (*Alu*I, *Taq*I, and *Hae*III), respectively, and electrophoresed through 3% Metaphor (*Alu*I-digested 16S rDNA) or 2% agarose gels. The electrophoresed DNA was visualized under a UV transilluminator after ethidium bromide staining (Maniatis et al., 1982).

RAPD-PCR

We screened 113 primers for successful amplification against 2 to 3 individuals of *H. asinina*. Five primers (OPB11, UBC101, UBC195, UBC197, and UBC271) were selected and tested against different samples of *H. asinina* according to Klinbunga et al. (2001).

Cloning and Sequencing of 16S rDNA and RAPD Markers

The 16S rDNA segment amplified from an *H. asinina* individual representing AAAA and AAAB mitotypes and *H. asinina*-specific RAPD fragments was size-fractionated through a 1.5% agarose gel and gel-eluted before being ligated to pGEM-T Easy vector and electrotransformed to *Escherichia coli* XL1-Blue (Dower et al., 1988). Recombinant clones were sequenced for both directions using an automated DNA sequencer (Li-Cor).

Species-Specific PCR Based on 16S rDNA Polymorphism and RAPD-Derived Markers

Nucleotide sequences of 16S rDNA of *H. asinina* were multiply aligned with those of *H. ovina* and *H. varia* (accession numbers AY163250–AY163259). A reverse primer ($16S_{RHA}$, 5'-TAG TGG GTT TGG CTT GCT-3') was designed and tested in combination with the $16S_{F1}$ primer against genomic DNA of target and nontarget species ($N = 75$, 64, and 20 for *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*, respectively).

For RAPD-derived markers, 15 pairs of primers were designed and tested against genomic DNA of the target species ($N = 12$) and nontarget species ($N = 4$) using PCR conditions described by Klinbunga et al. (2003). CUHA13_{FR} primers (F, 5'-TGA CCT GTG TTG AGA CTC TAC GCA-3', and R,

Species Identification of the Tropical Abalone (*Haliotis asinina*, *Haliotis ovina*, and *Haliotis varia*) in Thailand Using RAPD and SCAR Markers

Sirawut Klinbunga^{†,*}, Piti Amparyup[‡], Rungnapa Leelatanawit[‡], Anchalee Tassanakajon[§],
Ikuo Hirono^{||}, Takashi Aoki^{||}, Padermsak Jarayabhand^{#,**} and Piamsak Menasveta^{†,**}

[†]Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120 Thailand

[‡]Program of Biotechnology, [§]Department of Biochemistry,

^{**}Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^{||}Laboratory of Genome Science, Graduate School of Marine Science and Technology,

Tokyo University of Marine Science and Technology, Konan 4-5-7, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan

[#]Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

Received 12 May 2003, Accepted 7 July 2003

A randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to identify the species- and population-specific markers of abalone; *Haliotis asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* in Thai waters. Fifteen species-specific and six population-specific RAPD markers were identified. In addition, an 1650 bp band (UBC195) that was restricted to *H. ovina* from the Gulf of Thailand (east) was also found. All of the specific RAPD markers were cloned and sequenced. Twenty pairs of primers were designed and specificity-tested ($N=12$ and 4 for target and non-target species, respectively). Seven primer pairs (CUHA1, 2, 4, 11, 12, 13, and 14) were specifically amplified by *H. asinina* DNA, whereas a single pair of primers showed specificity with *H. ovina* (CUHO3) and *H. varia* (CUHV1), respectively. Four primer pairs, including CUHA2, CUHA12, CUHO3, and CUHV1, were further examined against 216 individuals of abalone ($N=111$, 73, and 32, respectively). Results indicated the species-specific nature of all of them, except CUHO3, with the sensitivity of detection of 100 pg and 20 pg of the target DNA template for CUHA2 and CUHA12 and CUHV1, respectively. The species-origin of the frozen, ethanol-preserved, dried, and boiled *H. asinina* specimens could also be successfully identified by CUHA2.

Keywords: Abalone, PCR, RAPD, SCARs, Species-specific markers

Introduction

Abalones are economically important archeogastropods that are currently cultured worldwide. There are over 15 species of abalone, which are being farmed and are commercially important (Jarayabhand and Paphavasit, 1996). The total world production of abalone was approximately 13,000 metric tons in 1999, 7,165 tons of which (55%) were produced on farms. The major producers of abalone are China and Taiwan. They annually contribute approximately 75% of the cultured production (Gordon, 2000).

Three species of tropical abalone (*Haliotis asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*) are found in Thai waters (Jarayabhand and Paphavasit, 1996). Both *H. asinina* and *H. ovina* are distributed along the east coast of the upper Gulf of Thailand, and all three species occur in the Andaman Sea (Tookvinas *et al.*, 1986; Nateewatana and Bussarawit, 1988). Among these abalone, *H. asinina*, provides the highest percentage (85%) between the meat weight and total weight when compared to *H. ovina* (40%) and *H. varia* (30%), respectively (Singhagruiwan and Doi, 1993). Accordingly, *H. asinina* is presently being initially commercially cultured in Thailand.

Appropriate genetic markers can be used to elevate the cultural and management efficiency of abalone in Thailand (Jarayabhand *et al.*, 2002). The sustainable success of aquacultural activity of commercially important species requires a basic knowledge on stock structure as well as the use of suitable molecular genetic markers to establish broodstock management programs of exploited species (Avisé, 1994; Calvalho and Hauser, 1994). In addition, species-specific markers play important roles in preventing the supply of incorrect abalone larvae for the industry as well as

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 66-2-2185279; Fax: 66-2-2547680

E-mail: sirawut@biotec.or.th

quality control of abalone from Thailand. These markers are also necessary for the development of monospecific farming of *H. asinina* in Thailand.

Species-specific sequences of lysin were reported in the pink (*H. corrugata*) and red (*H. rufescens*) abalone (Vacquier *et al.*, 1990). Partial sequences of 18S rDNA were also used to differentiate the closely related abalone, *H. discus discus* and *H. discus hannai*. The amplified 18S rDNA was directly sequenced and multiple-aligned with that of *H. madaka*, *H. gigantea*, and a land gastropod (*Limicolaria kambeul*). The inferred 18S rDNA phylogeny indicated that *H. discus discus* and *H. discus hannai* are closely related but distinguishable at the subspecies level (Naganuma *et al.*, 1998). In addition, a tandemly-repeated satellite DNA (290-291 bp in length) was identified by *Sal* I digestion of genomic DNA of five Eastern Pacific (California) abalone species, including the red (*H. rufescens*), white (*H. sorenseni*), flat (*H. walallensis*), pinto (*H. kamschatkana*), and pink (*H. corrugata*) abalone. Sequences of satellite DNA were determined by direct sequencing and revealed species-specificity in these abalone (Muchmore *et al.*, 1998). For identification of the species origins of abalone tissue from South Africa, species-specific PCR was developed to distinguish *H. midae* from *H. spadicea* using a portion of lysin cDNA sequences (Lee and Vacquier, 1995). PCR specifically amplified a 1,300 bp fragment of the genomic DNA from dried, cooked, and fresh *H. midae* tissue. A smaller fragment of the 146 bp product was successfully amplified and used for the identification of canned *H. midae*. Additionally, PCR-RFLP revealed interspecific polymorphism that differentiated these species unambiguously (Sweijd *et al.*, 1998).

Recently, species-diagnostic markers of *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* were developed using PCR-RFLP of 16S rDNA (Jarayabhand *et al.*, 2002). Restriction of the amplified 16S rDNA with *Alu* I could differentiate these abalone unambiguously (patterns A and E in *H. asinina*, $N=115$; B in *H. ovina*, $N=71$ and C, D, F, and G in *H. varia*, $N=23$). Further digestion of 16S rDNA with *Bam* HI, *Eco* RI, and *Hae* III yielded non-overlapping composite haplotypes in these abalones; AAAA and AAAE in *H. asinina*, ABBB, AAAB and AABB in *H. ovina* and BABG, BABC, BABD, BABF and AABG in *H. varia*, respectively. Species-specific PCR, based on 16S rDNA polymorphism, was successfully developed in *H. asinina* and *H. varia* (100% amplification success with no false positive) but not in *H. ovina* (68.75% amplification success with extensive false positives from other species) (Klinbunga *et al.*, 2003).

Interspecific hybridization and gene introgression between *H. rubra* and *H. laevigata* was reported, based on an allozyme analysis (Brown, 1995). Theoretically, hybridization between the male *H. asinina* and/or *H. varia* with females of different species could have eliminated the accuracy of the species identification, based on matriarchally inherited markers like 16S rDNA. As a result, *H. asinina*- and *H. varia*-specific nuclear DNA markers need to be developed.

Randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) is a relatively simple method for the identification of genetic markers at different taxonomic levels, without the need for knowledge of sequences of the genome under investigation (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990; Hadrys *et al.*, 1992). The objective of this study was to develop reproducible species-specific markers of *H. asinina* in Thailand. Candidate species- and population-specific RAPD markers were cloned and sequenced. The primers were designed. Specificity, sensitivity, and stability of the selected markers were examined. The sequence-characterized amplified region (SCAR) markers that offered an accurate discrimination of *H. asinina* from *H. ovina* and *H. varia* were developed.

Materials and Methods

Sampling Specimens of three abalone species [*H. asinina* ($N=111$), *H. ovina* ($N=73$), and *H. varia* ($N=32$)] were collected (Table 1 and Fig. 1) and individually kept at -30°C until required. Alternatively, the foot muscle of each specimen was dissected and kept at -80°C until further use for the DNA extraction.

DNA Extraction The total DNA was extracted from a piece of the foot muscle of each abalone using the phenol-chloroform-proteinase K method (Klinbunga *et al.*, 1996). The concentration of the extracted DNA was spectrophotometrically estimated. The DNA was stored at 4°C until needed.

RAPD-PCR One hundred and thirteen primers that were purchased from Operon Technologies Inc. (Alameda, USA) and the University of British Columbia (Canada) were screened for amplification success against 2-3 representatives of each abalone species (Fritsch *et al.*, 1993). Five primers (OPB11, UBC101, UBC195, UBC197, and UBC271) were tested against different populations of *H. asinina* ($N=5$ per location), *H. ovina* ($N=7-8$ per location), and *H. varia* ($N=15$ and 3 for HVPHUW and HVPHAW).

RAPD-PCR was carried out in a 25 μl reaction volume containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.001% gelatin, 2-3 mM of MgCl_2 , 100 μM of each dNTP, 0.2 μM of a primer, 1 unit of *Ampli*Taq DNA Polymerase (Perkin-Elmer, Cetus, USA), and 25 ng of a DNA template. The amplification was performed in an Omnigene thermal cycler (Hybaid, Middlesex, UK) according to Klinbunga *et al.* (2001). Five microlitres of the amplification reaction were electrophoresed through 1.6% agarose gels and visualized under a UV transilluminator after ethidium bromide staining (Maniatis *et al.*, 1982).

Cloning and sequencing of abalone RAPD markers Twenty-two RAPD fragments, showing population-, region-, or species-specificity for each abalone (Table 2), were gel-eluted using a Prep-A-Gene DNA purification kit (Bio-Rad Ltd, Hercules, USA) and reamplified with the original primer. The target band was eluted and ligated to the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, USA). One-tenth of the volume of each ligation reaction was

Table 1. Sample collection sites and sample sizes of abalone (*H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia*) used in this study

Geographic origin	Abbreviation	Sample size (N)
<i>H. asinina</i>		
Samet Island, Rayong (Gulf of Thailand)	HASAME	10
P ₀ stock, Rayong (Gulf of Thailand)	HARAYE	15
Cambodia (east of peninsular Thailand)	HACAME	20
P ₀ stock, Cambodia (east of peninsular Thailand)	HACAMHE	12
Talibong Island, Trang (Andaman Sea)	HATRAW	23
F ₁ , Philippines	HAPHIE	19
Indonesia	HAINDW	12
<i>H. ovina</i>		
Sichang Island, Chon Buri (Gulf of Thailand)	HOCHOE	20
Samet Island, Rayong (Gulf of Thailand)	HOSAME	19
Churk Island, Trang (Andaman Sea)	HOTRAW	18
Similan Island, Phangnga (Andaman Sea)	HOPHAW	16
<i>H. varia</i>		
L-Island, Phuket (Andaman Sea)	HVPHUW	29
Similan Island, Phangnga (Andaman Sea)	HVPHAW	3
Total (N)		216



Fig. 1. Map of Thailand illustrating sampling collection sites for abalone (*H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia*) used in this study. Dots represent geographic locations (excluding *H. asinina* from Indonesia and Philippines) for which at least one abalone species was sampled. Note that Samet Island (SAM) is located in Rayong (RAY) province.

electrotransformed to *E. coli* XL1-BLUE (Dower *et al.*, 1988). Recombinant clones were selected by the *lacZ* system following standard protocols (Maniatis *et al.*, 1982). DNA sequences of 2-6 clones of each insert were examined from both directions using an automated DNA sequencer (Li-Cor, Lincoln, USA).

Species-specific PCR, sensitivity, and stability tests Twenty pairs of primers were designed using OLIGO 4.0. They were preliminarily tested for specificity against genomic DNA of the target ($N = 12$) and non-target species ($N = 4$) using PCR conditions that are described by Klinbunga *et al.* (2000), except that the annealing temperature was increased to 65°C. Four pairs of primers (CUHA2, CUHA12, CUHO3, and CUHV1) were further examined against larger specimens ($N = 216$, Table 1). The amplification product was electrophoretically analyzed through 1.6% agarose gels.

Sensitivity of the detection was examined against varying concentrations of the target DNA template (10 pg to 25 ng), using the same conditions as were used for the specificity test. The stability of CUHA2 and CUHA12 was tested against the poor genomic DNA template that was extracted from 10 individuals of the ethanol-preserved larvae (approximately 1 mm in size stored at 4°C for 6 mo) and frozen (3 yr at -30°C), dried (80°C for 72 h and kept at room temperature for 2 wk), and boiled (10 min) *H. asinina* broodstock using the Chelex-based method (Walsh *et al.*, 1994).

Results and Discussion

RAPD-PCR has widely been used for population genetic studies as well as the identification of molecular markers for various applications in several organisms (Heipel *et al.*, 1998; Tassanakajon *et al.*, 1998; Klinbunga *et al.*, 2001). An

Table 2. Population-, region-, and species-specific markers of tropical abalone in Thailand (*H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*) revealed by RAPD analysis using primers OPB11, UBC101, UBC195, UBC197, and UBC271

Species/population	Primer	RAPD marker (bp)	Name of Clones	
<i>H. asinina</i>	OPB11	1400	pCUHA14 and pCUHA16	
		800	pCUHA17 and pCUHA18	
	UBC101	1700	pCUHA19	
		1325	pCUHA20	
		590	pCUHA13	
	UBC195	760	pCUHA4, pCUHA21 and pCUHA22	
	UBC197	1400	pCUHA23	
		710	pCUHA1	
	UBC271	1000	pCUHA24	
		650	pCUHA2, pCUHA3, pCUHA5, pCUHA6, pCUHA12 and pCUHA25	
	/HATRAW	UBC195	650	pCUHA10 and pCUHA11
		UBC271	850	pCUHA7 and pCUHA8
	/HAPHIE	UBC195	450	pCUHA9
1000			pCUHA26	
UBC197		680	pCUHA27	
		415	pCUHA15	
<i>H. ovina</i>	OPB11	475	pCUHO1, pCUHO2 and pCUHO3	
	UBC195	950	pCUHO4	
/Gulf of Thailand	UBC195	1650	pCUHO5	
<i>H. varia</i>	OPB11	690	pCUHV4, pCUHV5, pCUHV6 and pCUHV7	
		700	pCUHV1 and pCUHV2	
	UBC195	550	pCUHV3	

analysis of the genetic diversity and population differentiation of *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* using PCR-RFLP of 16S and 18S rDNA (Jarayabhand *et al.*, 2002; Klinbunga *et al.*, 2003) revealed a lack of genetic heterogeneity of *H. asinina* in Thailand ($P > 0.05$). The analysis, however, did indicate significant genetic differences between *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* ($P < 0.0001$). This suggested the possibility of identifying a large number of species-specific markers in *H. asinina*.

Among the 113 RAPD primers that were screened, 27 primers (OPA1, 2, 10, 15, 10, and 20, OPB11, 16, and 17, UBC101, 119, 160, 168, 174, 193, 195, 197, 200, 210, 220, 264, 267, 271, 272, 456, 457, and 459) yielded successful amplification results in three abalone. Five primers (OPB11, GTAGACCCGT; UBC101, GCGCCTGGAG; UBC195, GATCTCAGCG; UBC197, TCCCCGTTCC and UBC271, GCCATCAAGA) were selected for the identification of candidate species-specific (or population-specific) markers of each abalone.

In total, the 10, 2, and 3 fixed RAPD markers were found in *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* (Table 2 and Fig. 2). Three candidate population-specific RAPD markers were observed in *H. asinina* that originated from Talibong Island (HATRAW) and the Philippines (HAPHIE), respectively. In addition, an 1,650 bp RAPD marker that was generated from UBC195 was specifically found in *H. ovina*, originating from the Gulf

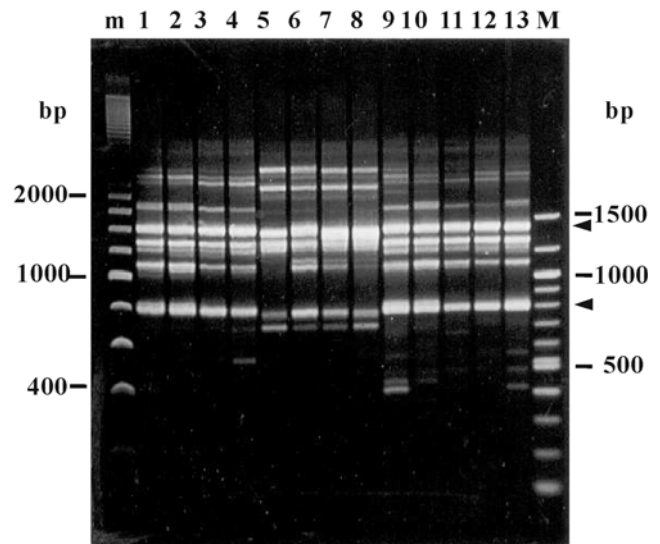


Fig. 2. An example of species-specific RAPD markers resulted from amplification of total DNA of *H. asinina* from HARAYE (lanes 1-4), HATRAW (lanes 5-8) and HACAMHE (lanes 9-13) with OPB11. Arrowheads indicate species-specific RAPD bands found in *H. asinina*. Lanes M and m are 100 bp and 200 bp DNA markers, respectively.

of Thailand (east), but not in the Andaman Sea sample (west). RAPD-PCR is sensitive to reaction conditions, including

Table 3. Sequences of primers designed from population-specific (CUHA11) and species-specific RAPD markers of *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*

Primer	Sequence
CUHA1	F: 5'-GAATCCAACATGCGTCAAAG-3' R: 5'-CTGGAAACAATCGCAGGTCA-3'
CUHA2	F: 5'-TTGTTTCAGCATTCTGTGGCAGTTCT-3' R: 5'-CTTCTTTTTTGCTGACCCTTTGGAG-3'
CUHA4	F: 5'-TCAGCGAAACCAACCAACAC-3' R: 5'-TTGGACGCAGCTATTCACAT-3'
CUHA11	F: 5'-CCCCGAGGAGTATACAACCTTTCC-3' R: 5'-TCGAGTTCTTTCCACAATGCACC-3'
CUHA12	F: 5'-CTAATCCCACACAGCCATCACCAG-3' R: 5'-AAGAAGTGACGAAGAGGTAGGCAG-3'
CUHA13	F: 5'-TGACCTGTGTTGAGACTCTACGGA-3' R: 5'-TGAGGGGAGATGGAGTAGCCGC-3'
CUHA14	F: 5'-CGTGAAGACAGTTACTGAAAGTGG-3' R: 5'-ATCGTTTGTGTTATGTCTCCTCTG-3'
CUHO3	F: 5'-GGGTATCTTCCCACAACAGC-3' R: 5'-GCACTTGCTTACATCCTTTCCAC-3'
CUHV1	F: 5'-CCCCTTGTTTCTCCTTCTTG-3' R: 5'-CGATGACGCAGGCGGTTTGA-3'

Table 4. Specificity of SCAR markers developed from population-specific or species-specific RAPD markers of *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*

Primer	Expected product (bp)	<i>H. asinina</i>				<i>H. ovina</i>	<i>H. varia</i>
		HACAMHE	HACAME	HATRAW	HAPHIE		
CUHA1-F/R	292	+	+	+	+	-	-
CUHA2-F/R*	168	+	+	+	+	-	-
CUHA3-F/R ^a	368	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CUHA4-F/R	290	+	+	+	+	-	-
CUHA5-F/R	264	+	+	+	+	+	+
CUHA6-F/R	103	+	+	+	+	+	+
CUHA7-F/R ^a	554	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CUHA8-F/R ^a	114	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CUHA9-F/R ^a	142	+	+	+	+	+	+
CUHA10-F/R ^a	472	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CUHA11-F/R ^a	417	+	+	+	+	-	-
CUHA12-F/R*	312	+	+	+	+	-	-
CUHA13-F/R	296	+	+	+	+	-	-
CUHA14-F/R	473	+	+	a 515 bp band	a 515 bp band	-	-
CUHA15-F/R ^b	171	+	+	+	+	+	+
CUHO1-F/R	414	+	+	+	+	+	+
CUHO2-F/R	146	+	+	-	-	+ and a 215 bp band	-
CUHO3-F/R*	328	-	-	-	-	+	-
CUHO4-F/R	619	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CUHV1-F/R*	229	-	-	-	-	-	+

Abbreviations: +, successful amplification with the expected product; -, no amplification product; NS, non-specific fragments obtained; *, primers further tested against a large sample size ($N=216$); ^a, primers derived from HATRAW-specific RAPD markers; ^b, primers derived from a HAPHIE-specific RAPD marker.

(A)

GCCATCAAGA TGTGACATGT TCATGGGCAA CTAAAATGGA TTGAAAAAAC
 GTTACAAGTA TTTCACAAAC CTTTCCCTTT ATATATTTAT CCTGAATTAA
 ATTGAACTCT GCTGAAAAGT GGCATATCAT TAATCAAAAAT ATAGACTGGT
 CAAACGTAAT GACTTCTTCA TGAATAAATA TAACTGAAGA TCAATGAACA
 AGGTAAATAT TGCTGTAAAC AATAAACAGG CACATGTTTC AAAACAATTC
 CACACAAAGG TAACTTTTGC TATTTGGTTA TGTAAACAAG CTGCAGAGCC
 CTCTTATGAA AGTTCACCTC CCAATGACTT CATTTATCAG TAATGTGTGA

pCUHA2 - F

TCATATCCAG GATGCTTGGT **CAGCATTCTG** **TGGCAGTTCT** TGACAACCTG
 ATTTCACTAC TGAATGAACA AGAAAGACTG ACAATTTTGT TCCATGTTGC
 CCCAAGTTA TTCTTGACAG ATGTAGATTC TGCATTAGTG ACAAAGATTT

pCUHA2 - R

TTATATATCT **CCAAAGGGTC** **AGCAAAAAG** **AAGTACAGTA** TACCCTGGTG
 ATATCTTCCA CTGTTTGTCA GAGGGAACAT ATGGTACTGT ATCCAGACAC
 ACGTTATAAC CAGGGTGCAC TGTACATGCC CACATGGAAG CATGAATCAT
 GACAGTCAAT ACCATAACTG TATTTAATTT ACAAAAAAAA ATATATATGA
 TCTTGATGGC

(B)

GCCATCAAGA ATAAGCGTTA TGAAAACACT AACTCAAATC AGCCAAATAA
 TCCCACCTAGT GATATCCTCT TTGGACTGAA GTTGTTTGTGTT TTAAGAGTAA

pCUHA12 - F

GAGGATTATA AGGCATGCTC AACTGGGTTT GGTCTGTTAA **CTAATCCCAC**
ACAGCCATCA **CCAGCAGAGG** GAATGATTTA CACATCTCAT TTTTTGTGCT
 TAATTATTGT GTTTGTTTTT TATTGAAAAA AAAATGAAAT GGGAGTGTGA
 ACAGCTTTAC AGTTTATATC GACACTGGTA CCATACAACA TACAATACAA
 AATTTAAATG CAGCATGTGT TGTCACATAT GTATATAAAT TTGAATTACA
 AACATGGGTA AAGCTTGAAG ACAATCTTAT ATGGAATAG TGAATTATCT

pCUHA12 - R

GATCTTGATA ATCTGTCCAT CTTAAGATCT **GCCTACCTCT** **TGCTCACTTC**
TTCTTTTTAGA TTTGATACTA AACATGATTG **AAGAATTAAC** CTCGTGGTTT
 GTCATATGAC AATCTTGAT TAGAACTAGG TTAGGTTTAT TTACCTTTGT
 AAAGTGCAAT ACACACATAC AAACCTAAGT TATTAATATA GAGCATTAT
 GAGAAATGGTA TTGGTAAGAN AATTATTTTT GGTGTCTTGA TGGC

(C)

GATCTCAGCG CATAcataAAT CATATTCATT ACAAAGGATA TAACACCAGA
 AATGTCGCGC CATAATTCTT ATGACATACA GAAACCGGGG TAATTTTATC
 GGCATCGCTG CTATATAAAT TCCCCTCCTG AAACCTAATAG AATTTCTTAA

pCUHV1 - F

TTGGGGTGT CATGGTAGGT TCTTGCCTA **ACCCCTTGGT** **TCTCCTTCTT**
GTCGACATGA AAAGACCACT TTATCAAATA TTTCATCCTC ACTTCATTCA
 CAATAATCTC TTGATGAGCC CAACATTCGT CTGAAACATC CGCACGAGGC
 ACCGGGAACC ACCAGGCTGT TGGCAACTTA TTCAAAGTCT CTCTCTTCA
 CCCACAGAGA TTTTTTCACA ATACCAACAA ACAATATCCA **TCAAACCGCC**

pCUHA1 - R

TGCGTCACTG TTTGTAATCA AGCCTCAATC GAACTTCGCC AGTGCATAT
 GGACGTGCTT CGACGGT CGG CTGCAAACCT TTGCAACAAA ACCACCGATT
 CTAGAAAGTT CGTTCATTGC ATTCCCCCGA CAACTGCTAT TATAAACAT
 TTAGTTAGTG TAATTGTAAC TGGTCTATCT CGAGTCTTCG TCTTCATTAC
 GGATAAATTAG CCCGTCGCTG AGGGGGGcAC TTTCTACGCT CATCCATCCC
 GCTGAGATC

Fig. 3. Sequences of CUHA2 (A), CUHA12 (B) and CUHV1 (C). The locations and sequences of *H. asinina*- and *H. varia*-specific forward primers and those complementary to reverse primers are labeled in boldface and underlined.

the requirement of a good quality DNA template for consistent results. False negatives may possibly occur. We then converted the candidate species-specific (and population-specific) RAPD fragments to sequence-characterized

amplified region (SCAR) markers (Weising *et al.*, 1995).

Twenty-two RAPD fragments were cloned (Table 2). Seventy-two clones were sequenced. Thirty-nine different sequences were found. These indicated that the RAPD

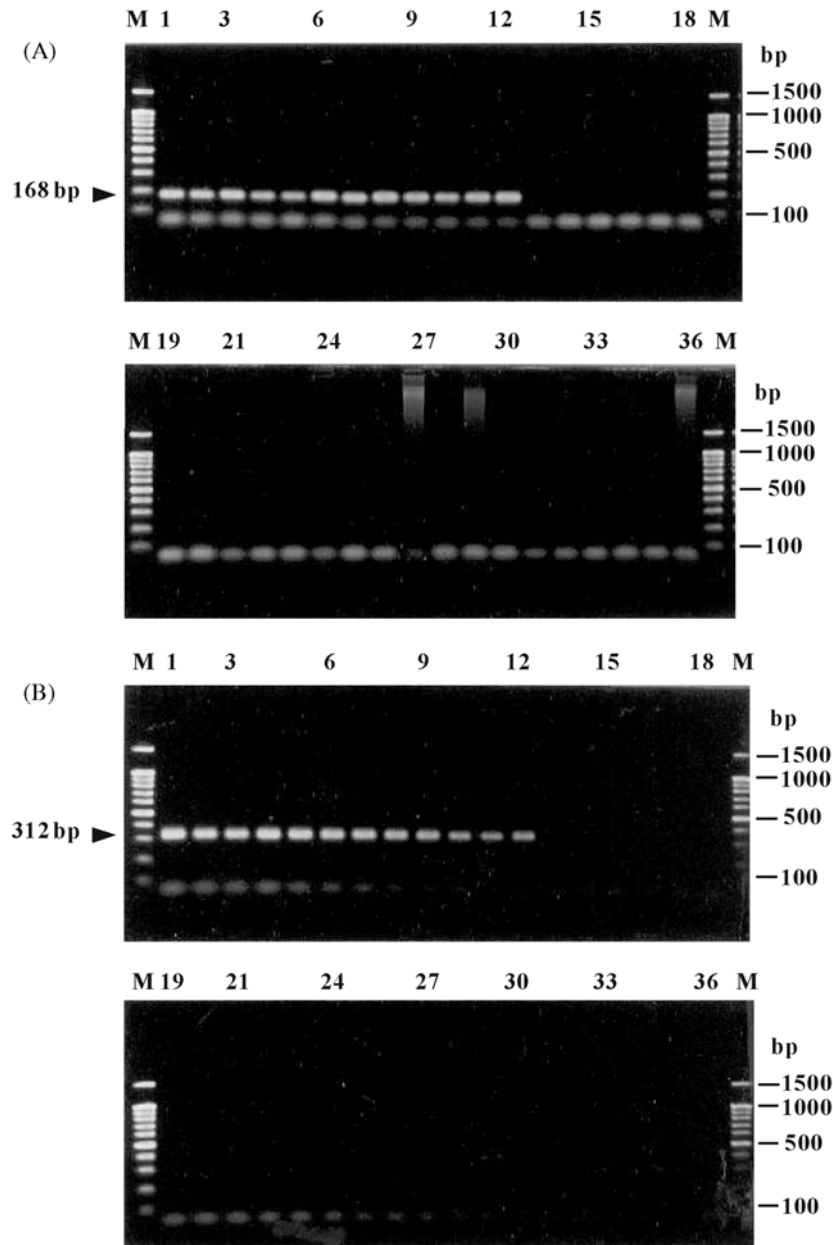


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis illustrating species-specificity of CUHA2 (A), CUHA12 (B) and CUHV1 (C) against genomic DNA of *H. asinina* (panels A, B and C, lanes 1-12), *H. ovina* (panels A, B and C, lane 13-24), and *H. varia* (panels A, B and C, lanes 25-36). An 100 bp ladder (lanes M) was used as a DNA marker.

fragments represented co-migrating fragments that had different nucleotide sequences but similar sizes. Almost all of the RAPD markers (33/39 accounting for 85%) were unknown sequences when compared with the data in the GenBank using BlastN and BlastX (E values $>10^{-4}$).

Twenty pairs of primers were designed from those unknown sequences (pCUHA1-pCUHA15, pCUHO1-pCUHO4 and pCUHV1; Table 2). Originally, seven primer sets were designed for the development of population-specific markers in *H. asinina*. Four of these (CUHA3, CUHA7, CUHA8, and CUHA10) provided non-specific amplification

results; CUHA9 and CUHA15 provided positive amplification in all of the abalone species and CUHA11 yielded a *H. asinina*-specific rather than a HATRAW-specific nature (Table 3). Therefore, population-specific SCAR markers were not found in *H. asinina* (Table 4).

In addition, the CUHA5, CUHA6 and CUHO1 primers also showed positive amplification bands in all three abalone species. We further tested the specificity of CUHA5 (264 bp) and CUHA6 (103 bp) against gastropods (the giant African snail, *Achatina fulica*, and the apple snails, *Pomacea canaliculata*, *Pila ampullacea*, *P. angelica*, *P. pesmei*, and *P.*

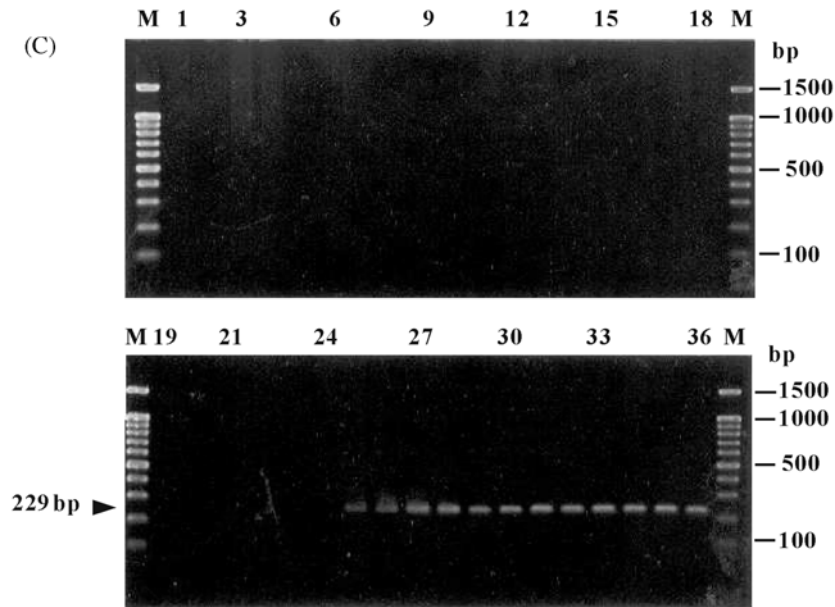


Fig. 4. Continued.

polita), oysters (*Crassostrea belcheri*, *C. iredalei*, *Saccostrea cucullata*, *S. forskali*, and *Striostrea mytiloides*), mussel (*Perna viridis*), and crustaceans (the black tiger prawn, *Penaeus monodon* and the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*) (data not shown). These primers provided no positive amplification fragments in the non-abalone species and may be used as genus-diagnostic markers of abalone in this study.

Based on the preliminary screening, seven pairs of primers (CUHA1, CUHA2, CUHA4, CUHA11, CUHA12, CUHA13, and CUHA14) revealed species-specificity in *H. asinina*, while the CUHO3 and CUHV1 primers exhibited the expected product in *H. ovina* and *H. varia*, respectively (Tables 3 and 4). We did not select CUHA14 for the analysis against larger specimens of *H. asinina* because different sizes of the amplification products were observed (expected 473 bp in HACAMHE and HACAME and a larger 515 bp in HATRAW and HAPHIE, respectively).

Four sets of primers (CUHA2, CUHA12, CUHO3, and CUHV1, Fig. 3) were further examined against a large sample size of abalone ($N=216$, Table 1). Species-specificity was observed from CUHA2, CUHA12, and CUHV1 (100% without false positive/negative results, Fig. 4). Although CUHO3 yielded a strong amplification product in the target species (100%), a very faint product was also observed in some individuals of *H. asinina* and *H. varia*, which suggests that problems may arise from the non-specific amplification of this primer pair (data not shown). No heterozygotes that exhibited two different sizes (alleles) of the amplification products were observed across the overall specimens that were analyzed by these primers. This implies the retention of a dominant segregated fashion of the original RAPD markers.

A limited sample size of *H. varia* was included in this study

($N=29$ and 3 for HVPHAW and HVPHUW, respectively). This was due to a lack of *H. varia* that was found in our sampling sites. Accordingly, a *H. varia*-specific SCAR marker (229 bp from CUHV1) should be further tested against specimens that cover a larger geographic distribution of *H. varia* before practical implementation of this marker for the species-identification purpose.

The sensitivity of CUHA2, CUHA12, and CUHV1 was tested using different concentrations of the target DNA template (10 pg-25 ng). These primer pairs revealed a good correlation between the amount of DNA template and intensity of the PCR product. The detection sensitivity was approximately 100 pg of the target DNA template for CUHA2 and CUHA12, but there was a greater sensitivity with CUHV1 (20 pg). The sensitivity levels of the species-specific PCR that was developed in this study were sufficient for the identification of the species-origins of abalone, beginning with the early development stages.

For rapid species-identification of *H. asinina*, the tedious and time-consuming phenol/chloroform extraction method was simplified to a rapid 5% Chelex-based method. The positive fragment (168 bp) of CUHA2 was still consistently obtained from frozen, ethanol-preserved, dried and boiled specimens of *H. asinina*. All but a single dried specimen was successfully amplified by CUHA12 (Fig. 5).

In the present study, we demonstrate the successful development of species-specific SCAR markers in *H. asinina* and *H. varia*. These markers can be used to verify species-origins of various forms of abalone products from Thailand and prevent supplying incorrect abalone larvae for the culture industry. In the future, a large number of the remaining clones, possessing *H. asinina*-specific RAPD inserts, guarantee that additional SCAR markers could be developed if diagnostic

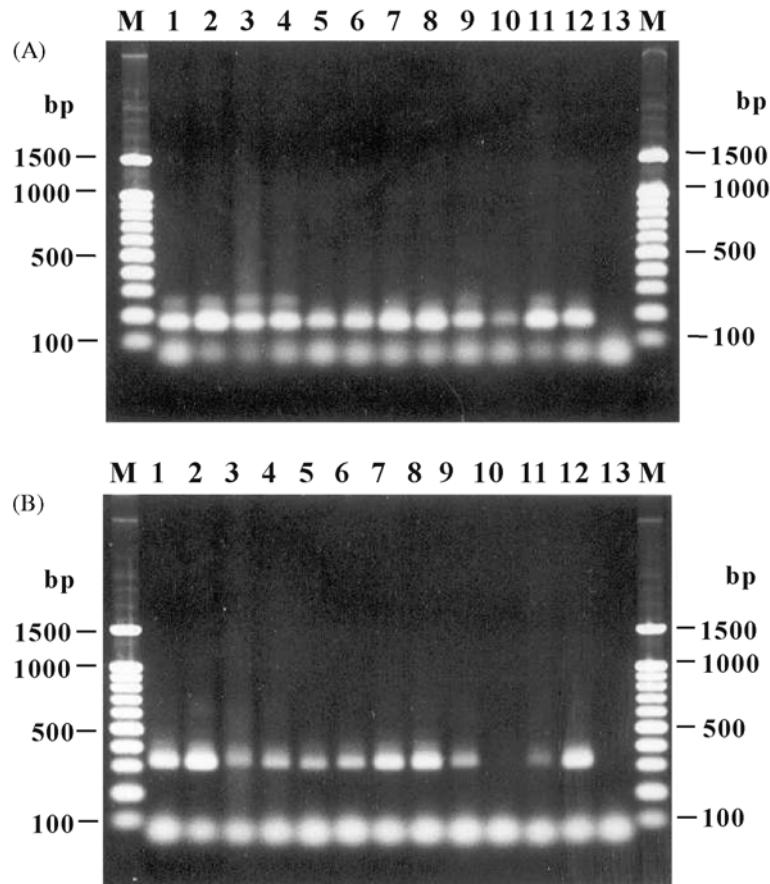


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis showing results from amplification of total DNA extracted with a phenol/chloroform (lanes 1-2) and a 5% Chelex extraction methods (lanes 3-12) of frozen (lanes 1-4), ethanol-preserved larvae (lanes 5-8), dried (lanes 9-10) and boiled (lanes 11-12) broodstock of *H. asinina* with CUHA2 (panel A) and CUHA12 (panel B). Lanes 13 are negative controls (without DNA template). A 100 bp ladder (lanes M) was used as a DNA marker.

markers that are described here fail to provide species-specific results when used to examine the species-origins of new populations of *H. asinina*.

Acknowledgments We thank the two anonymous referees for their useful comments. This work was supported by the Thailand Research Funds (TRF) Project, 4320015, that was awarded to SK and AT and was partially supported by JSPS (DNA sequencing). The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, TRF, granted a student fellowship to PA.

References

- Avise, J. C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman and Hall, London, UK.
- Brown, L. D. (1995) Genetic evidence for hybridization between *Haliotis rubra* and *H. laevigata*. *Mar. Biol.* **123**, 89-93.
- Calvalho, G. R. and Hauser, L. (1994) Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fisheries* **4**, 326-350.
- Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 612-617.
- Fritsch, P., Hanson, M. A., Spore, C. D., Pack, P. E. and Rieseberg, L. H. (1993) Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11**, 10-20.
- Gordon, H. R. (2000) World abalone supply, markets and pricing: historical, current and future perspectives. 4th International Abalone Symposium, 6-11 February, 2000, University of Cape Town, Cape Town, South Africa.
- Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B. (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* **1**, 55-63.
- Heipel, D. A., Bishop, J. D. D., Brand, A. R. and Thorpe, J. P. (1998) Population genetic differentiation of the great scallop *Pecten maximus* in western Britain investigated by randomly amplified polymorphic DNA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **162**, 163-171.
- Jarayabhand, P. and Paphavasit, N. (1996) A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture* **140**, 159-168.
- Jarayabhand, P., Pripue, P., Klinbunga, S. and Tassanakajon, A. (2002) Identification of species-diagnostic markers of abalone in Thailand using PCR-RFLP of 16S rDNA. *Fisheries Sci.* **68**

- (suppl II), 1091-1094.
- Klinbunga, S., Sodsuk, S., Penman, D. J. and McAndrew, B. J. (1996) An improved protocol for total DNA isolation and visualization of mtDNA RFLP(s) in the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Thai J. Aquat. Sci.* **3**, 36-41.
- Klinbunga, S., Ampayup, P., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Yoosukh, W. (2000) Development of species-specific markers of the tropical oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand. *Mar. Biotechnol.* **2**, 476-484.
- Klinbunga, S., Ampayup, P., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Yoosukh, W. (2001) Genetic diversity and molecular markers of cupped oysters (Genera *Crassostrea*, *Saccostrea* and *Striostrea*) in Thailand revealed by RAPD analysis. *Mar. Biotechnol.* **3**, 133-144.
- Klinbunga, S., Pripue, P., Khamnamtong, N., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Menasveta, P. (2003) Genetic diversity and molecular markers of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in Thailand. *Mar. Biotechnol.* (in press).
- Lee, Y. H. and Vacquier, V. D. (1995) Evolution and systematics in Haliotidae (Mollusca: Gastropoda): inferences from DNA sequences of sperm lysin. *Mar. Biol.* **124**, 267-278.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Muchmore, M. E., Moy, G. W., Swanson, W. J. and Vacquier, V. D. (1998) Direct sequencing of genomic DNA for characterization of a satellite DNA in five species of Eastern Pacific abalone. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **7**, 1-6.
- Naganuma, T., Hisadome, K., Shiraishi, K. and Kojima, H. (1998) Molecular distinction of two resemblant abalones, *Haliotis discus discus* and *Haliotis discus hannai* by 18S rDNA sequences. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 59-61.
- Nateewathana, A. and Bussarawit, S. (1988) Abundance and distribution of abalone along the Andaman Sea coast of Thailand. *Kasetsart J. (Natural Science)* **22**, 8-15.
- Singhagraiwan, T. and Doi, M. (1993) Seed production and culture of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linne. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand.
- Sweijd, N. A., Bowie, R. C. K., Lopata, A. L., Marinaki, A. M., Harley, E. H. and Cook, P. A. (1998) A PCR technique for forensic, species-level identification of abalone tissue. *J. Shellfish Res.* **17**, 889-895.
- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Jarayabhand, P., Klinbunga, S. and Boonsaeng, V. (1998) Genetic structure in wild populations of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 249-254.
- Tookvinas, S., Leknim, V., Donyadol, Y., Predalampabut, Y. and Paengmark, P. (1986) A survey of species and distribution of abalone (*Haliotis* spp.) in Surat Thani, Nakhon Si Thammarat and Songkla. Tech. Rep. No. 1/1986 NICA, 16 pp.
- Vacquier, V. D., Carner, K. R. and Stout, C. D. (1990) Species-specific sequences of abalone lysin, the sperm protein that creates a hole in the egg envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5792-5796.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. and Higuchi, R. (1994) Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic materials. *Biotechniques* **10**, 506-513.
- Weising, K., Nybom, H., Wolf, K. and Meyer, W. (1995). *DNA Fingerprinting in Plant and Fungi*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Welsh, J. and McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7213-7218.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535.

Population Structure of Tropical Abalone (*Haliotis asinina*) in Coastal Waters of Thailand Determined Using Microsatellite Markers

S. Tang,¹ A. Tassanakajon,¹ S. Klinbunga,² P. Jarayabhand,^{3,4} and P. Menasveta^{2,4}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC),

National Science and Technology Development Agency, Pathumthani 12120, Thailand

³Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁴Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Abstract: Three partial genomic libraries were constructed from genomic DNA of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) that was digested with *AluI*, vortexed/sonicated, and digested with mixed enzyme (*AluI*, *HincII*, and *RsaI*). The libraries yielded 0.02%, 0.42%, and 1.46% positive microsatellite-containing clones, respectively. Eleven clones each of perfect, imperfect, and compound microsatellites were isolated. Ten primer pairs (*CUHas1*–*CUHas10*) were analyzed to evaluate their polymorphic level. The numbers of alleles per locus, observed heterozygosity (H_0), and expected heterozygosity (H_e) ranged from 3 to 26 alleles, and varied between 0.27 and 0.85 and between 0.24 and 0.93, respectively. Three microsatellite loci (*CUHas2*, *CUHas3*, and *CUHas8*) were further used for examination of genetic diversity and differentiation of natural *H. asinina* in coastal waters of Thailand. Genetic variabilities in terms of the effective number of alleles (n_e), H_0 , and H_e were higher in 2 samples from the Gulf of Thailand ($n_e = 9.37, 7.66$; $H_0 = 0.62, 0.78$; and $H_e = 0.87, 0.86$) than those of one sample ($n_e = 6.04$; $H_0 = 0.58$; and $H_e = 0.62$) derived from the Andaman Sea. Assessment of genetic heterogeneity, including allele frequency comparison and pairwise F_{ST} analysis, indicated interpopulational differentiation, between natural *H. asinina* from the Gulf of Thailand and that from the Andaman Sea ($P < 0.0001$).

Key words: abalone, *Haliotis asinina*, microsatellites, genetic diversity, population differentiation.

INTRODUCTION

Abalones are marine gastropods distributed worldwide along the coastal waters of tropical and temperate areas (Geiger, 2000). Approximately 20 species of abalone are commercially important (Jarayabhand and Paphavasit,

1996). Abalone aquaculture has been established in several countries, but approximately 75% of the world production annually is in China (mainly *Haliotis discus hannai*) and Taiwan (mainly *H. diversicolor supertexta*) (Gordon, 2000).

Three species of tropical abalone, *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*, are locally found in Thai waters (Jarayabhand and Paphavasit, 1996). Among these species *H. asinina* is the most promising for aquaculture. Artificially propagated breeding programs and culture techniques for *H. asinina*

Received June 5, 2003; accepted February 18, 2004; online publication March 9, 2005.

Corresponding author: A. Tassanakajon; e-mail: anchalee.k@chulal.ac.th

are well developed; however, basic information on genetic population differentiation and levels of genetic diversity of *H. asinina* is necessary to improve the stock selection program and conserve the existing natural gene pool (Klinbunga et al., 2003).

An initial step toward natural stock management of *H. asinina* is to develop molecular genetic markers that can be applied to its genetic management, including determination of stock structure, evaluation of the levels of gene flow, and reconstruction of intraspecific phylogeny. In addition, the ability to determine individuality and parentage of *H. asinina* will provide the means to establish efficient selective breeding programs and to construct genetic linkage maps of *H. asinina* more effectively.

Microsatellites are short, tandemly repeated DNA loci (1–6 nucleotides) arrayed for approximately 10 to 50 copies and abundantly dispersed in eukaryotic genomes. Microsatellite loci exhibiting large numbers of alleles are ideally suited for gene mapping and pedigree analysis (Pepin et al., 1995), whereas loci with lower polymorphic levels can be used for population genetic studies (Wright and Bentzen, 1994).

Microsatellite markers have been successfully developed in several abalone species including *H. rufescens* (Kirby and Powers, 1998), *H. rubra* (Huang and Hana, 1998; Evans et al., 2001), *H. asinina* (Selvamani et al., 2000), *H. discus discus* (Sekino and Hara, 2001), and *H. discus hannai* and *H. kamtschatkara* (Miller et al., 2001).

Genetic diversity and population differentiation of abalone in Thai waters based on microsatellite polymorphism have not been reported. The objective of this study was to develop informative microsatellites in *H. asinina* and to assess the genetic structure of this species in coastal waters of Thailand. We isolated *H. asinina* microsatellites from 3 partial genomic libraries that were constructed using different approaches. Genetic heterogeneity among *H. asinina* populations derived from different areas was investigated using the 3 microsatellite loci.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Specimens of *H. asinina* were collected from 6 samples (Figure 1). Natural abalone include samples from Talibong Island (HATRAW, $N = 28$) located in the west of peninsular Thailand, and Samet Island (HASAME, $N = 12$) and Cam-



Figure 1. Map of Thailand indicating sampling sites of *H. asinina* used in this study. Dots represent sample locations (except the Philippines sample) from which *H. asinina* was collected. CAM indicates Cambodia; SAM, Samet Island; TRA, Trang.

bodia (HACAME, $N = 23$) located in the Gulf of Thailand. Samples of hatcheries were offspring of wild broodstock initially established from approximately 100 founders originating in Cambodia (HACAMHE, $N = 15$) and Samet Island (HASAMHE, $N = 10$) and the second generation of *H. asinina* (HAPHIHE, $N = 20$) initially established from approximately 200 founders and maintained at the Aquaculture Department, SEAFDEC, Philippines.

DNA Extraction

Genomic DNA extracted from a single individual of *H. asinina* (Gulf of Thailand origin) by a proteinase K phenol-chloroform extraction method (Davis et al., 1986) was used

for construction of each partial genomic library. For genotyping of abalone a Chelex-based extraction method (Walsh et al., 1991; Altschmied et al., 1997) was utilized ($N = 108$).

Construction of *H. asinina* Partial Genomic Libraries

Three partial genomic libraries were constructed: an *AluI*-digested library (5 μ g of *H. asinina* genomic DNA digested with 25 U of *AluI* at 37°C for 2 hours); a vortexed/sonicated genomic library (1 μ g of *H. asinina* genomic DNA vortexed for 15 minutes and subsequently sonicated in an Ultrasonic BCGR 5139 bath for 1 hour); and a mixed-enzyme-digested library (6 μ g of *H. asinina* genomic DNA digested with 20 U each of *AluI*, *HincII*, and *RsaI* for 2 hours at 37°C). After agarose gel electrophoresis the resulting 300-bp to 800-bp DNA fragments were excised, eluted out from the gels, and further treated with T4 polynucleotide kinase and Klenow fragment according to conditions recommended by the manufacturer (New England Biolabs). Approximately 150 ng of manipulated genomic DNA of *H. asinina* was ligated to 50 ng of dephosphorylated *SmaI*-digested pUC18 (Amersham Bioscience) overnight at 16°C. The ligation mixture was electrotransformed into *Escherichia coli* XL1-Blue (Dower et al., 1988). Recombinant clones were selected on ampicillin agar plates according to standard protocol (Maniatis et al., 1982).

Screening of Microsatellite-Containing Clones

Transformed clones were transferred onto a piece of Whatman filter paper (#45). The filter paper was hybridized with the γ -³²P labeled (GT)₁₅ and (CT)₁₅ probe and subjected to autoradiography at -80°C for 2 to 4 hours (Grunstein and Hogness, 1975). Positive clones were picked up and cultured individually. Plasmid DNAs were extracted using a boiling method (Holmes and Quigley, 1981).

DNA Sequencing

Plasmid DNAs (500 ng) were sequenced manually using a T7 sequencing kit (Amersham) with universal or reverse primers. The products were analyzed on 8% denaturing polyacrylamide gels at 50 W for 2.5 hours. The sequencing gel was transferred onto a piece of filter paper, dried in vacuo, and subjected to autoradiography overnight at room temperature.

Primer Design and Amplification of Microsatellites

Primer pairs to amplify microsatellite regions were designed using OLIGO 4.0 (National Biosciences; Table 1). Polymerase chain reaction (PCR) was carried out as described by Supungul et al. (2000). PCR products were analyzed on a 6% denaturing polyacrylamide gel at 50 W for 2.5 to 6 hours. After autoradiography allele sizes of each locus were determined by comparison with the M13 sequencing marker (Yanisch-Perron et al., 1985). Cross-species amplification for all loci was tested in *H. ovina* ($N = 5$) and *H. varia* ($N = 5$) under different PCR amplification conditions (annealing temperatures, MgCl₂ concentrations, and thermal profiles)

Data Analysis

The number of alleles per locus and observed, and expected heterozygosity were calculated (Nei, 1987). The effective number of alleles (Crow and Kimura, 1965) and allele frequencies at each locus in each sample were calculated. Hardy-Weinberg equilibrium for each locus was examined using the exact test (Rousset and Raymond, 1995). Linkage disequilibrium between loci in each sample and allele frequency distribution between possible sample combinations were compared using the Markov chain approach (Guo and Thompson, 1992). Significance of pairwise F_{ST} values (Weir and Cockerham, 1984) was evaluated. All the calculations described above were conducted using GENEPOP 2.0 (Raymond and Rousset, 1995). The significance levels for multiple tests were adjusted following a sequential Bonferroni approach (Rice, 1989). Cavalli-Sforza and Edwards chord genetic distance (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967) was estimated for all possible combinations of samples using the Gendist routine in PHYLIP 3.56c (Felsenstein, 1993).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and Characterization of Microsatellites in *H. asinina*

With the γ -³²P-end-labeled GT₁₅ probe, the mixed-enzyme-digested library yielded 1.46% positive clones (51 in 3487), While the vortexed/sonicated and *AluI*-digested libraries gave 0.42% (19 in 4564) and 0.20% (5 in 2510), respectively. Further screening of the vortexed/sonicated library with the (CT)₁₅ probe provided another 0.07% of positive microsatellite-containing clones (3 in 4464 clones).

Table 1. Characteristics of Ten Novel Microsatellites in *H. asinina*

Locus ^a	Motif	Primer sequence (5'–3')	T _a (°C)	Sample size (N)	Size range in (bp)	No. of alleles	H ₀	H _e
<i>CUHas1</i>	(GT) ₁₇ N ₃₆ (GT) ₁₀	TCATCTGAGTTAATAAGGGAC TCAGTCATTATCTTAGCGGAG	53	72	258–360	26	0.85	0.93
<i>CUHas2</i>	(AT) ₇ (GT) ₃₇	ATGGAAGTCAACAATAGACAGG CCCAGATCAGTTCCACAATAC	57	65	286–340	21	0.68	0.93
<i>CUHas3</i>	(GT) ₂₄ (GA) ₁₈	TCCAGACTGCACGTTATTATTCC GCACCCTGTCTCCCTTGAAC	57	71	134–178	13	0.62	0.82
<i>CUHas4</i>	(GT) ₆ (TGCA) ₄ N ₁₅ (GT) ₇	GTTCCGTTCTACCAATGATCG ACTCGCCGTCGTATACCTAG	57	67	222–250	5	0.40	0.59
<i>CUHas5</i>	(GT) ₁₇	ATGAACCTCTAATCTAAAGC AGTGCTCTTTACCAATCC	49	72	104–173	19	0.35	0.91
<i>CUHas6</i>	(GT) ₁₉	CGATGGTGATACGATGATGC ACGGTATGAACATATCGTGAC	57	48	232–240	6	0.75	0.71
<i>CUHas7</i>	(ACGC) ₆	CTACACCAACATTATCCTG AATCAATAAGTGACTGTCTG	49	48	112–126	3	0.27	0.24
<i>CUHas8</i>	(AGTG) ₁₆	GTATTACTTGACTTTGAGCC TGTATGTCCTATCACAGCAT	49	72	148–238	19	0.71	0.88
<i>CUHas9</i>	(GT) ₃₄	TGTCGTAECTCCCATAGCG GGTGTCCATTTATGAATTGAG	53	48	148–240	26	0.81	0.92
<i>CUHas10</i>	(CA) ₁₆ CG(CA) ₄	CCACTCACAAACGCACG AAGGCAGCGAAACCTCACC	53	48	118–160	9	0.42	0.63

^aGenBank accession numbers are BV096864 to BV096873.

A total of 78 positive clones were sequenced, and 33 microsatellite loci were isolated. The proportions of perfect, imperfect, and compound microsatellites (Weber, 1990) were identical (11 clones accounting for 33.33% of each type of microsatellite).

Fourteen primer pairs were designed, of which 10 (*CUHas1*–*CUHas10*) worked well in *H. asinina* samples (HACAME, HACAMHE, HASAMHE, and HAPHIHE) with the allelic variations (Table 1, Figure 2). *CUHas1* exhibited the highest variability (26 alleles, $H_0 = 0.85$, $H_e = 0.93$), while the lowest variability was observed at *CUHas7* (3 alleles, $H_0 = 0.27$, $H_e = 0.24$). Linkage disequilibrium between loci was not significant for all combinations of loci after corrections of significance level ($P > 0.0083$). Three microsatellite loci (*CUHas4*, *CuHas6*, and *CuHas7*) were successfully amplified in specimens from the Gulf of Thailand but not in the Andaman Sea sample (HATRAW). Cross-species amplification for *H. ovina* and *H. varia* was not successful at all loci even though a variety of PCR conditions were extensively tested.

The level of genetic variability at each microsatellite locus in this study was as high as that previously reported

in *H. rubra* (8–41 alleles, $H_0 = 0.19$ – 0.38 , $H_e = 0.81$ – 0.96 , Huang et al., 2000; 2–16 alleles, $H_0 = 0.14$ – 0.76 , $H_e = 0.40$ – 0.90 , Evans et al., 2001); *H. discus discus* (3–10 alleles, $H_0 = 0.18$ – 0.80 , $H_e = 0.29$ – 0.89 , Sekino and Hara, 2001); and Australian *H. asinina* (2–25 alleles, $H_e = 0.29$ – 0.96 , H_0 was not reported; Selvamani et al., 2000), but lower than microsatellites in *H. kamtschatkana* (20–63 alleles, $H_0 = 0.41$ – 0.89 , $H_e = 0.68$ – 0.96 , Miller et al., 2001).

Nonoverlapping alleles were observed at *CUHas9*; that is, the HATRAW sample possessed smaller alleles (148–162 bp) than those detected in the HACAME sample (184–240 bp) suggesting that this locus has potential to identify the coastal origins of Thai *H. asinina*. However, larger numbers of specimens from other sites of each coastal region should be genetically examined to verify our speculations.

Selvamani et al. (2000) also isolated and characterized 11 microsatellites in *H. asinina*, but the genetic variability of these microsatellites was only examined in the Heron reef population of Australia ($N = 21$ – 41 per locus). The failure to genotype HATRAW sample originating from the Andaman Sea using *CUHas4*, *CuHas6*, and *CuHas7* primer

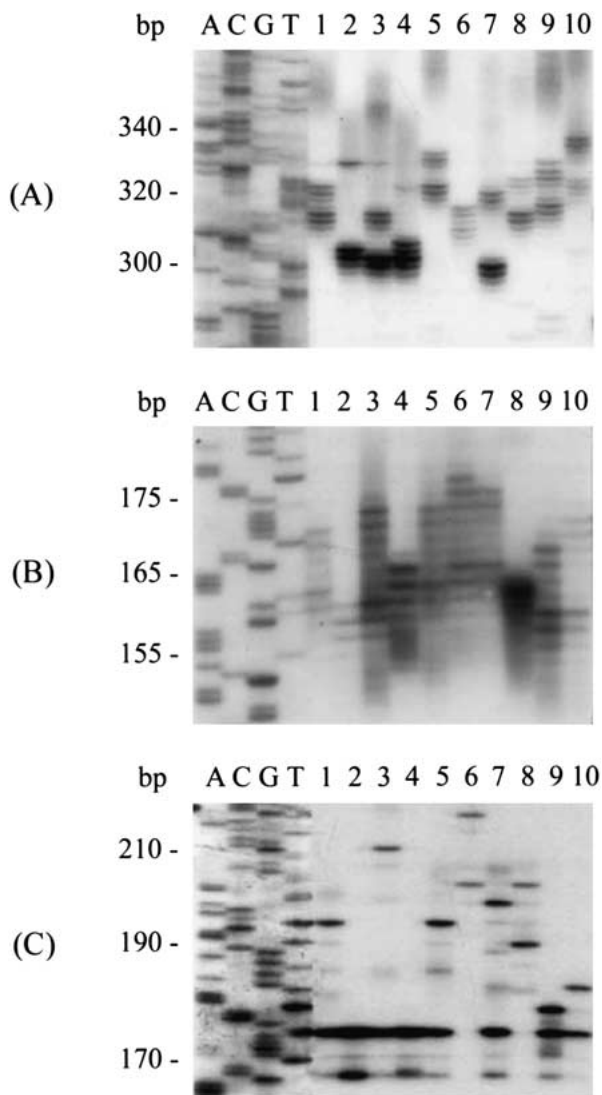


Figure 2. Microsatellite patterns resulting from analysis of *H. asinina* at loci *CUHas2* (A), *CUHas3* (B), and *CUHas8* (C). A sequencing ladder of M13mp18 was used as the size standard (lanes A, C, G, and T).

pairs designed from microsatellites of *H. asinina* from the Gulf of Thailand implied that locus-specific primers of Australian *H. asinina* reported by Selvamani et al. (2000) should be carefully tested and characterized with Thai *H. asinina* before being used in genetic studies (e.g., the construction of genetic linkage maps and breeding programs) of natural Thai samples and hatchery stocks.

Genetic Diversity of *H. asinina*

Three loci (*CUHas2*, *CUHas3*, and *CUHas8*) were preliminarily tested for population genetic studies of *H. asinina*. The number of alleles, effective alleles, and observed and

expected heterozygosity per locus across samples varied from 3.67 to 12.00, 3.58 to 9.37, 0.58 to 0.82, and 0.62 to 0.88, respectively (Table 2).

The HACAME sample exhibited the largest number of alleles and effective alleles per locus (12.00 alleles, $n_e = 9.37$) compared with HASAME (8.33 alleles, $n_e = 7.66$) and HATRAW (8.67 alleles, $n_e = 6.04$). High genetic diversity was also observed in 2 hatchery stocks, HACAMHE (8.67 alleles, $n_e = 8.74$) and HASAMHE (7.67 alleles, $n_e = 7.17$). The HAPHIHE sample exhibited the lowest number of alleles and effective alleles for all loci (3.67 alleles, $n_e = 3.58$). Three instances (HACAME at *CUHas2* and *CUHas3* and HAPHIHE at *CUHas8*) showed significant deviation from Hardy-Weinberg expectations ($P < 0.0001$). Comparable levels of heterozygosity between hatchery stocks (HACAMHE and HASAMHE) and their natural samples (HACAME and HASAME) suggested that founders' contributions in those hatchery stocks were relatively large.

Genetic Heterogeneity of Natural *H. asinina* Samples

On the basis of genetic distance values, the level of genetic differentiation between HASAME and HACAME was low (0.0578), but greater genetic distance was observed between coastal regions (0.1310 and 0.1393, respectively) (Table 3). Genetic heterogeneity analysis and F_{ST} statistics revealed significant genetic population differentiation in natural samples of *H. asinina* ($P < 0.0001$, Table 3) in addition to the results seen in the genetic distance data. A lack of genetic heterogeneity was observed between samples in the Gulf of Thailand (HACAME and HASAME; $P > 0.0083$), but significant population structures were found between those and the Andaman Sea sample (HATRAW) ($P < 0.0001$). As a result, *H. asinina* in coastal waters of Thailand can be differentiated from the Gulf of Thailand and the Andaman Sea stocks.

Klinbunga et al. (2003) determined genetic diversity and population differentiation of the same set of *H. asinina* samples screened in this study by using PCR–restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA (mitochondrial DNA). A panmixia was found in natural *H. asinina* populations in Thai waters. In contrast, analysis of genetic differentiation of those samples by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) revealed significant differentiation between the Gulf of Thailand samples HACAME and HASAME and the Andaman HATRAW samples ($P < 0.0001$; Popongviwat, 2001), as well as the results obtained in this study.

Table 2. Mean Number of Alleles, Effective Number of Alleles, and Heterozygosity per Locus of Each Sample of *H. asinina* Across Three Microsatellite Loci (*CUHas2*, *CUHas3*, and *CUHas8*)

Sample	Mean no. of alleles per locus	Effective no. of alleles ^a (n_e)	Mean heterozygosity		Haplotype diversity ^b	
			$H_0 \pm SD$	$H_e \pm SD$	16S rDNA	16S+18S rDNA
Natural						
HACAME	12.00 ± 2.00	9.37	0.62 ± 0.16	0.87 ± 0.05	0.0000	0.3391
HASAME	8.33 ± 0.58	7.66	0.78 ± 0.13	0.86 ± 0.04	0.0000	0.0000
HATRAW	8.67 ± 7.23	6.04	0.58 ± 0.28	0.62 ± 0.27	0.1351	0.7065
Hatchery						
HACAMHE	8.67 ± 1.53	8.74	0.79 ± 0.13	0.88 ± 0.07	0.0000	0.7816
HASAMHE	7.67 ± 0.58	7.17	0.82 ± 0.17	0.86 ± 0.02	0.2731	0.7511
HAPHIHE	3.67 ± 1.53	3.58	0.67 ± 0.58	0.68 ± 0.01	0.0000	0.8359

^aMean n_e of 3 loci.

^bResults from PCR-RFLP analysis assessed for the same sample sets (Klinbunga et al., 2003).

Table 3. Genetic Heterogeneity Analysis, F_{ST} Estimate, and Genetic Distance Between Pairs of *Haliotis asinina* Samples

Pairwise comparison ^a	Probability value ^b			F_{ST}	Genetic distance
	<i>CUHas2</i>	<i>CUHas3</i>	<i>CUHas8</i>		
HATRAW–HASAME	0.0009	<0.0001	<0.0001	0.2111*	0.1393
HATRAW–HACAME	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1977*	0.1310
HATRAW–HASAMHE	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.2456*	0.1556
HATRAW–HACAMHE	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.2258*	0.1494
HATRAW–HAPHIHE	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.2870*	0.1486
HAPHIHE–HASAME	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.2004*	0.1649
HAPHIHE–HACAME	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1785*	0.1564
HAPHIHE–HASAMHE	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.2178*	0.1716
HAPHIHE–HACAMHE	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1979*	0.1670
HASAME–HACAME	0.2709^{ns}	0.1080^{ns}	0.2206^{ns}	–0.0052^{ns}	0.0578
HASAME–HASAMHE	0.0100 ^{ns}	0.0258 ^{ns}	0.0188 ^{ns}	0.0455 ^{ns}	0.0871
HASAME–HACAMHE	0.0310 ^{ns}	0.0030*	0.0093 ^{ns}	0.0437 ^{ns}	0.0767
HACAME–HASAMHE	0.0362 ^{ns}	0.2380 ^{ns}	0.5050 ^{ns}	0.0079 ^{ns}	0.0521
HACAME–HACAMHE	0.0190 ^{ns}	0.0216 ^{ns}	0.1098 ^{ns}	0.0189 ^{ns}	0.0531
HACAMHE–HASAMHE	0.9746 ^{ns}	0.9316 ^{ns}	0.9273 ^{ns}	–0.0313 ^{ns}	0.0113

^aComparisons between natural *H. asinina* samples are in bold face.

^bProbability values of genetic homogeneity between samples. Genetic heterogeneity analysis was conducted based on allele frequency distributions; significance level was further adjusted to $P < 0.0083$ using a sequential Bonferroni method. Superscript ns, indicates not significant; *, $P < 0.0001$.

Nonsignificant genetic heterogeneity between our hatchery stocks (HACAMHE and HASAMHE) and their natural samples (HACAME and HASAME) based on 16S rDNA (Klinbunga et al., 2003), RAPD (Popongwiwat, 2001), and microsatellites (this study) suggests the possibility of using our hatchery stocks to establish stock enhancement programs at the geographic origins of *H. asinina*.

Microsatellite markers developed in this study can be further applied to assist genetic improvement and breeding programs of *H. asinina*, such as determination of correlation between genotypes and survival rates after settlement of larvae, and between growth rate and levels of heterozygosity. In addition, these markers may be useful to identify the stock units of migration ability in natural *H. asinina*. Highly polymorphic levels of microsatellites can also be applied to

parentage analysis, eliminating problems accompanied by traditional selective breeding programs in which offspring of different family lines must be cultured separately.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Thailand Research Funds (TRF) Grant RDG4320015 awarded to S.K. and A.T. The student grant to S.T. was supported by The Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST). We also thank 2 anonymous referees for spending their valuable time to review our manuscript.

REFERENCES

- Altschmied, J., Hornung, U., Schlupp, I., Gadau, J., Kolb, R., and Schartl, M. (1997). Isolation of DNA suitable for PCR for field and laboratory work. *Bio techniques* 23:228–229.
- Cavalli-Sforza, L.L., and Edwards, A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* 21:550–570.
- Crow, J.F., and Kimura, M. (1965). Evolution in sexual and asexual populations. *Am Nat* 99:439–450.
- Davis, L.G., Dibner, M.D., and Battey, J.F. (1986). Preparation of genomic DNA. In: *Basic Method in Molecular Biology*, New York, N.Y.: Elsevier Science, pp 42–43.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:612–617.
- Evans, B., Conod, N., and Elliott, N.G. (2001). Evaluation of microsatellite primer conservation in abalone. *J Shellfish Res* 20:1065–1070.
- Felsenstein, J. (1993). *Phylip (Phylogeny Inference Package Version 3.5c)*. Seattle: Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington.
- Geiger, D.L. (2000). Distribution and biogeography of the *Haliotidae* (Gastropoda: Vetigastropod) world-wide. *Boll Malacologica* 35:57–120.
- Gordon, H.R. (2000). World abalone supply, markets and pricing: historical, current and future perspectives. Opening Speech: 4th International Abalone Symposium, Cape Town, South Africa. University of Cape Town, February 6–11, 2000.
- Guo, S.W., and Thompson, E.A. (1992). Performing the extract test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361–372.
- Grunstein, M., and Hogness, D.S. (1975). Colony hybridisation: a method for the isolation of cloned DNAs which contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3961.
- Holmes, D.S., and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114:193–197.
- Huang, B.X., and Hanna, P.J. (1998). Identification of three polymorphic microsatellite loci in blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach), and detection in other abalone species. *J Shellfish Res* 17:795–799.
- Huang, B.X., Peakall, R., and Hanna, P.J. (2000). Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Mar Biol* 136:207–216.
- Jarayabhand, P., and Paphavasit, N. (1996). A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture* 140:159–168.
- Kirby, V.L., and Powers, D.A. (1998). Identification of microsatellites in the California red abalone, *Haliotis rufescens*. *J Shellfish Res* 17:801–804.
- Klinbunga, S., Pripue, P., Khamnamtong, N., Puanglarp, N., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P., and Menasveta, P. (2003). Genetic diversity and molecular markers of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in Thailand. *Mar Biotechnol* 5:505–517.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miller, K.M., Laberee, K., Kaukinen, K.H., Li, S., and Withler, R.E. (2001). Development of microsatellite loci in pinto abalone (*Haliotis kamtschatkana*). *Mol Ecol Notes* 1:315–317.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, N.Y.: Columbia University Press.
- Pepin, L., Amigues, Y., Lepingel, A., Berthier, J.L., Bensaid, A., and Vaiman, D. (1995). Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species: examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity* 74:53–61.
- Popongwiwat, A. (2001). Genetic Diversity of Tropical Abalone in Thailand Using RAPD-PCR. Bangkok, Thailand: M.Sc. thesis, Chulalongkorn University.
- Raymond, M., and Rousset, F. (1995). GENEPOP (Version 1.2): a population reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425.
- Rousset, F., and Raymond, M. (1995). Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140:1413–1419.

- Rice, W.R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225.
- Sekino, M., and Hara, M. (2001). Microsatellite DNA loci in Pacific abalone *Haliotis discus discus* (Mollusca, Gastropoda, Haliotidae). *Mol Ecol Notes* 1:8–10.
- Selvamani, M.J.P., Degnan, S.M., Paetkau, D., and Degnan, B.M. (2000). Highly polymorphic microsatellite loci in the Heron Reef population of the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Mol Ecol* 9:1184–1186.
- Supungul, P., Sootanan, P., Klinbunga, S., Kamonrat, W., Jarayabhand, P., and Tassanakajon, A. (2000). Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Mar Biotechnol* 2:339–347.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., and Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506–513.
- Weber, J.L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n and (dG-dT)_n polymorphism. *Genomics* 7:524–530.
- Weir, B.S., and Cockerham, C.C. (1984). Estimation *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370.
- Wright, J.M., and Bentzen, P. (1994). Microsatellites: genetic markers for the future. *Rev Fish Biol Fish* 4:384–388.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improve M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19. *Gene* 33:103–119.

Genetic Heterogeneity of the Tropical Abalone (*Haliotis asinina*) Revealed by RAPD and Microsatellite Analyses

Sureerat Tang, Aporn Pongviwat[†], Sirawut Klinbunga^{*,‡}, Anchalee Tassanakajon,
Padermsak Jarayabhand^{*,§} and Piamsak Menasveta^{†,‡}

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

[†]Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

[‡]Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

[§]Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Received 6 August 2004, Accepted 10 November 2004

Genetic heterogeneity of the tropical abalone, *Haliotis asinina* was examined using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and microsatellite analyses. One hundred and thirteen polymorphic RAPD fragments were generated. The percentage of polymorphic bands of *H. asinina* across overall primers was 85.20%. The average genetic distance of natural samples within the Gulf of Thailand (HACAME and HASAME) was 0.0219. Larger distance was observed when those samples were compared with HATRAW from the Andaman Sea (0.2309 and 0.2314). Geographic heterogeneity and F_{ST} analyses revealed population differentiation between *H. asinina* from the Gulf of Thailand and the Andaman Sea ($p < 0.0001$). Three microsatellite loci (*CUHas1*, *CUHas4* and *CUHas5*) indicated relatively high genetic diversity in *H. asinina* (total number of alleles = 26, 5, 23 and observed heterozygosity = 0.84, 0.42 and 0.33, respectively). Significant population differentiation was also found between samples from different coastal regions ($p < 0.0001$). Therefore, the gene pool of natural *H. asinina* in coastal Thai waters can be genetically divided to 2 different populations; the Gulf of Thailand (A) and the Andaman Sea (B).

Keywords: Abalone, Genetic diversity, Microsatellites, Population differentiation, RAPD

Introduction

Abalone are economically important marine gastropods distributed throughout the tropical and the temperate zones (Geiger, 2000). Approximately 100 species of abalone are existent and over 15 species are farmed and commercially important (Jarayabhand and Paphavasit, 1996). The total world production of abalone was approximately 13,000 metric tons in 1999. Of these, 7,165 metric tons were from aquaculture where China (mainly *Haliotis discus hannai*) and Taiwan (mainly *H. diversicolor supertexta*) contributed approximately 75% of the cultured production annually (Chen *et al.*, 1989; Gordon, 2000). Three species of tropical abalone, *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* are indigenously found in Thai waters. While *H. asinina* and *H. ovina* are found along the coasts of the upper Gulf of Thailand, all three species are distributed in the Andaman Sea (Nateewathana and Bussarawit, 1988). Among these species, *H. asinina* provides the highest percentage of a ratio between the meat weight and the total weight (85%) when compared to *H. varia* (30%) and *H. ovina* (40%) (Singhagruiwan and Doi, 1993). More importantly, *H. asinina* is a year-round spawning species. The spawning cycle is highly predictable. Therefore, *H. asinina* is the most promising species for the culture industry (Selvamani *et al.*, 2001).

Relatively little is known about the basic knowledge on genetic diversity and population structure of *H. asinina*. This information is essential for the construction of an appropriate management scheme of *H. asinina* in Thailand (Jarayabhand *et al.*, 2002). Appropriate genetic markers can be used to elevate the culture and management efficiency of abalone in Thailand. Sustainable aquaculture of *H. asinina* requires the basic knowledge on stock structure and the use of suitable molecular genetic markers to establish appropriate broodstock

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 66-2-2185279; Fax: 66-2-2547680
E-mail: sirawut@biotec.or.th

management programmes and the effective breeding programmes to avoid significant reduction of genetic diversity of the cultured stocks (Klinbunga *et al.*, 2003).

Molecular genetic studies have been carried out in various abalone species (Brown, 1991, Metz *et al.*, 1998; Huang and Hana, 1998; Kirby *et al.*, 1998; Sweijd *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000; Sekino and Hara, 2001) but publications concerning population genetics of *H. asinina* were rather limited. Recently, 11 microsatellite loci were isolated and characterised from the Heron reef sample of *H. asinina* (Selvamani *et al.*, 2000). Five of these (Has2k, Has2J, Has3K, Has10 and Has13) were used for genotyping of larvae produced by 3 separate crosses to assess fertilization success and maintaining pedigree information for selective breeding. The parents of an individual veliger could be determined from only 3 loci (Selvamani *et al.* 2001).

Genetic diversity of abalone in Thai waters; *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* were recently reported. Restriction analysis of 18S (nuclear) rDNA with *Alu* I, *Taq* I and *Hae* III and 16S (mitochondrial) rDNA with *Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III and *Alu* I gave 12 and 13 digestion patterns, respectively. A total of 49 composite haplotypes were found. Geographic heterogeneity analysis and F_{ST} estimate indicated strong genetic differentiation in *H. ovina* ($p < 0.0001$) but did not reveal genetic heterogeneity of *H. asinina* and *H. varia* in Thai waters ($p > 0.0021$) (Klinbunga *et al.* 2003).

The objectives of this study were analysis of genetic diversity and population differentiation levels of *H. asinina* using RAPD and microsatellite analyses. The basic knowledge obtained is useful to avoid including inbred founder populations and to design appropriate breeding scheme in breeding programmes of *H. asinina*. The information can also be applied for management of wild broodstock to ensure sustainable aquaculture of *H. asinina*.

Materials and Methods

Sampling The tropical abalone (*H. asinina*) were collected from 6 samples (Fig. 1) including natural abalone from Talibong Island located in Trang Province (HATRAW, $N = 28$), Samet Island located in Rayong Province (HASAME, $N = 19$) and Cambodia (HACAME, $N = 23$) (Fig. 1) and hatchery samples composing of the first (P_0) and the second (F_1) generation samples which founders were originated from Cambodia (HACAMHE, $N = 15$) and Samet Island (HASAMHE, $N = 15$) and from the Philippines (HAPHIE, $N = 30$), respectively.

DNA extraction Genomic DNA was extracted from a piece of the foot tissue of each *H. asinina* using a phenol/chloroform-proteinase K method (Klinbunga *et al.*, 2004). The concentration of extracted DNA was spectrophotometrically measured. DNA was kept at 4°C until required.

RAPD analysis One hundred and thirty decanucleotide primers were screened (Fritsch *et al.*, 1993). Five selected primers (OPB11,



Fig. 1. Map of Thailand indicating sample collection sites of *H. asinina* used in this study. Dots represent geographic locations (excluding the Philippines sample) from which *H. asinina* was collected. Samet Island (SAM) and Talibong Island are located in Rayong and Trang provinces, respectively.

5'-GTAGACCCGT-3'; UBC101, 5'-GCGCCTGGAG-3'; UBC 195, 5'-GATCTCAGCG-3'; UBC197, 5'-TCCCCGTTCC-3' and UBC 271, 5'-GCCATCAAGA-3'), were used for population genetic analysis of *H. asinina*. PCR was carried out in a 25 ml reaction volume containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 100 mM of each dNTP, 0.2 mM of an arbitrary primer, 25 ng of genomic DNA and 1 unit of AmpliTaq DNA polymerase (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Amplification was carried out in a PCR Sprint thermalcycler (Hybaid, UK) consisting of a predenaturation at 94°C for 3 minutes followed by 35 cycles of 94°C for 15 seconds; 36°C for 60 seconds and 72°C for 90 seconds. The final extension was performed at 72°C for 7 minutes. The amplification products were electrophoretically analysed through 1.6% gels and visualised under a UV transilluminator after ethidium bromide staining (Maniatis *et al.*, 1982).

Microsatellite analysis Three microsatellite loci; *CUHas1* possessed (GT)₁₇N₃₆(GT)₁₀, *CUHas4* possessed (GT)₆(TGCA)₄N₁₅(GT)₇ and *CUHas5* possessed (GT)₁₇, previously isolated in our laboratory (GenBank accession numbers BV096866, BV096869 and BV096864; Tang *et al.*, 2004) were used for population genetic studies of natural (HACAME and HATRAW) and hatchery samples of *H. asinina* (HACAMHE and HASAMHE). Genotyping of each abalone was performed only a single time for each locus. PCR was carried out in a 5 µl reaction volume containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 200 µM of each dNTP, 0.45 µM of the reverse primer, 0.425 µM of the forward primer, 0.025 µM of the [γ -³²P]dATP labelled forward

Table 1. Sequences of RAPD primers, size ranges, number of amplified bands and the percentage of polymorphic and monomorphic bands resulted from RAPD analysis of *H. asinina*

Primer	Sequence	Size-range (bp)	No. of bands	Polymorphic bands (%)	Monomorphic bands (%)
OPB11	5'-GTAGACCCGT-3'	390-2300	21	90.48	9.52
UBC101	5'-GCGCCTGGAG-3'	325-1800	32	81.25	18.75
UBC 195	5'-GATCTCAGCG-3'	525-1500	25	84.00	16.00
UBC197	5'-TCCCCGTTCC-3'	500-1500	23	86.96	13.04
UBC 271	5'-GCCATCAAGA-3'	250-1050	12	83.33	16.67
Total		250-2300	113	85.20	14.80

primer, 0.15 unit of DyNAzyme™ DNA polymerase and 25 ng of DNA template (or 1 µl of DNA extracted by a Chelex-based method; Walsh *et al.*, 1991). The reaction mixture was overlaid with a drop of mineral oil.

Amplification was performed in an Omnigene thermocycler (Hybaid, UK) consisting of a predenaturation at 95°C for 3 min followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 53°C (*CUHas1*), 57°C (*CUHas4*) or 49°C (*CUHas5*) for 2 min and extension at 72°C for 1 min. The final extension was carried out at 72°C for 10 min. The PCR product was size-fractionated through 6% denaturing polyacrylamide gels. Sizes of microsatellite alleles were determined by comparing with the M13 sequencing marker after autoradiography (Yanish-Perron *et al.*, 1985).

Data analysis Each RAPD fragment is treated as an independent character. Sizes of RAPD bands were estimated by comparing with a 100 bp ladder and recorded in a binary matrix to represent the presence (1) or absence (2) of a particular band. The similarity index between individuals, within samples and between samples were calculated (Nei and Li, 1979). Genetic distance between paired samples was then estimated (Lynch, 1990) and used to construct a neighbor-joining tree (Saitou and Nei, 1987) using Neighbor in PHYLIP (Felsenstein, 1993). Geographic heterogeneity and F_{ST} statistics between pairs of samples were analysed using TFPGA (available at <http://www.public.asu.edu/~mmille8/tfpga.htm>).

For microsatellite analysis, observed and expected heterozygosity were calculated (Nei, 1987). The effective number of alleles at each locus was examined (Crow and Kimura, 1965). Hardy-Weinberg expectations and genotypic disequilibrium were analysed using the exact test (Guo and Thompson, 1992). Geographic heterogeneity in allele distribution frequencies among compared samples was carried out with the Markov chain approach for χ^2 analysis (Guo and Thompson, 1992). F_{ST} between pairs of samples (Weir and Cockerham, 1984) was determined if it was significantly different from zero. All tests were routine in GENEPOP (Raymond and Rousset, 1995). The significance levels for multiple tests were adjusted following a sequential Bonferroni approach (Rice, 1989).

Results

RAPD analysis High genetic diversity of *H. asinina* was found from RAPD analysis. One hundred and thirteen RAPD fragments ranging from 250 bp to 2300 bp in length were

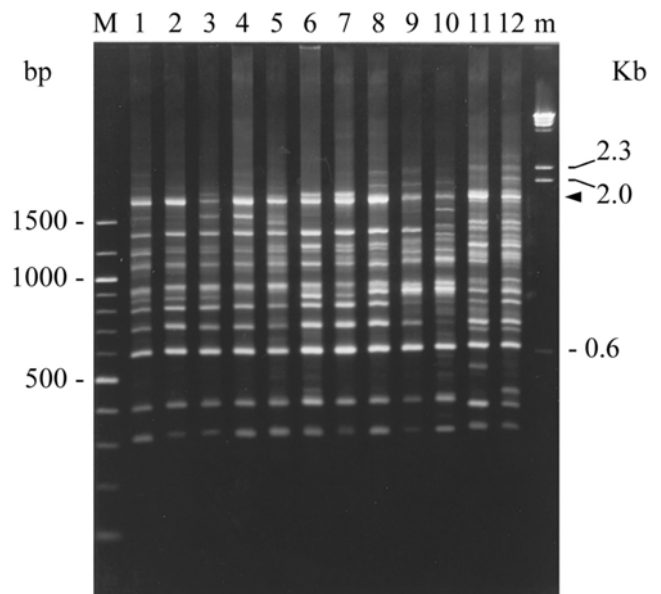


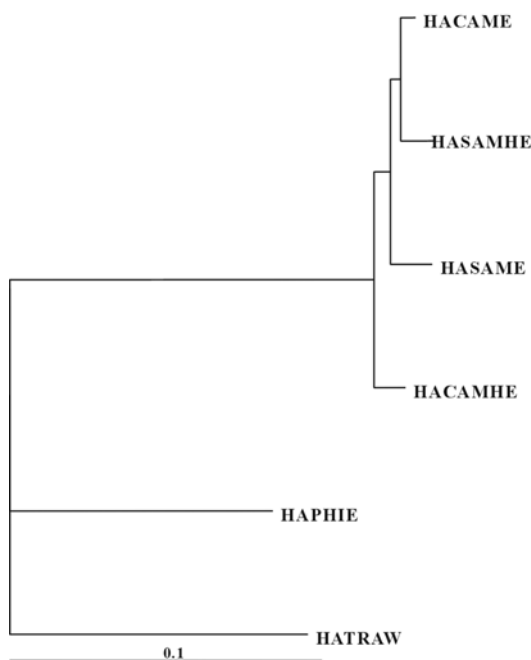
Fig. 2. Examples of RAPD patterns resulted from analysis of *H. asinina* from Samet Island (HASAME, lanes 1-4), Cambodia (HACAME, lanes 5-8), Talibong Island (HATRAW, lanes 9-10), and the Philippines (HAPHIE, lanes 11-12) with UBC101. Lanes M and m are a 100 bp ladder and λ -Hind III, respectively. An arrowhead indicated a *H. asinina*-specific RAPD marker (1700 bp).

generated across all investigated samples (21, 32, 25, 23 and 12 bands for OPB11, UBC101, UBC195, UBC197 and UBC271, respectively; Table 1). The percentage of polymorphic bands across overall samples generated from OPB11 was 90.48% whereas that of the remaining primer were 81.25-86.96%. Several RAPD bands including 1700 bp (UBC101, Fig. 2), 1025 bp and 650 bp (UBC195), 1400 bp and 710 bp (UBC197) and 650 bp (UBC271) bands were found in all investigated individuals and regarded as potential species-specific RAPD markers for *H. asinina*.

The similarity index within samples across overall primers of *H. asinina* was 0.7927 (HASAME)-0.8496 (HATRAW). Low genetic differences were found between pairs of the Gulf of Thailand samples (0.0156-0.0317) whereas greater genetic distance was found between samples from the Gulf of Thailand and HATRAW (0.2096-0.2381) and HAPHIE

Table 2. The average genetic distance (below diagonal) and similarity indices (above diagonal) between samples of *H. asinina* resulted from RAPD analysis using OPB11, UBC101, UBC195, UBC197 and UBC271

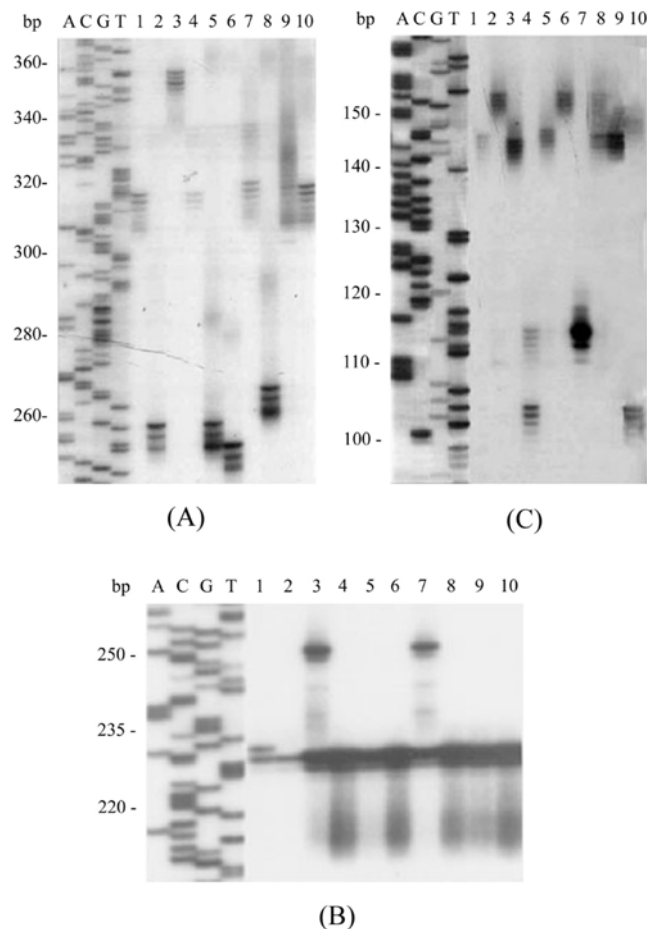
	HASAMHE	HASAME	HACAMHE	HACAME	HATRAW	HAPHIE
HASAMHE	-	0.9730	0.9737	0.9844	0.7619	0.7781
HASAME	0.0270	-	0.9683	0.9781	0.7686	0.7871
HACAMHE	0.0263	0.0317	-	0.9766	0.7904	0.7764
HACAME	0.0156	0.0219	0.0234	-	0.7691	0.7933
HATRAW	0.2381	0.2314	0.2096	0.2309	-	0.8203
HAPHIE	0.2219	0.2129	0.2236	0.2067	0.1797	-

**Fig. 3.** A neighbor-joining tree illustrating genetic relationships of *H. asinina* based on the average genetic distance resulted from RAPD analysis using OPB11, UBC101, UBC195, UBC197, and UBC271.

(0.2067-0.2236) (Table 2).

Geographic heterogeneity analysis did not revealed genetic differentiation between *H. asinina* within the Gulf of Thailand ($p > 0.0083$ following a sequential Bonferroni method) but all RAPD primers showed significant heterogeneity between the Gulf of Thailand (HACAME, HACAMHE, HASAME and HASAMHE), the Andaman (HATRAW) and the Philippines (HAPHIE) samples ($p < 0.0001$). A neighbor-joining tree constructed from genetic distance between pairs of *H. asinina* samples also indicated large genetic differences among those samples (Fig. 3).

Microsatellite analysis Allele distribution patterns at *CUHas1*, *CUHas4* and *CUHas5* varied greatly among loci (Fig. 4 and Table 3). At the locus *CUHas1*, a 316 bp allele showed the greatest allele frequency in the Gulf of Thailand samples (0.158-0.300) but this allele was not found in HATRAW. At the locus *CUHas4*, 3 alleles (222, 224 and 228

**Fig. 4.** Microsatellite patterns of non-related *H. asinina* (lanes 1-10) at *CUHas1* (A), *CUHas4* (B) and *CUHas5* (C) loci. A sequencing ladder of M13mp18 is included as the size standard.

bp) were found in HATRAW with comparable frequencies (0.450, 0.225 and 0.325, respectively) whereas 222 bp and 228 bp alleles were predominant in HASAMHE (0.600) and HACAME (0.864) and HACAMHE (0.550), respectively. At the locus *CUHas5*, 114 bp (0.150-0.214) and 154 bp (0.150-0.250) alleles were predominant in the Gulf of Thailand samples whereas 109 bp (0.482) and 110 bp (0.304) alleles were common in HATRAW. Sixteen alleles of *CUHas1* and *CUHas5* observed in at least one of the Gulf of Thailand samples was not found in HATRAW.

Table 3. Allele frequencies, proportion of observed and expected heterozygosity of *CUHas1*, *CUHas4* and *CUHas5* loci across 4 conspecific samples of *H. asinina*

	Allele (bp)	HACAME	HACAMHE	HASAMHE	HATRAW
<i>CUHas1</i>	258	0.026	-	-	-
	260	0.053	-	-	-
	262	0.053	0.100	0.150	-
	266	0.026	-	-	-
	268	0.053	-	-	-
	272	0.026	0.033	0.050	-
	316	0.158	0.300	0.250	-
	318	-	0.033	-	-
	322	0.026	-	-	-
	324	0.026	-	-	-
	326	0.053	0.133	0.150	-
	328	0.132	0.067	0.050	-
	332	0.053	-	-	-
	334	0.053	0.067	0.100	0.018
	336	0.105	0.167	0.200	-
	338	0.026	-	-	-
	340	0.079	-	-	-
	344	0.026	-	-	0.036
	346	-	0.067	-	0.036
	348	-	-	-	0.089
	350	0.026	-	-	0.036
	352	-	-	-	0.161
	354	-	-	-	0.143
	356	-	-	-	0.339
	358	-	0.033	0.050	0.071
	360	-	-	-	0.071
Number of alleles		18	10	8	9
Number of effective alleles		12.21	6.16	6.06	5.45
H_o		0.84	0.87	0.80	0.86
H_e		0.92	0.84	0.84	0.82
<i>CUHas4</i>	222	-	0.600	-	0.450
	224	-	-	-	0.225
	228	0.864	-	0.550	0.325
	230	0.045	0.067	0.100	-
	250	0.091	0.333	0.350	-
	Number of alleles		3	3	3
Number of effective alleles		1.32	2.10	2.30	2.79
H_o		0.27	0.40	0.50	0.50
H_e		0.24	0.52	0.57	0.64

Genotypic disequilibrium analysis indicated that genotypes of *CUHas1*, *CUHas4* and *CUHas5* were associated randomly ($p > 0.05$). The highest polymorphic loci across investigated samples was *CUHas1* ($H_o = 0.84$) followed by *CUHas4* ($H_o = 0.42$) and *CUHas5* ($H_o = 0.33$) with the number of alleles and effective alleles per locus of 26 (258-360 bp) and 13.93, 5 (222-250 bp) and 2.47 and 23 (104-163 bp) and 10.70 alleles, respectively.

Among natural abalone samples, HACAME (the average number of allele and observed heterozygosity per locus, H_o ,

= 11.33 alleles and 0.44, respectively) showed a greater number of allele per locus but a lower H_o than did HATRAW (6.33 alleles and $H_o = 0.61$). High genetic diversity levels were also observed in the hatchery stocks; HACAMHE (7.33 alleles and $H_o = 0.54$) and HASAMHE (6.00 alleles and $H_o = 0.53$).

All investigated samples conformed Hardy-Weinberg expectations at *CUHas1* and *CUHas4* ($p > 0.05$). Only HATRAW did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium at *CUHas5* after the sequential Bonferroni procedure was

Table 3. Continued

	Allele (bp)	HACAME	HACAMHE	HASAMHE	HATRAW
<i>CUHas5</i>	104	-	0.107	0.100	-
	108	-	-	-	0.071
	109	-	-	-	0.482
	110	-	-	-	0.304
	112	-	-	-	0.071
	113	-	-	-	0.018
	114	0.175	0.214	0.150	0.018
	115	0.050	-	-	-
	116	-	-	-	0.036
	117	-	0.036	-	-
	118	0.025	-	-	-
	119	0.025	-	-	-
	145	0.025	0.107	0.100	-
	146	-	0.179	0.250	-
	147	0.100	0.071	0.100	-
	149	0.125	0.036	0.050	-
	150	0.050	-	-	-
	151	0.100	-	-	-
	152	0.025	-	-	-
	154	0.150	0.179	0.250	-
155	0.125	-	-	-	
162	0.025	-	-	-	
163	-	0.071	-	-	
Number of alleles		13	9	7	7
Number of effective alleles		8.89	6.88	5.56	2.97
H_o		0.20*	0.36*	0.30*	0.46
H_e		0.89	0.85	0.82	0.66

Hardy-Weinberg equilibrium was tested for each sample across all loci.

*significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 0.0001$).

applied ($p > 0.0125$).

Geographic heterogeneity analysis and F_{ST} statistics was concordant and indicated significant differentiation between HATRAW and each of the Gulf of Thailand samples ($p < 0.0001$).

Discussion

Genetic diversity of *H. asinina* High levels of genetic diversity were found between different geographic samples of *H. asinina* based on RAPD and microsatellite analyses. This basic information is crucial for establishment of selective breeding and conservation programmes of *H. asinina* in Thai waters.

Levels of polymorphic RAPD bands (82.5%) of *H. asinina* was lower than that in *H. rubra* (93.33%; Huang *et al.*, 2000) and mud crabs (*Scylla serrata*, *S. ocellata* and *S. tranquabarica*, 98.91%; Klinbunga *et al.*, 2000) but greater than that in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*, 72.5%) (Tassanakajon *et al.* 1997) and oysters (*Crassostrea belcheri*, 53.23% and *C.*

iredalei 77.67%; Klinbunga *et al.*, 2001) from different geographic locations in Thailand.

Several fixed RAPD fragments were observed in *H. asinina* (see also Klinbunga *et al.*, 2004). We further tested species-specific nature of a 1700 bp band generated from UBC101 ($N = 130$) by genotyping of *H. ovina* ($N = 95$) and *H. varia* ($N = 33$) originating from different geographic locations in Thailand. Result indicated specificity of this RAPD marker to *H. asinina* suggesting that RAPD-PCR is a rapid and simple method for generating useful molecular markers in abalone.

More recently, Klinbunga *et al.*, (2004) developed a sequence-characterised amplified region (SCAR) marker from a candidate *H. asinina*-specific RAPD fragment found in the present study (650 bp, UBC271). Species-specificity of the marker (312 bp) was found in *H. asinina* ($N = 111$) without false positive results in *H. ovina* ($N = 73$) and *H. varia* ($N = 32$).

RAPD is sensitive to reaction conditions (e.g. quality of the DNA template and $MgCl_2$ and primer concentrations). Moreover, the possibility of comigration of RAPD fragments having different sequences but similar sizes cannot be excluded. Accordingly, microsatellites were also included for

population genetic studies of *H. asinina*. Locus-specific primers designed from sequences of microsatellites containing clones of *H. asinina* would provide more valid and stable data for evaluation of genetic diversity levels and subsequent applications in breeding programmes of *H. asinina*.

Relatively high levels of genetic diversity were found in natural samples of *H. asinina* (HACAME and HASAME). Comparable levels of heterozygosity between hatchery stocks (HACAMHE and HSAMHE) and their natural samples suggested that founders contributed in the hatchery stocks were relatively large.

Selvamani *et al.* (2000) isolated and characterized 11 microsatellites in *H. asinina* but the genetic variability of these microsatellites was only examined in the Heron reef population, Australia ($N=21-41$ per locus). The number of alleles per locus was 2-25 alleles and the expected heterozygosity (H_e) was 0.29-0.96. The level of genetic diversity of *H. asinina* in coastal Thai waters reported in this study was as high as that reported in *H. discus discus* (3-10 alleles, $H_o=0.18-0.80$, Sekino and Hara, 2001) and *H. rubra* (8-41 alleles, $H_o=0.19-0.38$; Huang *et al.*, 2000 and 2-16 alleles, $H_o=0.14-0.76$; Evans *et al.*, 2000).

Intraspecific genetic differentiation of natural *H. asinina*

Large genetic distances from RAPD analysis and large numbers of non-overlapping alleles at *CuHas1* and *CuHas5* observed in natural samples originating from the Gulf of Thailand (HACAME and HASAME) and the Andaman Sea (HATRAW) suggested the existence of genetic subdivisions of Thai *H. asinina*.

Shephred and Brown (1993) predicted that microgeographic population differentiation within each abalone species should be occurred due to its short planktonic larval stages and limited dispersal ability. Accordingly, intraspecific genetic differentiation of abalone may be found within the scale of a few kilometers. In *H. asinina*, genetic differentiation was not observed between HACAME and HASAME located within the Gulf of Thailand ($p=0.2338-1.0000$). Nevertheless, a neighbor-joining tree between pairs of samples, genetic heterogeneity analysis and F -statistics revealed significant genetic differentiation between those and HATRAW located in the Andaman Sea ($p<0.0001$). This suggested that the gene pool of Thai *H. asinina* was not panmictic but reproductively isolated at the macrogeographic level to the Gulf of Thailand and the Andaman Sea populations.

Non-significant genetic heterogeneity between the hatchery stocks (HACAMHE and HASAME) and their corresponding natural samples (HACAME and HASAME) based on RAPD and microsatellite analyses illustrated the possibility to use these hatchery stocks to establish the genetic-based stock enhancement programmes at the local origins of *H. asinina*.

Using nuclear DNA markers like RAPD and microsatellite, clear genetic heterogeneity was observed between HATRAW and the Gulf of Thailand samples ($p<0.0001$). In contrast, Klinbunga *et al.* (2003) determined genetic diversity and

population differentiation of the same *H. asinina* samples using PCR-RFLP of 16S (mitochondrial) rDNA. Only one mitotype was found in all of the east coast samples (haplotype diversity = 0) reflected a lack of genetic heterogeneity in this species. Including 18S (nuclear) rDNA in the analysis resulted in an increase of haplotype diversity to 0.3391, 0.7816, 0.7511 and 0.7065 in HACAME, HACAMHE, HASAMHE and HATRAW, respectively. Under the presumption of selective neutrality of molecular markers and life history of *H. asinina*, female founder effects rather than biased female gene flow may have significantly affected contradictory population subdivision patterns (panmixia from mtDNA and reproductive isolation from nuclear DNA, respectively) when examined by different molecular markers.

Huang *et al.* (2000) examined genetic population structure of ten geographic samples of *H. rubra* in Australia using RAPD, minisatellites (GHR and MIPR) and microsatellites (RUBGT1, RUBCT1 and RUBGACA1). All types of DNA markers revealed significant genetic subdivisions of *H. rubra* along the coastline. Significant Hardy-Weinberg disequilibrium due to homozygote excess was observed at all microsatellite loci across all investigated samples. Apparently, deviation from Hardy-Weinberg expectations has been reported in other abalone genetically analysed by microsatellites including *H. kamschatkana* (Miller *et al.*, 2001), *H. discus discus* (Sekino and Hara, 2001) and *H. asinina* (this study). This may be caused from restricted larval recruitment patterns and asynchronous spawning over short geographic distances of abalone (Huang *et al.*, 2000).

The genetic improvement of *H. asinina* cannot be achieved without knowledge on the control of growth, reproduction and defense mechanisms at the molecular levels. Genomic researches on gene discovery and development of marker-assisted selection (MAS) in *H. asinina* are useful but still in the initial stages. Amparyup *et al.* (2004) constructed normal and subtractive cDNA libraries from ovaries and testes of *H. asinina* and 588 randomly selected clones were unidirectional sequenced. Several functionally important transcripts related with biological and physiological processes of *H. asinina* were isolated. Expression of sex-related genes including homologues of axonemal p66.0, 18 kDa fertilization protein (FP), gonadotropin-inducible ovarian transcriptional factor1 (GIOT1), hydroxysteroid dehydrogenase (HSD), tektin A1, small androgen receptor interacting protein (SARIP), sperm lysin, vitelline coat protein (VCP) and vitellogenin subunit1 (VTG1) was further examined using RT-PCR. Gender-specific expression was found from homologues of VCP and VTG1 and axonemal p66.0, tektin A1 and sperm lysin in female and male *H. asinina*, respectively.

Besides knowledge from genome studies, the ability to identify population differentiation within a commercially important species like *H. asinina* is crucial for broodstock management and conservation programmes (Jarayabhand *et al.*, 2002; Klinbunga *et al.*, 2003). In the present study, we used RAPD and microsatellite analyses to elucidate the

existence of population differentiation of Thai *H. asinina* which was not able to be detected from the female-mediated marker like 16S rDNA polymorphism. The information suggested that *H. asinina* from the Gulf of Thailand and the Andaman Sea should be treated and managed separately. Practically, breeding programmes of *H. asinina* can be carried out more efficiently by incorporation of microsatellites. Offspring from multiple parents can be reared together allowing a better scrutiny of genetic effects on each economically important trait by reducing confounding environmental effects arisen when selected abalone families are cultured separately.

Acknowledgments The authors thank the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) and Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for providing facilities. This research was supported by the Thailand Research Funds (TRF) Grant RDG4320015 awarded to SK and AT. Student grants (ST and AP) were supported by the Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST) and the TRF/BIOTEC special program for Biodiversity Research and Training Program (BRT), respectively.

References

- Amparyup, P., Klinbunga, S., Preechaphol, R., Tassanakajon, A., Hirono, I., Aoki, T. and Jarayabhand, P. (2005) Expressed sequence tag analysis of ovaries and testes from the tropical abalone (*Haliotis asinina*). *Mar. Biotechnol.* (in press).
- Brown, L. D. (1991) Genetic variation and population structure in the blacklip abalone, *Haliotis rubra*. *Australian J. Mar. Freshwater Res.* **42**, 77-90.
- Chen, H. C. (1989) Farming the small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan; in *Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods*, Hahn, K.O. (ed.), pp. 265-283, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Crow, J. F. and Kimura, M. (1965) Evolution and sexual and asexual populations. *Am. Nature* **99**, 439-450.
- Evans, B., Conod, N. and Elliott, N. G. (2001) Evaluation of microsatellite primer conservation in abalone. *J. Shellfish Res.* **20**, 1065-1070.
- Fritsch, P., Hanson, M. A., Spore, C. D., Pack, P. E. and Rieseberg, L. H. (1993) Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11**, 10-20.
- Felsenstein, J. (1993) *Phylip (Phylogenetic Inference Package) Phylogenetic Inference Package version 3.5c*. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- Geiger, D. L. (2000) Distribution and biogeography of the *Haliotidae* Gastropoda: Vetigastropod world-wide. *Bollettino Malacologico* **35**, 57-120.
- Gordon, H. R. (2000) World abalone supply, markets and pricing: historical, current and future prospective. The 4th International Abalone Symposium, 6-11 February 2000, University of Cape town, Cape Town, South Africa.
- Guo, S. W. and Thompson, E. A. (1992) Performing the extract test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**, 361-372.
- Hadrys, H., Balick, M., and Schierwater, B. (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* **1**, 55-63.
- Huang, B. and Hanna P. J. (1998) Identification of three polymorphic microsatellite loci in blacklip abalone, *Haliotis rubra* Leach, and detection in other abalone species. *J. Shellfish Res.* **17**, 795-799.
- Huang, B. X., Peakall, R. and Hanna, P. J. (2000) Analysis of genetic structure of blacklip abalone *Haliotis rubra* populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Mar. Biol.* **136**, 207-216.
- Jarayabhand, P. and Paphavasit, N. (1996) A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture* **140**, 159-168.
- Jarayabhand, P., Pripue, P., Klinbunga, S. and Tassanakajon, A. (2002) Identification of species-diagnostic markers of abalone in Thailand using PCR-RFLP of 16S rDNA. *Fisheries Sci.* **68**, 1091-1094.
- Kirby, V. L., Villa, R. and Powers, D. A. (1998) Identification of microsatellites in the California red abalone, *Haliotis rufescens*. *J. Shellfish Res.* **17**, 801-804.
- Klinbunga, S., Amparyup, P., Leelatanawit, R., Tassanakajon, A., Hirono, I., Aoki, T., Jarayabhand, A. and Menasveta, P. (2004) Species-identification of the tropical abalone *Haliotis asinina*, *Haliotis ovina* and *Haliotis varia* in Thailand using RAPD and SCAR markers. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 213-222.
- Klinbunga, S., Amparyup, P., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Yoosukh, W. (2001) Genetic diversity and molecular markers of commercial oysters Genera *Crassostrea*, *Saccostrea* and *Striostrea* in Thailand determined by RAPD analysis. *Mar. Biotechnol.* **3**, 133-144.
- Klinbunga, S., Boonyapakdee, A. and Pratoomchat, B. (2000) Genetic diversity and species-diagnostic markers of mud crabs Genus *Scylla* in Eastern Thailand determined by RAPD analysis. *Mar. Biotechnol.* **2**, 180-187.
- Klinbunga, S., Pripue, P., Khamnamtong, N., Puanglarp, N., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Menasveta, P. (2003) Genetic diversity and molecular markers of the tropical abalone *Haliotis asinina* in Thailand. *Mar. Biotechnol.* **5**, 505-517.
- Lynch, M. (1990) The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.* **7**, 478-484.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
- Metz, E. C., Robles-Sikisaka, R. and Vacquier, V. D. (1998) Nonsynonymous substitution in abalone sperm fertilization genes exceeds substitution in introns and mitochondrial DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**, 10676-10681.
- Miller, K. M., Laberee, K., Kaukinen, K. H., Li, S. and Withler, R. E. (2001) Development of microsatellite loci in pinto abalone *Haliotis kamtschatkana*. *Mol. Ecol. Notes* **1**, 315-317.
- Nateewatana, A. and Bussarawit, S. (1988) Abundance and distribution of abalone along the Andaman Sea coast of Thailand. *Kasetsart J. Science* **22**, 8-15.
- Nei, M. (1987) Genetic variation within species; in *Molecular Evolutionary Genetics*, pp. 176-207, Columbia University

- Press, New York, USA.
- Nei, M. and Li, W. H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **76**, 5269-5273.
- Raymond, M. and Rousset, F. (1995) Genepop (version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* **86**, 248-249.
- Rice, W. R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Sekino, M. and Hara, M. (2001) Microsatellite DNA loci in Pacific abalone *Haliotis discus discus* Mollusca, Gastropoda, Haliotidae. *Mol. Ecol. Notes* **1**, 8-10.
- Selvamani, M. J. P., Degnan, S. M. and Degnan, B. M. (2001) Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: parentage assignment in aquaculture. *Mar. Biotechnol.* **3**, 478-485.
- Selvamani, M. J. P., Degnan, S. M., Paetkau, D. and Degnan, B. M. (2000) Highly polymorphic microsatellite loci in the Heron Reef population of the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Mol. Ecol.* **9**, 1184-1186.
- Shephred, S. A. and Brown, L. D. (1993) What is an abalone stock: implication for the role of refugia in conservation. *Canadian J. Fish. Aquat. Sci.* **50**, 2001-2009.
- Singhagraiwan, T. and Doi, M. (1993) Seed production and culture of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linne. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Sweijd, N. A., Bowie, R. C. K., Lopata, A. L., Marinaki, A. M., Harley, E. H. and Cook, P. A. (1998) A PCR technique for forensic, species-level identification of abalone tissue. *J. Shellfish Res.* **17**, 889-895.
- Tang, S., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Jarayabhand, P. and Menasveta, P. (2005) Population structure of tropical abalone (*Haliotis asinina*) in coastal waters of Thailand determined using microsatellite analysis. *Mar. Biotechnol.* (in press).
- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Rimpanitchayakit, V., Jarayabhand, P. and Boosaeng, V. (1997) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **6**, 110-115.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. and Higuchi, R. (1991) Chelex100® as medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic materials. *Biotechniques* **10**, 506-513.
- Weir, B. S. and Cockerham, C. C. (1984) Estimation *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Welsh, J. and McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7213-7218.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improve M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19. *Gene* **33**, 103-119.