



รายงานการวิจัย

การวิเคราะห์พันธุศาสตร์ประชากรของหอยตะเกา (*Donax scortum*) ตาม
แนวชายฝั่งทะเลอันดามันเพื่อหาแนวทางในการอนุรักษ์
Population genetic analysis of Leather Donax (*Donax scortum*)
along the Andaman sea coast: Implication for conservation

วีระเกียรติ ทรัพย์มี

Verakiat Supmee

จุฑามาศ ศุภพันธ์

Juthamas Suppapan

อภิรักษ์ สงรักษ์

Apirak Songrak

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณเงินแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2561

การวิเคราะห์พันธุศาสตร์ประชากรของหอยตะเภา (*Donax scortum*) ตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามันเพื่อหาแนวทางในการอนุรักษ์

วีระเกียรติ ทรัพย์มี¹ จุฑามาศ ศุภพันธ์² และ อภิรักษ์ สงรักษ์³

บทคัดย่อ

หอยตะเภา (*Donax scortum*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในภาคใต้ของประเทศไทย ปัจจุบันหอยตะเภาที่มีจำนวนลดลง เนื่องจากมีการจับเพื่อนำมาบริโภคจนเกินขีดความสามารถในการขยายพันธุ์ จำเป็นต้องมีการจัดการซึ่งต้องมีข้อมูลทางพันธุกรรมในการวางแผนจัดการ โดยการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของหอยตะเภาตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน โดยวิเคราะห์จากความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 426 คู่เบสจากยีน cytochrome oxidase subunit I จำนวน 115 ตัว และลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 727 คู่เบส จากยีน 18S rRNA จำนวน 99 ตัว เก็บตัวอย่างจาก 4 แหล่งตัวอย่าง คือจังหวัดสตูล อำเภอลาดสำราญ จังหวัดตรัง และจังหวัดกระบี่ ผลการศึกษาจากยีน cytochrome oxidase subunit I พบว่ามีแฮพลไทป์ 32 แฮพลไทป์ ค่า haplotype diversity และ nucleotide diversity มีค่า 0.887 และ 0.00500 ตามลำดับ ค่าสถิติ Tajima's *D* และ Fu' *FS* จากการทดสอบ neutrality test พบว่าประชากรหอยตะเภาเคยมีการขยายขนาดประชากร ทดสอบ mismatch distribution พบว่ายอมรับการเกิด sudden expansion model และน่าจะขยายขนาดมาประมาณ 1,000 ปี แผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ (MSN) พบว่าเป็นรูปแบบดาว (star topology) และไม่สามารถแบ่งประชากรตามสภาพภูมิศาสตร์ได้ ทดสอบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี AMOVA พบว่าไม่มีโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเกิดขึ้น ทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งตัวอย่างด้วยวิธี pairwise F_{ST} และการสร้างแผนผังต้นไม้วิวัฒนาการ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ผลการศึกษาจากยีน 18S rRNA พบว่ามีแฮพลไทป์ 5 แฮพลไทป์ ค่า haplotype diversity และ nucleotide diversity มีค่า 0.080 และ 0.00031 ตามลำดับ ค่าสถิติ Tajima's *D* และ Fu' *FS* จากการทดสอบ neutrality test พบว่าประชากรหอยตะเภาเคยมีการขยายขนาดประชากร ทดสอบ mismatch distribution พบว่ายอมรับการเกิด sudden expansion model และน่าจะขยายขนาดมาประมาณ 100 ปี แผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ พบว่าเป็นรูปแบบดาวและไม่สามารถแบ่งประชากรตามสภาพภูมิศาสตร์ได้ ทดสอบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี AMOVA พบว่าไม่มีโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเกิดขึ้น ทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างจังหวัดด้วยวิธี pairwise F_{ST} และการสร้างแผนผังต้นไม้วิวัฒนาการ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน การไม่เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรน่าจะเกิดจาก

ประชากรหอยตะเภามีความสามารถในการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมได้ดี ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการจัดการหอยตะเภาในทะเลอันดามันได้

คำสำคัญ: ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ หอยตะเภา โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร อนุรักษ์



¹ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร. ศรีวิชัย อ. พุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช

²ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช อ. เมือง จ. นครศรีธรรมราช

³ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มทร. ศรีวิชัย อ. สี่เกา จ. ตรัง

Population genetic analysis of Leather Donax (*Donax scortum*) along the Andaman sea coast: Implication for conservation

Verakiat Supmee¹, Juthamas Suppapan² and Apirak Songrak³

Abstracts

Leather Donax (*Donax scortum*) is an important commercial fishery product in Southern Thailand. Due to dramatic decreases in *D. scortum* populations, caused by overexploitation, an effective sustainable management strategy is needed. This plan needs to be based on detailed information of genetic features. In this study, population genetic structure and demographic history of the Leather Donax (*D. scortum*) living along the Andaman Sea coast was analyzed based on the variation of the 426 bp of nucleotide sequence of mitochondrial DNA in cytochrome oxidase subunit I gene (115 individuals) and the variation of the 727 bp nucleotide sequence of mitochondrial DNA in *18S rRNA* gene (99 individuals). The mtDNA sequences collected from 4 sampling sites: Satun, Hat Samran, Trang and Krabi province, were analyzed. For cytochrome oxidase subunit I gene results, 32 haplotypes were identified. Estimated values of haplotype and nucleotide diversities were 0.887 and 0.00500, respectively. Neutrality tests (Tajima's *D* and Fu's *FS* statistics) showed that Andaman populations of *D. scortum* had experienced expansion. In addition, the analysis of mismatch distribution accepted the sudden expansion model. The approximate time of the expansion was 1,000 years ago. The topology of a minimum spanning network (MSN) was a star topology and did not indicate any distinct pattern of phylogeographic structure. An AMOVA analysis showed no genetic structure among populations. The analysis of pairwise differences (F_{ST}) and phylogenetic tree also showed no statistically significant difference between all possible regional combinations. For *18S rRNA* gene results, 5 haplotypes were identified. Estimated values of haplotype and nucleotide diversities were 0.080 and 0.00031, respectively. Neutrality tests (Tajima's *D* and Fu's *FS* statistics) showed that Andaman populations of *D. scortum* had experienced expansion. In addition, the analysis of mismatch distribution accepted the sudden expansion model. The approximate time of the expansion was 1,000 years ago. The topology of a minimum spanning network (MSN) was a star topology and did not indicate any distinct pattern of phylogeographic structure. An AMOVA analysis showed no genetic structure among populations. The analysis of pairwise differences (F_{ST}) and phylogenetic tree also showed no statistically significant difference between all possible regional combinations. Based on these results, an absence of a population structure of *D.*

scortum on the Andaman Sea coast was possibly caused by a high level of gene flow. The results revealed by this study are necessary information contributing to efficient strategies to conserve this species in Andaman Sea.

Keywords: Mitochondrial DNA, Leather Donax, Population genetic structure, Conservation



¹Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thung Song, Nakhon Si Thammarat

²Faculty of Education, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Mueang, Nakhon Si Thammarat

³Faculty of Science and Fishery Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่องการวิเคราะห์พันธุศาสตร์ประชากรของหอยตะเภา (*Donax scortum*) ตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามันเพื่อหาแนวทางในการอนุรักษ์ ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2561 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย โดยมุ่งหวังเพื่อที่จะได้ข้อมูลทางพันธุกรรมของหอยตะเภาที่อาศัยตามแนวชายฝั่งของทะเลอันดามัน และการหาแนวทางในการอนุรักษ์บนพื้นฐานทางความหลากหลายทางพันธุกรรม

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่อนุเคราะห์เครื่องมือในการศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุลในการทำโครงการ และขอขอบคุณชาวประมงทุกท่านที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างในทุกพื้นที่

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณหอยตะเภาทุกตัวที่เป็นตัวอย่างในการทำการศึกษานี้

วีระเกียรติ ทรัพย์มี
จุฑามาศ ศุภพันธ์
อภิรักษ์ สงรักษ์
กันยายน 2562

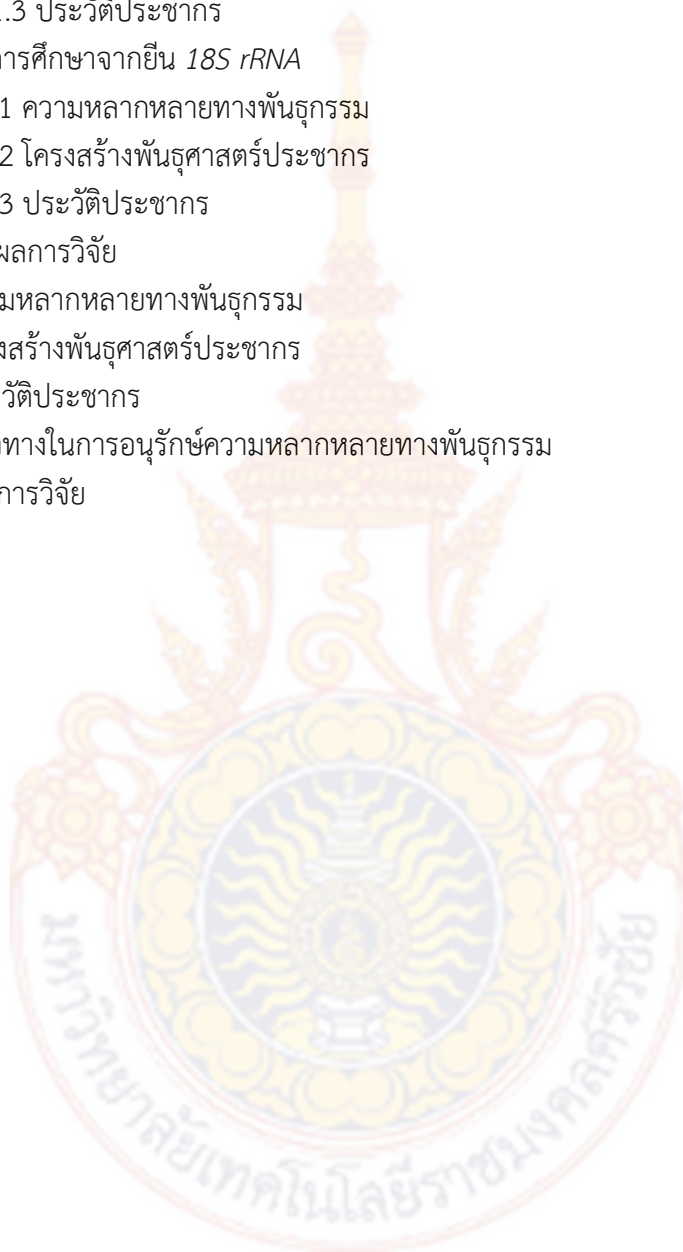


สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstracts	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญภาคผนวก	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของหอยตะเภา	4
2.2 ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในสัตว์	6
2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม	7
2.4 การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	8
2.5 การศึกษาประวัติประชากร	9
2.6 การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในหอยทะเล	10
2.7 พันธุศาสตร์กับการจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำ	10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	12
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	12
3.2 การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย	13
3.3 การจัดการข้อมูลและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม	14
3.4 การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	14
3.5 การวิเคราะห์ประวัติประชากร	14
บทที่ 4 ผลการวิจัย	16
4.1 ผลการศึกษาจากยีน cytochrome oxidase subunit I	16
4.1.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม	16
4.1.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	19

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.1.3 ประวัติประชากร	21
4.2 ผลการศึกษาจากยีน 18S rRNA	23
4.2.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม	23
4.2.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	25
4.2.3 ประวัติประชากร	26
บทที่ 5 วิจัยผลการวิจัย	30
5.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม	30
5.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	30
5.3 ประวัติประชากร	31
5.4 แนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม	31
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	41



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การกระจายของแฮปโลไทป์ในแต่ละแหล่งตัวอย่างวิเคราะห์จากยีน cytochrome oxidase subunit I	17
2	ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยตะเภาวิเคราะห์จากยีน cytochrome oxidase subunit I	19
3	โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรวิเคราะห์ด้วยวิธี AMOVA จากยีน cytochrome oxidase subunit I ของหอยตะเภา	19
4	ค่า pairwise F_{ST} ของหอยตะเภาโดยวิเคราะห์จากยีน cytochrome oxidase subunit I	20
5	ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากรของหอยตะเภา วิเคราะห์จากยีน cytochrome oxidase subunit I	21
6	การกระจายของแฮปโลไทป์ในแต่ละแหล่งตัวอย่างวิเคราะห์จากยีน cytochrome oxidase subunit I จากยีน <i>18S rRNA</i>	24
7	ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยตะเภาวิเคราะห์จากยีน <i>18S rRNA</i>	25
8	โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรวิเคราะห์ด้วยวิธี AMOVA จากยีน <i>18S rRNA</i> ของหอยตะเภา	25
9	ค่า pairwise F_{ST} ของหอยตะเภาวิเคราะห์จากยีน <i>18S rRNA</i>	26
10	ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากรของหอยตะเภาโดยศึกษาจากยีน <i>18S rRNA</i>	27

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	หอยตะเกา	4
2	โครงสร้างของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ	7
3	บริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่างหอยตะเกาตลอดชายฝั่งทะเลอันดามัน	12
4	แผนผังต้นไม้วิวัฒนาการของหอยตะเกาตลอดชายฝั่งทะเลอันดามัน วิเคราะห์จากยีน cytochrome oxidase subunit	20
5	กราฟ mismatch distribution ของหอยตะเกาวิเคราะห์จากยีน cytochrome oxidase subunit I	22
6	กราฟ Bayesian skyline plot ของหอยตะเกาวิเคราะห์จากยีน cytochrome oxidase subunit I	22
7	แผนผังความสัมพันธ์ของแฮพลไทป์ของหอยตะเกาวิเคราะห์จาก ยีน cytochrome oxidase subunit I	23
8	แผนผังต้นไม้วิวัฒนาการของหอยตะเกาตลอดชายฝั่งทะเลอันดามัน วิเคราะห์จากยีน <i>18S rRNA</i>	26
9	กราฟ mismatch distribution ของหอยตะเกาวิเคราะห์จากยีน <i>18S rRNA</i>	28
10	กราฟ Bayesian skyline plot ของหอยตะเกาวิเคราะห์จากยีน <i>18S rRNA</i>	28
11	แผนผังความสัมพันธ์ของแฮพลไทป์ของหอยตะเกาวิเคราะห์จาก ยีน <i>18S rRNA</i>	29

สารบัญภาคผนวก

ภาคผนวกที่		หน้า
1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอสโพลไทป์จำนวน 33 แอสโพลไทป์ที่ได้จากการศึกษาในยีน cytochrome oxidase subunit I รวม outgroup	42
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอสโพลไทป์จำนวน 6 แอสโพลไทป์ที่ได้จากการศึกษาในยีน cytochrome oxidase subunit I รวม outgroup	47
3	Manuscript การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ	49
4	ภาพกิจกรรมในการทำงานวิจัย	55



บทที่ 1

บทนำ

หอยตะเภาเป็นหอยสองฝาที่อาศัยอยู่ตามชายฝั่งทะเลในเขตน้ำขึ้นน้ำลงที่มีดินที่มีลักษณะเป็นทรายละเอียดปนโคลนเล็กน้อยแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในเขตมหาสมุทรอินเดียในประเทศไทย พบมากตามชายหาดตลอดแนวชายฝั่งของทะเลอันดามัน ในจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ จังหวัดพังงา และบางส่วนของจังหวัดระนองเนื่องจากหอยตะเภามีเนื้อที่มีลักษณะขาวนุ่มน่ารับประทานทำให้เป็นที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในจังหวัดตรังมีการจัดงานเทศกาลหอยตะเภาเป็นงานประจำปีทุกปี จากการที่มีการจับหอยตะเภามาบริโภคมากขึ้นทุกปีเป็นผลให้มีการลดลงของจำนวนหอยตะเภาอย่างเห็นได้ชัดและเนื่องจากแหล่งที่อยู่อาศัยของหอยตะเภาจะพบได้ในพื้นที่ที่จำกัด เช่น ในจังหวัดสตูลพบได้ในอำเภอละงูและอำเภอยี่งอ หรือจังหวัดตรังพบได้ในบริเวณหาดสำราญและอำเภอสีเกา เท่านั้น ดังนั้นจึงมีโอกาสมันจะสูญหายไปจากแหล่งที่อยู่เดิม จึงได้มีการศึกษาทดลองเพาะพันธุ์หอยตะเภาอย่างต่อเนื่องและประสบความสำเร็จในการกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์หอยตะเภาปล่อยเซลล์สืบพันธุ์และสามารถอนุบาลจนเป็นหอยวัยรุ่นได้ แต่พบว่าต้นทุนในการผลิตยังสูงอยู่มากและต้องใช้เทคนิคและทักษะทางวิชาการในขั้นสูง ดังนั้นแนวทางที่จะอนุรักษ์พันธุ์หอยตะเภาที่ใช้ต้นทุนน้อยที่สุดคือ การกำหนดมาตรการในการจับเพื่อรักษาแหล่งพันธุ์กรรมของพ่อแม่พันธุ์เอาไว้ แต่อย่างไรก็ตามมาตรการต่างๆเหล่านี้ควรจะต้องมีข้อมูลเบื้องต้นทางพันธุศาสตร์เพื่อใช้ในการจัดการเช่น ข้อมูลในการระบุกลุ่มทางพันธุกรรม (genetic stock) ข้อมูลทางโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากร (population genetic structure) และข้อมูลประวัติโครงสร้างประชากร (demographic history) ของหอยตะเภาในธรรมชาติเพื่อใช้ประกอบแต่พบว่าข้อมูลดังกล่าวของหอยตะเภายังไม่เคยมีมาก่อนโดยจากการค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาหอยตะเภาในประเทศไทยจากเอกสารที่เกี่ยวข้องพบว่าส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะพันธุ์ ชีววิทยา การจัดการและการใช้ประโยชน์

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาข้อมูลโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของหอยตะเภาเพื่อระบุกลุ่มพันธุกรรมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณยีน cytochrome c oxidase I และยีน 18S rRNA ข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบกลุ่มพันธุกรรมของหอยตะเภาเพื่อนำไปใช้ในการจัดการประชากรหอยตะเภาในธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นข้อมูลกลุ่มทางพันธุกรรมของแต่ละท้องถิ่นเพื่อที่จะให้นักปรับปรุงพันธุ์และนักอนุรักษ์นำไปใช้ให้เหมาะสมกับแหล่งพันธุกรรมของแต่ละท้องถิ่นเพื่อให้คงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยตะเภาเอาไว้ โดยในงานวิจัยครั้งนี้จะเน้นศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของหอยตะเภาในชายฝั่งทะเลอันดามันซึ่งเป็นแหล่งประมงแหล่งใหญ่ของหอยตะเภาในประเทศไทย

โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งอาจจะเกิดจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม การอพยพหรือการกลายพันธุ์ (Ayala, 1982; Slatkin, 1987) รูปแบบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรจะบ่งบอกถึงความสามารถในการอยู่รอดที่สิ่งมีชีวิตสามารถปรับตัวให้เหมาะสมกับแหล่งที่อยู่โดยแสดงออกในรูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมกับ

กลุ่มประชากร (Tudela *et al.*, 1999) ซึ่งสามารถนำข้อมูลโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรไปใช้ในการวางแผนจัดการทรัพยากรให้เหมาะสมกับแหล่งที่อยู่ได้ (Roldan *et al.*, 2000) อีกทั้งยังสามารถใช้ระบุกลุ่มทางพันธุกรรม (genetic stock) ของประชากรในธรรมชาติจากแหล่งอาศัยต่างๆ เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงได้

ตามพระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2558 ในมาตราที่ 9 มีการกล่าวถึงการส่งเสริมการมีส่วนร่วมและสนับสนุนชุมชนประมงท้องถิ่นในการจัดการการอนุรักษ์ การฟื้นฟู และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนจากทรัพยากรสัตว์น้ำรวมทั้งต้องมีการเผยแพร่ความรู้หรือข้อมูลข่าวสารลงสู่ชุมชนตั้งนั้น จึงเป็นโอกาสดีที่จะมีการเริ่มต้นศึกษาเพื่อหาข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อเป็นข้อมูลในการจัดการและการติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของสัตว์ทะเลต่อไปในอนาคตและจะได้เป็นข้อมูลในการเผยแพร่เพื่อลงสู่ชุมชนต่อไป โดยในแผนงานต่อไปจะนำผลการวิจัยไปบูรณาการกับการจัดการทางประมงด้วยวิธีการอื่นๆร่วมกับชุมชนเครือข่ายเพื่อหาข้อตกลงในการจัดการประมงชายฝั่งที่จะทำให้คงความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยตะเกาในท้องถิ่น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของหอยตะเกาที่อาศัยตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน
2. เพื่อวิเคราะห์ประวัติประชากรของหอยตะเกา ที่อาศัยตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน
3. เพื่อระบุกลุ่มทางพันธุกรรม (genetic stock) ของหอยตะเกาในประชากรธรรมชาติจากแหล่งอาศัยต่างๆ ตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน
4. เพื่อหาแนวทางในการจัดการอนุรักษ์หอยตะเกาที่อาศัยตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร

ปัจจุบันมีการตื่นตัวในการรักษาความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ในธรรมชาติเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากในอดีตที่ผ่านมามนุษย์มีการพัฒนาด้านต่างๆเป็นระยะเวลายาวนาน โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะให้ได้ผลลัพธ์สูงสุดแต่ให้ความสำคัญต่อผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยมากจึงทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ยั่งยืน จะเห็นได้จากตัวอย่างของการประมงที่เริ่มจับสัตว์น้ำได้น้อยลงหรือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ประสบกับปัญหาต่าง ๆ มากมาย เช่น โรคระบาดหรือสัตว์น้ำที่เลี้ยงมีขนาดไม่โตเหมือนในอดีตที่ผ่านมา

จากความตอนหนึ่งในพระราชดำรัสของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวพระราชนานแก่มหาชีกกลุ่มเกษตรกรทั่วประเทศ ณ โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดาเมื่อวันที่ 14 พฤษภาคม 2523 ว่า

“...ทรัพยากรด้านประมงจะต้องจัดเป็นระเบียบ ความสำคัญไม่ได้อยู่ที่ว่าปล่อยพันธุ์ปลาให้ดีหรือเลี้ยงปลาให้เติบโต ความสำคัญอยู่ที่ด้านบริหารการจับปลาเพื่อให้ประชาชนได้ประโยชน์จริงๆ...”

จากความในพระราชดำรัสดังกล่าวนำมาสู่แนวคิดในงานวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากว่าในการบริหารจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำอย่างยั่งยืนนั้นนอกจากจะต้องมีการจัดการทางการประมงที่ดีแล้ว ข้อมูลที่จำเป็นมากในการจัดการก็คือข้อมูลทางพันธุกรรมของสัตว์น้ำซึ่งจำเป็นที่จะต้องนำมาใช้พิจารณาประกอบในการจัดการเพื่อให้เหมาะสมกับแหล่งพันธุกรรมของสัตว์น้ำแต่ละท้องถิ่นเพื่อให้คงซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้ แต่พบว่าข้อมูลทางพันธุกรรมของหอยตะเภาซึ่งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่พบเฉพาะในทะเลอันดามัน ได้แก่ ข้อมูลทางโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรและข้อมูลประวัติโครงสร้างประชากรยังไม่เคยมีมาก่อน อีกทั้งตลอดระยะทางของชายฝั่งทะเลอันดามันที่เป็นแหล่งที่อยู่ของหอยตะเภามีสภาพภูมิประเทศชายฝั่งและกระแสน้ำที่แตกต่างกันซึ่งอาจเป็นปัจจัยในการขัดขวางการแลกเปลี่ยนสารทางพันธุกรรม (gene flow) ระหว่างประชากร ดังนั้นจึงน่าจะเป็นอีกปัจจัยที่จะทำให้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรในแต่ละจังหวัด ประกอบกับมีการจับหอยตะเภามาบริโภคเพิ่มมากขึ้นจึงน่าจะส่งผลกระทบต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นเพื่อศึกษาข้อมูลทางโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและข้อมูลประวัติโครงสร้างประชากรของหอยตะเภาในธรรมชาติ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ cytochrome c oxidase I และยีน 18S rRNA เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม ซึ่งนักเพาะพันธุ์และนักอนุรักษ์สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการจัดการประชากรหอยตะเภาในธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืนซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดการที่ยั่งยืนต่อไป

2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของหอยตะเภา

หอยตะเภามีชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า Leather Donax และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Donax scortum* มีการจำแนกทางอนุกรมวิธานดังนี้ (ภาพที่ 1)

Phylum	Mollusca
Class	Bivalvia (Pelecypoda)
Order	Veneroida
Family	Donacidae
Genus	<i>Donax</i>
Species	<i>Donax scortum</i>

เป็นหอยกาบคู่ เปลือกมีขนาดค่อนข้างใหญ่และหนาเป็นรูปสามเหลี่ยมคล้ายเรือสำเภาวางบ้านในบางท้องถิ่นจึงเรียกว่าหอยท้ายเภาหรือหอยท้ายสำเภาขนาดที่พบโดยทั่วไปยาวประมาณ 5 -10 ซม. หอยตะเภาจัดอยู่ในตระกูลเดียวกับหอยเสียบแต่มีขนาดใหญ่กว่ามาก



ภาพที่ 1 หอยตะเภา

รูปร่างลักษณะ

เปลือกแบ่งออกเป็นสองฝาที่มีด้านซ้ายขวาเท่ากันและยึดติดกันด้วยบานพับ (hinge) ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อที่มีลักษณะเหนียวและแข็งแรงใกล้ๆบานพับจะเป็นปุ่มนูนออกมาเรียกว่าก้านหอยซึ่งเป็นส่วนของเปลือกที่เกิดก่อนส่วนอื่น

รูปร่างลักษณะภายนอก

ที่สังเกตเห็นได้อย่างเด่นชัดคือเปลือกรูปสามเหลี่ยมที่มีปลายด้านท้ายโค้งงอขึ้นมีเส้นนูนเป็นสันพาดตามแนวยาวจากด้านหน้าไปด้านหลังตามแนวขอบเปลือกประมาณ 70-90 สันในบริเวณ

ส่วนหน้าสันนี้มีลักษณะเป็นแผ่นสูงขึ้นมาเล็กน้อยบริเวณส่วนกลางของเปลือกส่วนด้านท้ายสันจะมีลักษณะแหลมสูงขึ้นมาเป็นหนามแหลมซึ่งเห็นได้ชัดเจนในหอยที่มีขนาดเล็กเปลือกมีสีน้ำตาลอมเหลืองหรือน้ำตาลดำเนื่องจากในธรรมชาติหอยตะเภาชอบฝังตัวอยู่ในบริเวณดินที่มีลักษณะเป็นดินปนโคลนเลน

ลักษณะภายใน

เปลือกด้านในมีลักษณะเรียบลื่นเป็นมันมีลวดลายสีม่วงสลับขาวอวยวะรวมอยู่ภายในเปลือกมีเนื้อหรือเท้า (foot) สีขาวเหงือกปากท่อน้ำเข้าท่อน้ำออกส่วนของอวยวะภายในมีหัวใจตับกระเพาะอาหารลำไส้ไตและอวยวะสืบพันธุ์

การแพร่กระจาย

พบแพร่กระจายทั่วไปในเขตมหาสมุทรอินเดียในประเทศไทยมีรายงานว่าพบตามบริเวณชายหาดของจังหวัดตรังตั้งแต่หาดหัวหินหาดปากเมงหาดฉางกลางหาดเจ้าไหมและหาดสำราญโดยพบชุกชุมมากที่สุดบริเวณหาดปากเมงและพบได้เกือบตลอดปีนอกจากนี้ยังพบหอยตะเภาในบริเวณชายฝั่งทะเลของบางจังหวัดที่มีชายฝั่งทะเลติดต่อกับจังหวัดตรังคือชายฝั่งของจังหวัดสตูลและจังหวัดกระบี่ รวมถึงส่วนหนึ่งของจังหวัดพังงาและบางส่วนของจังหวัดระนอง (นภารัตน์ ประไพวงศ์ และ มีชัย แก้วศรีทอง, 2549)

ชีววิทยาของหอยตะเภา

หอยตะเภามีเท้าที่แข็งแรงสามารถใช้ในการเคลื่อนที่และฝังตัวลงในทรายได้อย่างรวดเร็วฝังตัวลึกลงไปใต้ดินประมาณ 1-2 นิ้วขณะฝังตัวจะยื่นท่อน้ำออกมาเพื่อกินอาหารและหายใจกินอาหารโดยการดูดน้ำผ่านท่อน้ำเข้าและกรองอาหารโดยใช้เหงือกแล้วส่งต่อไปที่ปากและกระเพาะอาหารในขณะที่ดูดน้ำเข้านั้นจะมีการหายใจเกิดขึ้นไปด้วยโดยใช้เหงือกเป็นอวยวะแลกเปลี่ยนออกซิเจนในน้ำขับถ่ายและปล่อยของเสียออกมาทางท่อน้ำออกท่อน้ำทั้งสองอันเมื่อหดเข้าไปจะเห็นเป็นรูเล็กๆ 2 รูติดกันบนผิวดิน (นภารัตน์ ประไพวงศ์ และ มีชัย แก้วศรีทอง, 2549)

ความสำคัญทางเศรษฐกิจของหอยตะเภา

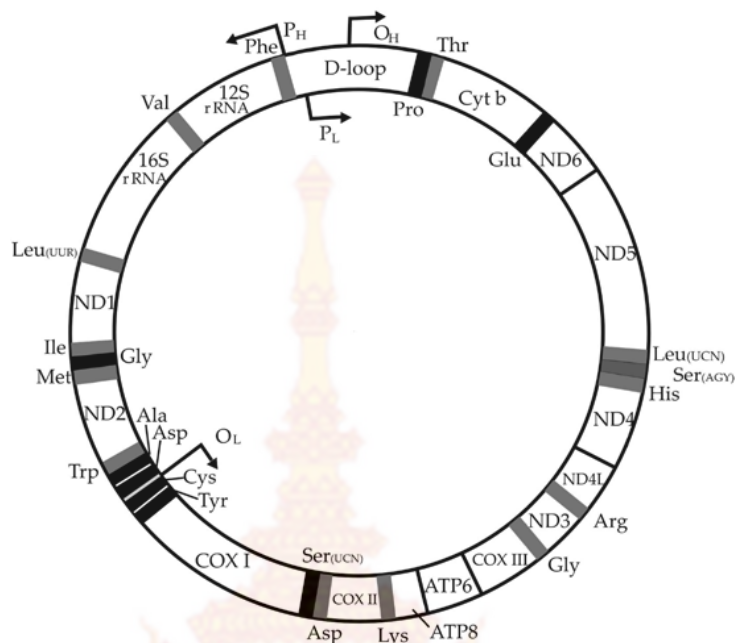
หอยตะเภาเป็นหอยสองฝาที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคในแถบจังหวัดทะเลอันดามันเนื่องจากมีรสชาติอร่อยเนื้อมีลักษณะขาวนุ่มนวลรับประทานและรสชาติหวานอร่อยไม่เหมือนหอยชนิดอื่นๆทั้งยังสามารถนำไปประกอบอาหารได้หลายประเภทเช่นต้มแกงผัดยำทำให้เป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายกันมานานปัจจุบันหอยตะเภาเป็นที่สนใจของนักท่องเที่ยว โดยเฉพาะในจังหวัดตรังที่ได้มีการจัดเทศกาลหอยตะเภาและเป็นโปรแกรมหนึ่งของการท่องเที่ยวของจังหวัด ซึ่งเป็นการกระตุ้นทางเศรษฐกิจได้อีกทางหนึ่ง การทำการประมงหอยตะเภาเป็นการทำการประมงในครัวเรือนทำได้เกือบตลอดปีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันออกไปโดยทั่วไปจะทำการประมงหอยตะเภาได้ในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนพฤษภาคมชาวบ้านบริเวณชายหาดหรือใกล้เคียงจะลงไปทำการเก็บหอยในเวลาที่มีน้ำลงต่ำสุดของวันในช่วงแรมหรือขึ้น 13 คำจนถึงขึ้นหรือแรม 5-6 คำแล้วแต่ฤดูกาลโดยเฉพาะในช่วงเทศกาลการจับหอยตะเภา มีราคาจำหน่ายสูงถึงกิโลกรัมละ 300 -500 บาทในช่วงหลายปีที่ผ่านมามีแนวโน้มการจับหอยตะเภาได้ลดลงเนื่องจากมีปริมาณความต้องการสูงขึ้นจึงทำให้มีปริมาณการจับเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วยอีกทั้งมีการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ทำลายล้างเช่น การลากหอยโดยใช้เครื่องมือ

ที่ไม่เหมาะสม รวมไปถึงการจับหอยโดยไม่คำนึงถึงขนาด จึงมีความเสี่ยงเป็นอย่างมากที่หอยตะเกา จะเกิดการสูญหายไปจากแหล่งที่อยู่เดิม

2.2 ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในสัตว์

การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์ทะเลมีเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการ ตรวจสอบหลายวิธี เช่น Random amplification of polymorphic DNA (RAPD), Amplified fragment Length Polymorphism (AFLP) และ Simple Sequence Repeat (SSR) (Klinbunga *et al.*, 2007) ปัจจุบันนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่กำลังได้รับความนิยมในปัจจุบันได้แก่ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ เช่น มีการถ่ายทอดพันธุกรรมทางแม่ทำให้มีความคล้ายคลึงกันของสมาชิกภายในประชากรจึงทำให้ไม่ต้องใช้ตัวอย่างในปริมาณที่มาก ในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง (Brown *et al.*, 1982) อีกทั้งไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีจำนวนมากในแต่ละเซลล์ทำให้การสกัดดีเอ็นเอในแต่ละครั้งจะได้ปริมาณดีเอ็นเอเป็นจำนวนมาก รวมทั้งไม่มีการเกิด recombination ทำให้สามารถตรวจสอบสายสัมพันธ์ภายในประชากรได้และที่สำคัญคือมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงซึ่งเหมาะแก่การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม โครงสร้างทางพันธุศาสตร์ ประชากรและประวัติประชากร (Guo *et al.*, 2011)

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอประกอบไปด้วยดีเอ็นเอประมาณ 2-10 ซ้ำ (Boore, 1999) ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในสัตว์จะมีลักษณะเป็น circular DNA โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 15,000-17,000 คู่เบส ประกอบไปด้วยยีนจำนวน 37 ยีน ได้แก่ยีนที่แปลรหัสเพื่อเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ oxidative phosphorylation 13 ยีน แปลรหัสเป็น transfer RNAs 22 ยีน และแปลรหัสเป็น small และ large subunits of ribosomal RNAs จำนวน 2 ยีน ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ มีการจัดเรียงตัวของยีนที่ไม่ทับซ้อนและไม่มีส่วนที่เป็นอินทรอน มีส่วนที่เรียกว่าคอนโทรลรีเจียนซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีน (Crease, 1999; Avise, 1986; Ouithavon, 2009) บริเวณคอนโทรลรีเจียนมีชื่อเรียกอีกชื่อว่า D-loop เป็นบริเวณที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงกว่าบริเวณอื่นในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิด replication และ expression (Boore, 1999) อัตราการเกิด nucleotide substitution ของบริเวณคอนโทรลรีเจียนจะสูงกว่าบริเวณอื่น 5-10 เท่าและสูงกว่าใน nuclear genes 25-100 เท่า



ภาพที่ 2 โครงสร้างของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ
ที่มา: Avise (1994)

2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นส่วนหนึ่งของความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ซึ่งประกอบด้วยความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ความหลากหลายของชนิด (species diversity) และความหลากหลายทางนิเวศวิทยา (ecological diversity) ความหลากหลายทางพันธุกรรมหมายถึงความผันแปรของยีนหรือหน่วยของพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรเกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน (recombination) และการรวมตัวกันใหม่ (rearrangement) ของยีนหรือโครโมโซมในระหว่างการแบ่งตัวแบบไมโอซิสรวมทั้งการกลาย ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเกิดขึ้นเมื่อสมาชิกในประชากรมีการแยกตัวออกจากประชากรเดิมและเริ่มแยกกลุ่มผสมพันธุ์ ลดการถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างประชากรทำให้ความถี่ของอัลลีลเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งถ้ามีการถ่ายเทของยีนมากประชากรก็มีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ถ้ามีการถ่ายเทของยีนน้อย หรือไม่เลยประชากรก็จะแตกต่างกันมากจนในระยะเวลาหนึ่งประชากรที่แยกจากกันจะมีวิวัฒนาการที่แตกต่างกันเนื่องมาจากการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างประชากร (Frankham *et al*, 2002) และนำไปสู่การวิวัฒนาการเกิดเป็นชนิดพันธุ์ใหม่ (speciation)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อความอยู่รอดของชนิดพันธุ์ (species) โดยสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ จะไม่สามารถปรับตัวได้หากสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปก็จะนำไปสู่การสูญพันธุ์ นอกจากนั้นความหลากหลายที่ต่ำหากเป็นผลจากจำนวนพอ

แม่พันธุ์ทางพันธุกรรม (effective population size, N_e) น้อยจะนำไปสู่การผสมเลือดชิด ซึ่งมีผลให้ลักษณะที่จำเป็นต่อการอยู่รอด เสื่อมถอยลง การอนุรักษ์จึงจำเป็นต้องรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากรไว้ ซึ่งจะทำให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่อมีข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเป้าหมาย (Frankham *et al.*, 2002)

กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมภายในประชากร

ประชากรในธรรมชาติมักมีพฤติกรรมที่เบี่ยงเบนไปจากประชากรทางทฤษฎี เนื่องจากเกิดกระบวนการทางพันธุกรรมต่างๆ กระบวนการสำคัญที่เกี่ยวข้องมีดังนี้คือ

1. การขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) คือการที่ความถี่ของอัลลีลเปลี่ยนแปลงไปอย่างไม่มีทิศทาง เกิดจากการที่มีพันธุกรรมเพียงบางส่วนเท่านั้นที่ได้ถ่ายทอดไปสู่ชั่วอายุต่อไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง 2 ประการ คือ (1) พันธุกรรมของรุ่นลูกแตกต่างจากรุ่นพ่อแม่ (2) ประชากรจะสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอัลลีลจำนวนหนึ่งจะสูญหายไปโดยเฉพาะอัลลีลที่มีความถี่ต่ำ ดังนั้นจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งจะลดลงเมื่อเทียบกับประชากรธรรมชาติ กระบวนการขาดช่วงทางพันธุกรรมมักเกิดขึ้นกับประชากรขนาดเล็กมากกว่าประชากรขนาดใหญ่

2. การถ่ายเทยีนระหว่างประชากร (gene flow) เกิดจากสมาชิกของประชากรหนึ่งไปผสมพันธุ์กับอีกประชากรหนึ่ง หากสิ่งมีชีวิต 2 กลุ่มมีการถ่ายเทยีนในระดับที่สูง ความแตกต่างระหว่างประชากร 2 กลุ่ม ก็จะน้อยลงจนกระทั่งเป็นประชากรเดียว หากระดับการถ่ายเทยีนระหว่างกลุ่มต่ำ ทั้งสองกลุ่มก็อาจมีความแตกต่างทางพันธุกรรม ปัจจัยที่ขัดขวางการถ่ายเทยีนระหว่างกลุ่ม อาจรวมถึงปัจจัยทางกายภาพ เช่น สภาพภูมิประเทศหรือสิ่งก่อสร้าง และปัจจัยทางชีววิทยา เช่น ความจำเพาะต่อแหล่งวางไข่ หรือการมีฤดูกาลวางไข่ต่างกัน

3. การเกิดสภาวะคอขวด (demographic bottlenecks) เกิดจากการที่แต่ละจีโนไทป์มีโอกาสถูกคัดเลือกออกจากประชากรได้ไม่เท่ากัน การคัดเลือกในประชากรสัตว์น้ำธรรมชาติสามารถเกิดได้จากสภาวะธรรมชาติ เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำหรือจากการกระทำของมนุษย์ เช่น การใช้เครื่องมือที่จำเพาะต่อสัตว์ลักษณะหนึ่ง การคัดเลือกอาจทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเท่าเดิมหรือลดลงขึ้นอยู่กับลักษณะจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซโกตหรือเฮเทโรไซโกตที่ถูกคัดออกจากประชากร ผลของการคัดเลือกต่อลักษณะปริมาณคือการเปลี่ยนค่าเฉลี่ยของลักษณะของประชากรรุ่นถัดไป (วันศุกร์และจิราภรณ์, 2551)

2.4 การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบต่อความถี่ของยีนหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งอาจเกิดจากการปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม การอพยพหรือการกลายพันธุ์ (Ayala, 1982; Slatkin, 1987)รูปแบบโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรจะบ่งบอกถึงความสามารถในการอยู่รอดที่สิ่งมีชีวิตสามารถปรับตัวให้เหมาะสมกับแหล่งที่อยู่ต่างๆโดยแสดงออกในรูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมกับกลุ่มประชากร โดยการเกิดโครงสร้างประชากรเกิดจากการที่มีการขัดขวางความสามารถในการส่งถ่ายยีนในกลุ่มประชากรเช่นการขัดขวางการเกิดการถ่ายเทยีนอัน

เนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมทางภูมิศาสตร์ หรือความสามารถในการสืบพันธุ์ วิธีการวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรนั้นมีหลายวิธีเช่น การเปรียบเทียบค่า heterozygosity หรือการเปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรม สำหรับการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นนิยมใช้วิธีการเปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยวิธี Analysis of molecular variance (AMOVA) โดย AMOVA จะทำการประมาณการความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยตรงจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยคำนวณในรูปแบบของ squared-distances matrix จากการเปรียบเทียบระหว่างคู่ของแฮพลไทป์โดยจะคำนวณออกมาเป็นความแปรปรวนออกมาแล้วแสดงค่าในรูปแบบของค่า F -statistic analogs ตามระดับของการแบ่งกลุ่มประชากรตรวจสอบ (Excoffier, *et al.* 2010)

2.5 การศึกษาประวัติประชากร

การศึกษาประวัติประชากรเป็นการศึกษาถึงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของ effective population size ในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถที่จะนำมาสร้างเป็นโมเดลของรูปแบบของการกลายพันธุ์เพื่อใช้คาดคะเนการเปลี่ยนแปลงที่ผ่านมาได้เช่น การตรวจสอบการขยายขนาดของประชากรโดยการศึกษาย้อนกลับด้วยวิธีการทาง coalescent เพื่อคาดคะเนประชากรก่อนและหลังการขยายตัว (Tajima, 1989 ; Rogers and Harpending, 1992) อีกวิธีหนึ่งซึ่งนิยมใช้ในการตรวจสอบประวัติประชากรคือการศึกษานิวตริลิตี (Tajima's D and Fu's F statistics) โดยวิธีนี้เป็นการตรวจสอบประชากรที่มีการเบี่ยงเบนไปจากประชากรที่เป็น neutral population ซึ่งเป็นประชากรที่มีการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนอันเนื่องมาจากปัจจัยของการเกิดการกลายพันธุ์และ genetic drift เท่านั้น และยังสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ population size ได้อีกด้วย (Mousset *et al.*, 2004) โดยในการตรวจสอบด้วยวิธี Tajima's D test และ Fu's F_s test หากมีค่าติดลบ แสดงว่าประชากรเคย ผ่านการถูกคัดเลือกแบบ purifying selection หรือเคยเกิด population expansion มาก่อน โดยค่า Fu's F_s จะมีความสามารถในการตรวจสอบการเกิด population expansion ได้สูงหากมีค่าติดลบ (Fu, 1997) การตรวจสอบประวัติประชากรอีกวิธีที่นิยมคือการตรวจสอบด้วยวิธี Mismatch distribution โดยวิธี Mismatch distribution เป็นการตรวจสอบการแพร่กระจายของความถี่เมื่อเปรียบเทียบเป็นรายคู่ของจำนวนของการกลายพันธุ์ โดยแสดงออกมาในรูปแบบของพารามิเตอร์ ได้แก่ θ_0 , θ_1 (ก่อนและหลัง population growth) และค่า τ (ระยะเวลาในการกลายพันธุ์) และยังแสดงผลในรูปแบบของกราฟการกระจายได้ (Rogers and Harpending, 1992) โดยหากกราฟเป็นรูปแบบ smooth unimodal distributions แสดงว่ามีการสะสมของการเกิดการกลายพันธุ์มาเรื่อยๆแสดงว่าประชากรน่าจะเริ่มมีการขยายขนาดมาเมื่อไม่นานมานี้ แต่ถ้าหากว่ารูปแบบของกราฟเป็นแบบ ragged multimodal distributions แสดงว่าประชากรมีการขาดหายของการกลายพันธุ์มานานการฉีกขาดของกราฟเป็นเพียงการกลายพันธุ์เพื่อรักษาความสมดุลในประชากรเท่านั้นซึ่งแสดงว่าประชากรมีขนาดที่คงที่และเป็นประชากรที่เป็น constant population size (Cassone and Boulding, 2006)

2.6 การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในหอยทะเล

การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรหอยตะเกียนนั้นไม่เคยมีรายงานมาก่อนแต่มีรายงานในกลุ่มหอยที่ใกล้เคียงคือในหอย Queen conch (*Strombus gigas*) โดยการศึกษาของ Perez- Enriquez *et al.* (2011) ซึ่งได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอย Queen conch (*Strombus gigas*) บริเวณหมู่เกาะแคริบเบียนและที่อ่าวเม็กซิโกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และ cytb ผลการศึกษาพบว่าหอย Queen conch ที่อาศัยในแถบบริเวณดังกล่าวเคยผ่านปรากฏการณ์คอขวดมาก่อนและพบว่าไม่มีโครงสร้างประชากรเกิดขึ้น อีกการศึกษาเป็นการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ของหอย Queen conch ในบริเวณตะวันตกเฉียงใต้ของหมู่เกาะแคริบเบียนและตลอดชายฝั่งของเขตไหล่ทวีป Columbian พบว่าบริเวณดังกล่าวมีความแตกต่างของโครงสร้างประชากรเกิดขึ้น (Marquez *et al.* 2012) ส่วนอีกบริเวณที่มีการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของหอย Queen conch คือตลอดแหลมยูคาทานโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์พบว่าบริเวณดังกล่าวไม่มีการแยกกลุ่มประชากรซึ่งอาจเกิดจากการที่มี gene flow สูงจึงสามารถจัดการบริหารทรัพยากรร่วมกันได้ (Bustillos *et al.* 2011) สำหรับเครื่องหมายพันธุกรรมอื่นที่มีการศึกษาในหอย Queen conch คือ ตำแหน่งของ polymorphic enzyme loci ของประชากรหอย 17 บริเวณรอบหมู่เกาะแคริบเบียนพบว่าบริเวณดังกล่าวมีการเกิด gene flow ค่อนข้างสูงจึงไม่มีการแบ่งแยกกลุ่มประชากรยกเว้นบริเวณ Bermuda ที่มีความแตกต่างของโครงสร้างประชากรกับกลุ่มอื่น (Mitton *et al.* 1989)



2.7 พันธุศาสตร์กับการจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำ

ปัจจุบันกิจกรรมทางการประมงด้านการจับสัตว์น้ำและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วมีการนำความรู้ทางพันธุศาสตร์มาใช้ในการจัดการทรัพยากรเพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืนและมีประสิทธิภาพสูงสุดการที่สัตว์น้ำต่างชนิดกันมีลักษณะการดำรงชีวิต อัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอด และรูปแบบการสืบพันธุ์ที่แตกต่างกันเป็นผลเนื่องมาจากพันธุกรรมที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดปัจจุบันเทคนิคทางด้านอนุพันธุศาสตร์มีความก้าวหน้าเป็นอย่างมากทำให้สามารถตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ในระดับโมเลกุลโดยอาศัยโมเลกุลเครื่องหมาย เช่น โปรตีนเครื่องหมาย ไดแกอัลโลไซมซึ่งเป็นการตรวจสอบและเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนชนิดต่างๆและดีเอ็นเอเครื่องหมายไดแก ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellites), เครื่องหมายอาร์เอพีดี (Randomly Amplified Polymorphic DNA; RAPD), เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (Amplified fragment length; polymorphism; AFLP) และเครื่องหมายจากไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเอ รวมทั้งการตรวจสอบความแตกต่างในการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณต่างๆ ซึ่งดีเอ็นเอเครื่องหมายสามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ละเอียดและถูกต้องกว่าโปรตีนเครื่องหมายและใช้ปริมาณตัวอย่างในการตรวจสอบเพียงเล็กน้อย ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ ในประเทศไทยมีประโยชน์ต่อการวางแผนและการจัดการในเชิงอนุรักษ์ไม่ใหม่มีการปนของสายพันธุ์ที่ทำให้สูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมและอาจทำลายลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยง การปรับปรุงพันธุ์ การจัดการเกี่ยวกับโปรแกรมการคัดเลือกเพื่อการผสมพันธุ์ ความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากร และความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของสัตว์น้ำ ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์น้ำแต่ละชนิดทั้งระดับภายในประชากรและแต่ละประชากรจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำแต่ละชนิด ซึ่งความรู้ที่ได้จากงานวิจัยพันธุศาสตร์พื้นฐานสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดเป็นอย่างดี (Frankham *et al.*, 2002)

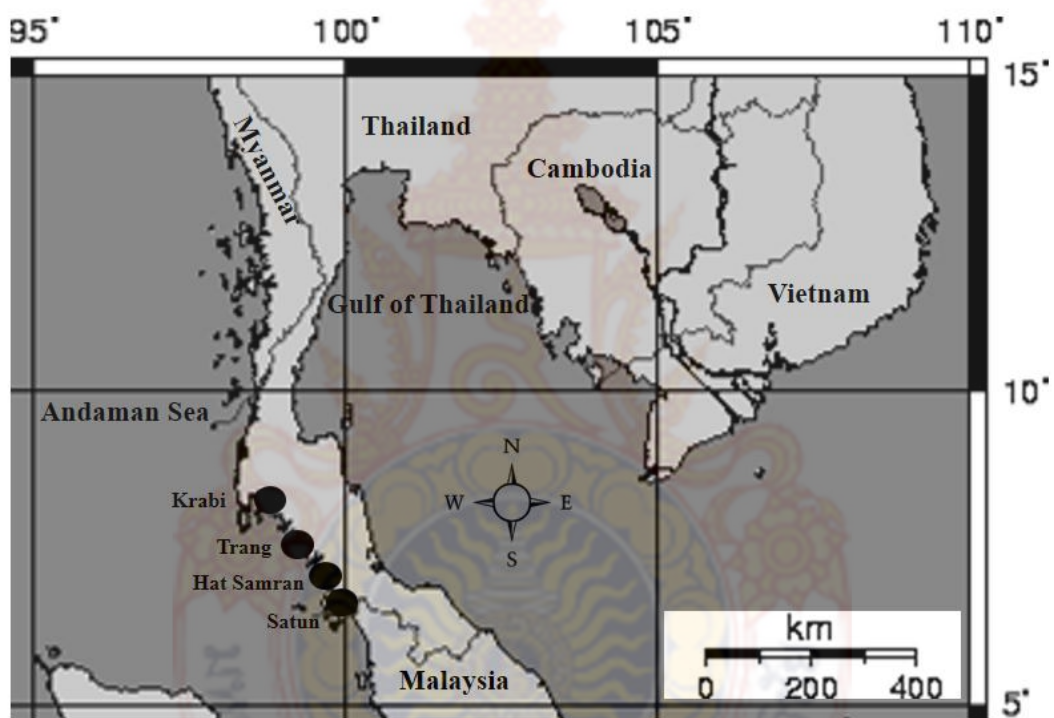


บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1. วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างหอยตะเภาจากจังหวัดสตูล, อำเภอสทิงพระ, จังหวัดตรัง และจังหวัดกระบี่ (ภาพที่ 3) หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างสดไว้ในน้ำแข็งแล้วส่งเข้าห้องปฏิบัติการและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3 บริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่างหอยตะเภาตลอดชายฝั่งทะเลอันดามัน

3.1.2 ชุดสกัดดีเอ็นเอ

Genomic DNA Mini Kit

3.1.3 ชุดทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

Gel/PCR DNA fragments extraction kit

3.1.4 โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ประชากร

3.2. การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเนื้อปลาน้ำหนักประมาณ 20–30 มิลลิกรัม มาสกัด total genomic DNA ด้วยชุดสกัด Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN, BIOTECH CORP.)

3.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

3.2.2.1 การออกแบบไพรเมอร์จากยีน cytochrome oxidase subunit I

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณยีน cytochrome oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของหอยตะเกียงจากฐานข้อมูล NCBI ด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ forward primer DS_COI_H1 5' CCT TTA TCT CTT ATT TGG TGC C 3' และ reverse primer DS_COI_L1 5' GAA GAG ATG TTG ATA AAG AAT GGG 3' ในหลอดพีซีอาร์ประกอบด้วย 10X *Taq* buffer 5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 7.5 ไมโครลิตร, 2 mM dNTPs mix 4 ไมโครลิตร, 10 μ M primer forward 2 ไมโครลิตร, 10 μ M primer reverse 2 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (RBCbiosciences, USA) 0.5 ไมโครลิตร (2.5 unit), DNA template 5 ไมโครลิตร (50-100 ng) และ ultrapure water 24 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่อง Mastercycler, Eppendorf (Germany) เริ่มต้นโดยการแยกสายดีเอ็นเอ (initial denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 4 นาทีจากนั้นแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 40 วินาที ลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิเพื่อต่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาทีรวมเป็นจำนวน 35 รอบ และใช้อุณหภูมิสุดท้ายเพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

3.2.2.2 การออกแบบไพรเมอร์จากยีน 18S rRNA

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณยีน 18S rRNA ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของหอยตะเกียงจากฐานข้อมูล NCBI ด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ forward primer DS_18SrRNA_H1: 5' CAA CCT GGT TGA TCC TGC CAG T 3' และ reverse primer DS_18SrRNA_L1: 5' CTG ATC CTT CTG CAG GTT CAC CTA C 3' ในหลอดพีซีอาร์ประกอบด้วย 10X *Taq* buffer 5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 7.5 ไมโครลิตร, 2 mM dNTPs mix 4 ไมโครลิตร, 10 μ M primer forward 2 ไมโครลิตร, 10 μ M primer reverse 2 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (RBCbiosciences, USA) 0.5 ไมโครลิตร (2.5 unit), DNA template 5 ไมโครลิตร (50-100 ng) และ ultrapure water 24 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่อง Mastercycler, Eppendorf (Germany) เริ่มต้นโดยการแยกสายดีเอ็นเอ (initial denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 4 นาทีจากนั้นแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 40 วินาที ลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิเพื่อต่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาทีรวมเป็นจำนวน 35 รอบ และใช้อุณหภูมิสุดท้ายเพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

3.2.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN, BIOTECH CORP.) จากนั้นส่งดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการ (1ST Base Laboratory, Malaysia)

3.3. การจัดการข้อมูลและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

3.3.1 การจัดการข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

เชื่อมต่อข้อมูลชิ้นส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม CAP3 software (Huang and Madan, 1999) ทำการ alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW version 2.0.12 (Larkin *et al.*, 2007) แล้วตรวจสอบความถูกต้องด้วยสายตาอีกครั้ง

3.3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยหาค่า nucleotide diversity (π ; Nei, 1987), haplotype diversity (h ; Nei, 1987) และค่า mean number of nucleotide differences ระหว่างแฮพลไทป์ทั้งหมดด้วยโปรแกรม DnaSP version 5.00 (Librado and Rozas, 2009)

3.4. การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

3.4.1 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

วิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี analysis of molecular variance (AMOVA) เพื่อเปรียบเทียบระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรโดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations

3.4.2 ระยะห่างทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรด้วยวิธี pairwise F_{ST} ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010)

3.4.3 การวิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

สร้างต้นไม้วิวัฒนาการของแต่ละแฮพลไทป์โดยใช้ Neighbor-joining ด้วยวิธี kimura -2-parameter ทำ 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007)

3.5. การวิเคราะห์ประวัติประชากร

3.5.1 ทดสอบ neutrality test

วิเคราะห์ค่า Tajima's D (Tajima, 1989) และ Fu's F_s (Fu, 1997) เพื่อทดสอบการเบี่ยงเบนของประชากรจาก neutral population ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010)

3.5.2 ทดสอบ mismatch distribution

วิเคราะห์ mismatch distribution เพื่อศึกษาการขยายขนาดของประชากรภายใต้สมมติฐาน sudden expansion model โดยใช้ค่าทดสอบ Harpending Raggedness index (Harpending, 1994) และ sum of squared deviations (SSD) เพื่อทดสอบ goodness-of-fit ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) ประเมินขนาดของประชากรด้วยพารามิเตอร์ θ_0 และ θ_1 เมื่อ θ_0 และ θ_1 เท่ากับ $2N\mu$ เมื่อ N คือค่า effective female population size

3.5.3 การวิเคราะห์การขยายขนาดของประชากร (Bayesian skyline plot)

วิเคราะห์การขยายขนาดของประชากรโดยใช้วิธี Bayesian skyline analysis (BSP) คำนวณโดยใช้โปรแกรม BEAST/BEAUTi ver. 1.7.2 (Drummond et al., 2012) เพื่อหาการเปลี่ยนแปลง effective population size (N_e) เมื่อเทียบกับระยะเวลาที่ผ่านมา โดยใช้โมเดล substitution models ที่ดีที่สุดที่ทดสอบได้จากโปรแกรม jModelTest 2.1.7 (Darriba et al., 2012) โดยใช้อัตรา evolutionary rate ที่ 2.0 % per million years ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 20 ล้ำรอบด้วยโปรแกรม Markov chain Monte Carlo (MCMC) โดยใช้ relaxed molecular clock model จากนั้นสร้างกราฟประวัติประชากรด้วยโปรแกรม Tracer ver. 1.6 (Rambaut et al., 2014)

3.5.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างแฮปโลไทป์ (Minimum spanning network)

สร้างแผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮปโลไทป์โดยใช้ค่า mean number of pairwise differences ระหว่างแฮปโลไทป์ด้วยโปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาจากยีน cytochrome oxidase subunit I

4.1.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างทั้งหมด 115 ตัว วิเคราะห์จากลำดับเบส 426 คู่เบส มีตำแหน่ง polymorphic sites 29 ตำแหน่ง มีแฮพลอไทป์ทั้งหมด 32 แฮพลอไทป์ประกอบไปด้วยแฮพลอไทป์ที่เป็น shared haplotype จำนวน 13 แฮพลอไทป์ แบ่งเป็นแฮพลอไทป์ที่ shared haplotype ระหว่างประชากร 11 แฮพลอไทป์และ shared haplotype ภายในประชากร 2 แฮพลอไทป์ โดยแฮพลอไทป์ H04, H06, H07 และ H08 เป็นแฮพลอไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกแหล่งตัวอย่าง ทุกแหล่งตัวอย่างมี rare haplotype และมีจำนวนรวมทั้งหมด 19 แฮพลอไทป์ โดยจังหวัดกระบี่มี rare haplotype มากที่สุด 8 แฮพลอไทป์ รองลงมาคือจังหวัดสตูล 5 แฮพลอไทป์ อำเภอสรรพยา 4 แฮพลอไทป์และจังหวัดตรัง 2 แฮพลอไทป์ (ตารางที่ 1) สำหรับค่า haplotype diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.810-0.921 ส่วนค่า nucleotide diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.00401-0.00612 โดยค่า haplotype diversity ของประชากรรวมทั้งหมดมีค่า 0.887 ± 0.017 และค่า nucleotide diversity ของประชากรรวมทั้งหมดมีค่า 0.00500 ± 0.00032 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมได้แก่ จำนวนแฮพลอไทป์, จำนวน polymorphic sites, haplotype diversity (h) และ nucleotide diversity (π) ของแต่ละจังหวัดแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 การกระจายของแฮพลোটাইป์ในแต่ละแหล่งตัวอย่างวิเคราะห์จากยีน
cytochrome oxidase subunit I

Haplotype	Satun	Hat Samran	Trang	Krabi	Total
H01	2	-	1	-	3
H02	1	1	-	-	2
H03	1	-	1	1	3
H04	8	5	3	8	24
H05	1	-	-	1	2
H06	5	11	7	3	26
H07	1	1	1	1	4
H08	4	4	2	4	14
H09	2	-	3	2	7
H10	1	-	-	-	1
H11	1	-	-	-	1
H12	1	-	1	1	3
H13	1	-	-	-	1
H14	1	-	-	-	1
H15	1	-	-	-	1
H16	-	1	-	-	1
H17	-	1	-	-	1
H18	-	1	-	-	1
H19	-	2	1	1	4

H20 - 1 - - 1

ตารางที่ 1 การกระจายของแฮปโลไทป์ในแต่ละแหล่งตัวอย่างวิเคราะห์จากยีน
cytochrome oxidase subunit I (ต่อ)

Haplotype	Satun	Hat Samran	Trang	Krabi	Total
H21	-	-	1	-	1
H22	-	-	2	-	2
H23	-	-	1	-	1
H24	-	-	-	1	1
H25	-	-	-	1	1
H26	-	-	-	1	1
H27	-	-	-	2	2
H28	-	-	-	1	1
H29	-	-	-	1	1
H30	-	-	-	1	1
H31	-	-	-	1	1
H32	-	-	-	1	1
Total	31	28	24	32	115

ตารางที่ 2 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยตะเภาวิเคราะห์จากยีน cytochrome oxidase subunit I

Collecting localities	<i>N</i>	No. polymorphic sites	No. haplotypes	Haplotype diversity (<i>h</i>) (mean±SD)	Nucleotide diversity (π) (mean±SD)
Satun	31	15	15	0.901±0.035	0.00553±0.00881
Hat Samran	28	9	10	0.810±0.059	0.00401±0.00051
Trang	24	15	12	0.895±0.045	0.00612±0.00067
Krabi	32	20	18	0.921±0.034	0.00600±0.00066
Total	115	29	32	0.887±0.017	0.00500±0.00032

4.1.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรพบว่าประชากรหอยตะเภาในทะเลอันดามันไม่มีโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร โดยมีค่า $\Phi_{ST} = -0.00009$ ($p = 0.426$) ประชากรมีความแปรปรวนภายในกลุ่ม 100.01 เปอร์เซ็นต์ และความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากร -0.01 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ผลการวิเคราะห์ค่า pairwise F_{ST} พบว่าประชากรแต่ละแหล่งตัวอย่างไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (ตารางที่ 4) ผลการศึกษาแผนผังต้นไม้วิวัฒนาการพบว่าแฮพลไทป์มีการกระจายตัวโดยไม่มี การแบ่งแยกเป็นกลุ่มประชากร (ภาพที่ 4)

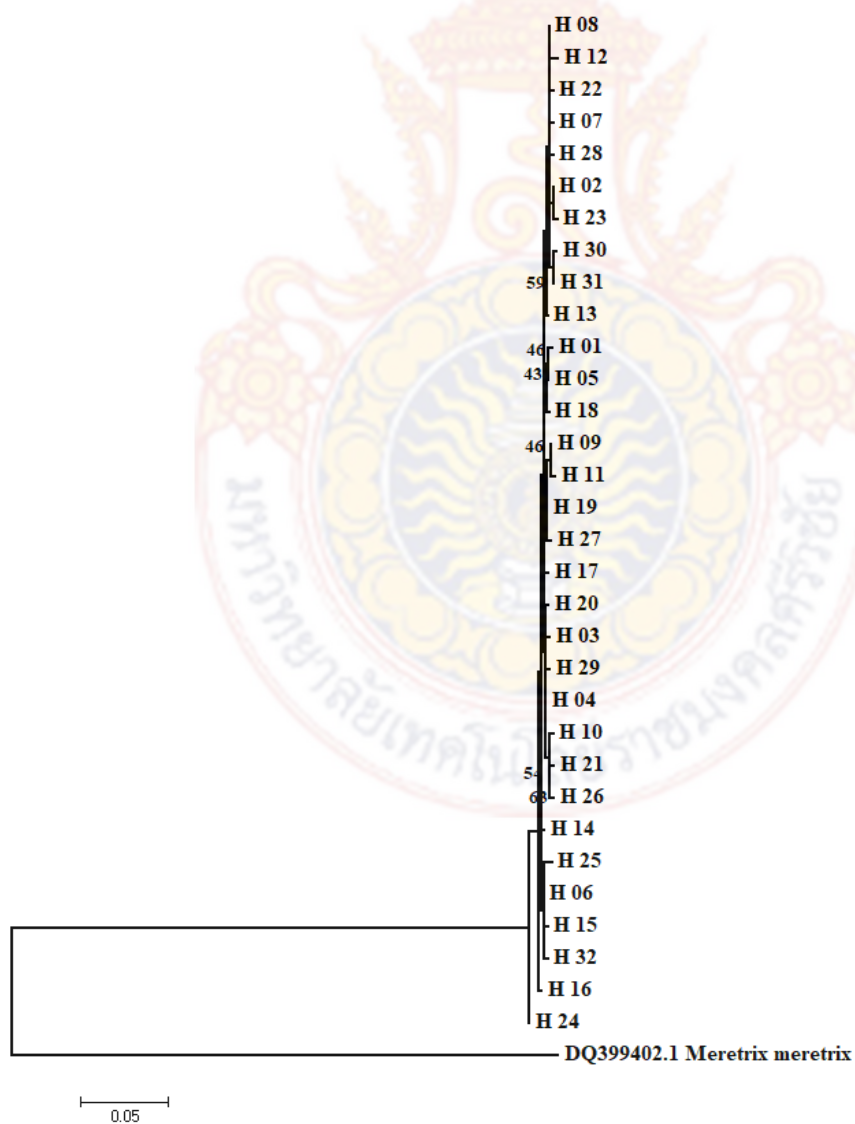
ตารางที่ 3 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรวิเคราะห์ด้วยวิธี AMOVA จากยีน cytochrome oxidase subunit I ของหอยตะเภา

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	<i>p</i> -value
Among populations	3	3.451	-0.0001Va	-0.01	$\Phi_{ST} = -0.00009$ ($p=0.426$)
Within populations	111	128.010	1.15324Vb	100.01	
Total	114	131.461	1.15314		

ตารางที่ 4 ค่า pairwise F_{ST} ของหอยตะเภาโดยวิเคราะห์จากยีน cytochrome oxidase subunit I

	Satun	Hat Samran	Trang	Krabi
Satun	-	0.21186	0.97565	0.90743
Hat Samran	0.01132	-	0.20661	0.05099
Trang	-0.02573	0.01268	-	0.84566
Krabi	-0.01632	0.03840	-0.01634	-

หมายเหตุ: ค่าที่อยู่มุมด้านบนคือค่า p - value



ภาพที่ 4 แผนผังต้นไม้วิวัฒนาการของหอยตะเภาตลอดชายฝั่งทะเลอันดามันวิเคราะห์จากยีน

cytochrome oxidase subunit

4.1.3 ประวัติประชากร

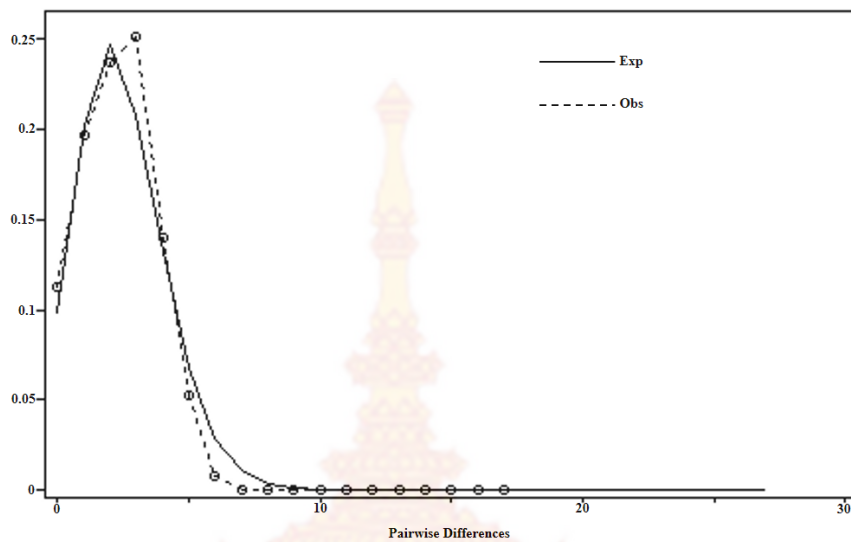
จากการวิเคราะห์ประวัติประชากร พบว่าประชากรเบี่ยงเบนไปจาก neutral population โดยมีค่า D statistic เท่ากับ -1.72180 ($p= 0.01070$) ส่วนค่า FS statistic มีค่า -25.76639 ($p= 0.00000$) และทั้งสองค่าสถิติมีค่าติดลบในทุกแหล่งตัวอย่าง (ตารางที่ 5) การทดสอบ mismatch distribution พบว่ามีการกระจายตัวแบบ unimodal (ภาพที่ 5) โดยมีค่า Raggedness index เท่ากับ 0.03081 ($p=0.58070$) และยอมรับการเกิด sudden expansion model โดยมีค่า SSD เท่ากับ 0.00302 ($p=0.28640$) ค่าพารามิเตอร์ θ_1 ของประชากรรวม มีค่า 31.64000 และ θ_0 ของประชากรรวม มีค่า 0.02109 และพบว่าทุกจังหวัดมีค่า θ_1 มากกว่า θ_0 (ตารางที่ 5) ระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรพบว่าการขยายขนาดมา 1,000 ปีที่ผ่านมา (ภาพที่ 6) แผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ พบว่าไม่แบ่งกลุ่มประชากรตามสภาพภูมิศาสตร์ และมีรูปร่างแบบดาว (star topology) โดยมีแฮพลไทป์ H04 เป็น dominant haplotype เชื่อมต่อกับแฮพลไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกจังหวัดด้วยการกลายพันธุ์ 1-2 ครั้ง (ภาพที่ 7)

ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากรของหอยตะเภาวิเคราะห์จากยีน

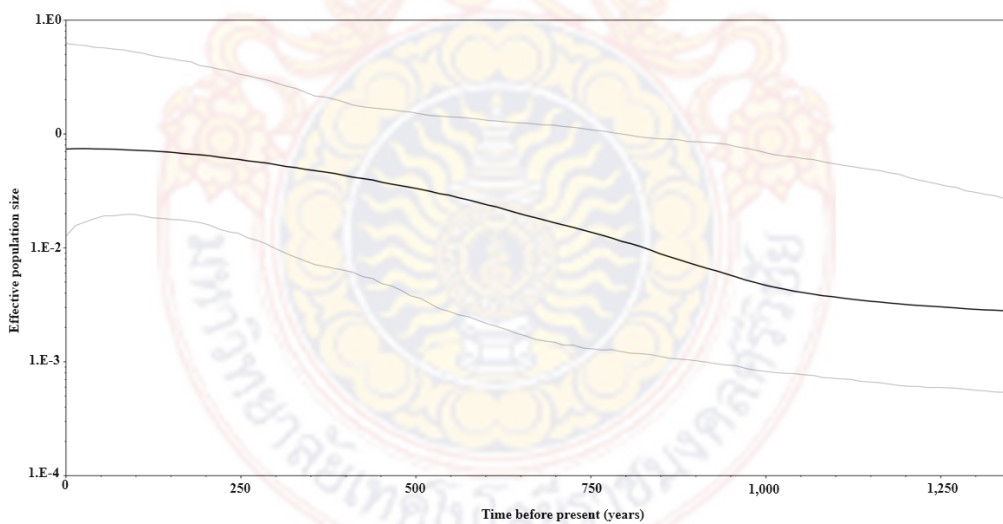
cytochrome oxidase subunit I

Collecting localities	Tajima's D	Fu's F_s	SSD^a	Rag ^b	θ_0^c	θ_1^d
Satun	-1.24556 (0.09710)	-8.43751* (0.00000)	0.00464 (0.32380)	0.03730 (0.55800)	0.00000	325.00000
Hat Samran	-0.82426 (0.22600)	-4.12776* (0.00730)	0.00146 (0.83480)	0.03043 (0.87960)	0.00352	12.50547
Trang	-1.24191 (0.09300)	-4.97384* (0.00450)	0.01349 (0.19160)	0.04756 (0.36330)	0.00000	33.08594
Krabi	-1.67009* (0.02480)	-12.52458* (0.00000)	0.00443 (0.34230)	0.04698 (0.32050)	0.00000	99999.00000
Total	-1.72180* (0.01070)	-25.76639* (0.00000)	0.00302 (0.28640)	0.03081 (0.58070)	0.02109	31.64000

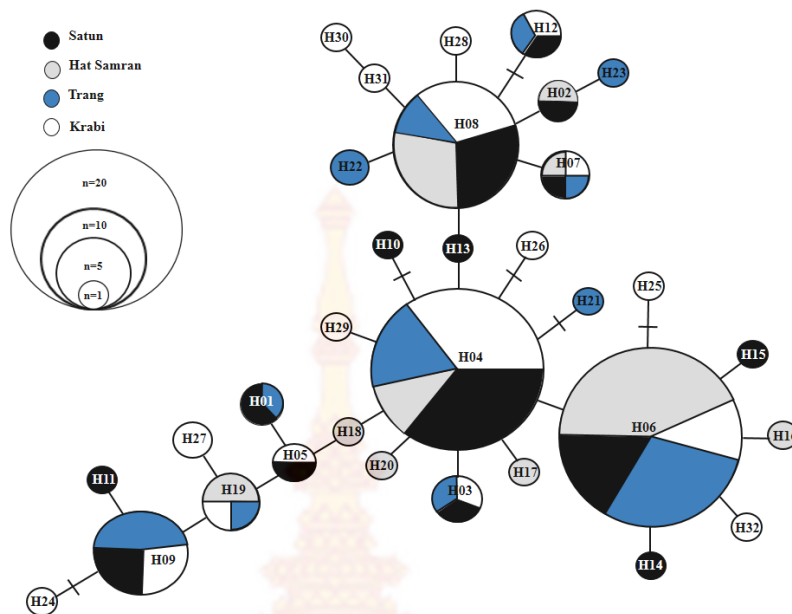
หมายเหตุ: *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), ค่าในวงเล็บคือค่า p - value



ภาพที่ 5 กราฟ mismatch distribution ของหอยตะเภาวิเคราะห์จากยีน cytochrome oxidase subunit I



ภาพที่ 6 กราฟ Bayesian skyline plot ของหอยตะเภาวิเคราะห์จากยีน cytochrome oxidase subunit I



ภาพที่ 7 แผนผังความสัมพันธ์ของแฮพลไทป์ของหอยตะเกาวิเคราะห์จากยีน cytochrome oxidase subunit I

4.2 ผลการศึกษาจากยีน 18S rRNA

4.2.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างทั้งหมด 99 ตัว วิเคราะห์จากลำดับเบส 727 คู่เบส มีตำแหน่ง polymorphic sites 11 ตำแหน่ง มีแฮพลไทป์ทั้งหมด 5 แฮพลไทป์ประกอบไปด้วยแฮพลไทป์ที่เป็น shared haplotype จำนวน 1 แฮพลไทป์ แบ่งเป็นแฮพลไทป์ที่ shared haplotype ระหว่างประชากร 1 แฮพลไทป์ โดยแฮพลไทป์ H01 เป็นแฮพลไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกแหล่งตัวอย่าง (ตารางที่ 6) มี rare haplotype รวมทั้งหมด 4 แฮพลไทป์ และมีเพียง 2 แหล่งตัวอย่างเท่านั้นที่มี rare haplotype คือ อำเภอสทิงพระ และจังหวัดตรัง โดยมี rare haplotype แหล่งตัวอย่างละ 2 แฮพลไทป์ สำหรับค่า haplotype diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.000-0.195 ส่วนค่า nucleotide diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.00000-0.00124 โดยค่า haplotype diversity ของประชากรรวมทั้งหมดมีค่า 0.080 ± 0.038 และค่า nucleotide diversity ของประชากรรวมทั้งหมดมีค่า 0.00031 ± 0.00020 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมได้แก่ จำนวนแฮพลไทป์, จำนวน polymorphic sites, haplotype diversity (h) และ nucleotide diversity (π) ของแต่ละจังหวัด แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 การกระจายของแฮพลোটাইป์ในแต่ละแหล่งตัวอย่างวิเคราะห์จากยีน
cytochrome oxidase subunit I จากยีน *18S rRNA*

Haplotype	Satun	Hat Samran	Trang	Krabi	Total
H01	27	25	18	25	95
H02	-	1	-	-	1
H03	-	1	-	-	1
H04	-	-	1	-	1
H05	-	-	1	-	1
Total	27	27	20	25	99

ตารางที่ 7 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยตะเภาวิเคราะห์จากยีน *18S rRNA*

Collecting localities	<i>N</i>	No. polymorphic sites	No. haplotypes	Haplotype diversity (<i>h</i>) (mean±SD)	Nucleotide diversity (π) (mean±SD)
Satun	27	0	1	0.000±0.000	0.00000±0.00000
Hat Samran	27	2	3	0.145±0.090	0.00020±0.00013
Trang	20	9	3	0.195±0.115	0.00124±0.00087
Krabi	25	0	1	0.000±0.000	0.00000±0.00000
Total	99	11	5	0.080±0.038	0.00031±0.00020

4.2.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรพบว่าประชากรหอยตะเภาในทะเลอันดามันไม่มีโครงสร้างประชากรย่อย โดยมีค่า Φ_{ST} 0.00998 ($p=0.055$) ประชากรมีความแปรปรวนภายในกลุ่ม 99.00 เปอร์เซ็นต์ และความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากร 1.00 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8) ผลการวิเคราะห์ค่า pairwise F_{ST} พบว่าประชากรแต่ละแหล่งตัวอย่างไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (ตารางที่ 9) ผลการศึกษาแผนผังต้นไม้วิวัฒนาการพบว่าแฮปโลไทป์มีการกระจายตัวโดยไม่มี การแบ่งแยกเป็นกลุ่มประชากร (ภาพที่ 8)

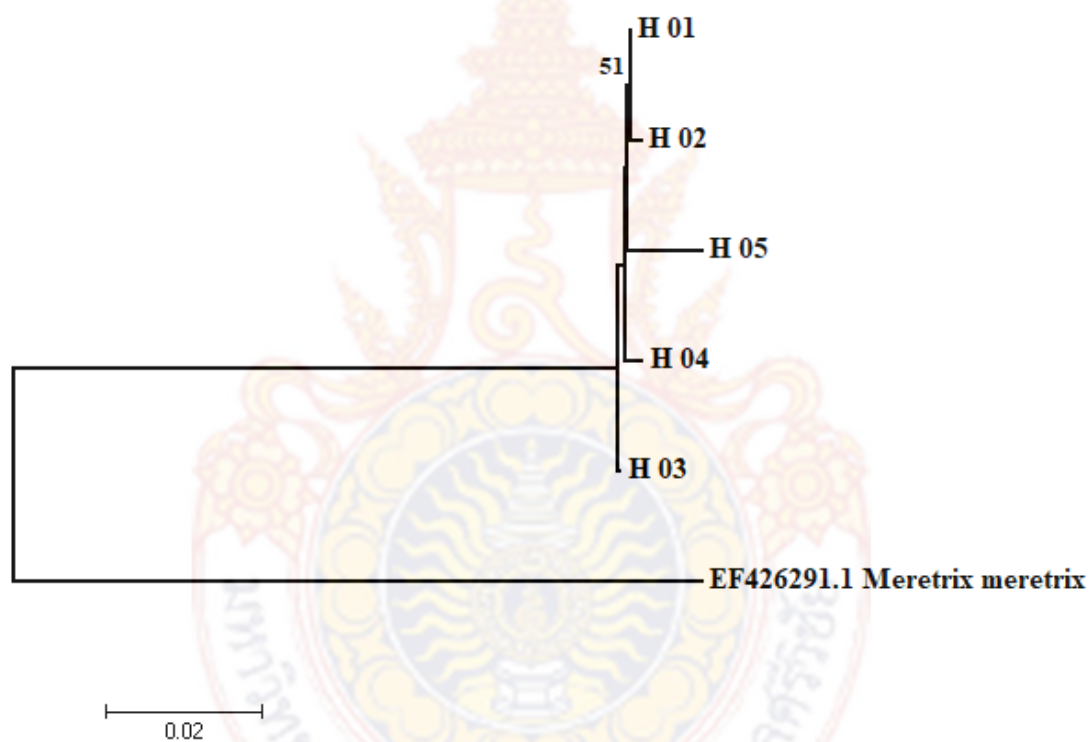
ตารางที่ 8 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรวิเคราะห์ด้วยวิธี AMOVA จากยีน *18S rRNA* ของหอยตะเภา

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	<i>p</i> -value
Among populations	3	0.413	0.00111Va	1.00	$\Phi_{ST} = 0.00998$ ($p=0.055$)
Within populations	95	10.476	0.11027Vb	99.00	
Total	98	10.889	0.11138		

ตารางที่ 9 ค่า pairwise F_{ST} ของหอยตะเภาวัดวิเคราะห์จากยีน $18S\ rRNA$

	Satun	Hat Samran	Trang	Krabi
Satun	-	0.99990	0.17177	0.99990
Hat Samran	0.00000	-	0.22424	0.99990
Trang	0.01545	0.01059	-	0.19622
Krabi	0.00000	-0.00291	0.01145	-

หมายเหตุ: ค่าที่อยู่มุมด้านบนคือค่า p - value



ภาพที่ 8 แผนผังต้นไม้วิวัฒนาการของหอยตะเภากลอดชายฝั่งทะเลอันดามันวิเคราะห์จากยีน $18S\ rRNA$

4.2.3 ประวัติประชากร

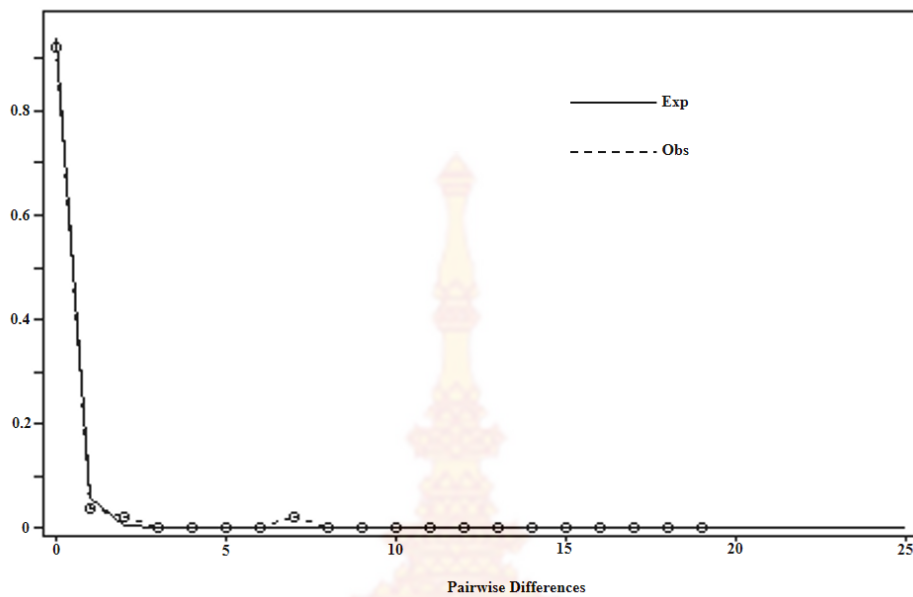
จากการวิเคราะห์ประวัติประชากร พบว่าประชากรเบี่ยงเบนไปจาก neutral population โดยมีค่า D statistic เท่ากับ -2.33994 ($p=0.00000$) ส่วนค่า FS statistic มีค่า -3.87033 ($p=0.01290$) และทั้งสองค่าสถิติมีค่าติดลบในบางแหล่งตัวอย่าง (ตารางที่ 10) การทดสอบ mismatch distribution พบว่ามีการกระจายตัวแบบ unimodal (ภาพที่ 9) โดยมีค่า Raggedness index เท่ากับ 0.77812 ($p=0.80250$) และยอมรับการเกิด sudden expansion model โดยมีค่า SSD เท่ากับ 0.00131 ($p=0.13660$) ค่าพารามิเตอร์ θ_1 ของประชากรรวม มีค่า

0.06733 และ θ_0 ของประชากรรวม มีค่า 0.00000 และพบว่าแหล่งตัวอย่างที่มีค่า θ_1 มากกว่า θ_0 คือ อำเภอหาดสำราญและจังหวัดตรัง (ตารางที่ 10) ระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรพบว่าการขยายขนาดมา 100 ปีที่ผ่านมา (ภาพที่ 10) แผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ พบว่าไม่แบ่งกลุ่มประชากรตามสภาพภูมิศาสตร์ และมีรูปร่างแบบดาว (star topology) โดยมีแฮพลไทป์ H01 เป็น dominant haplotype เชื่อมต่อกับแฮพลไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกจังหวัดด้วยการกลายพันธุ์ 1 ครั้ง (ภาพที่ 11)

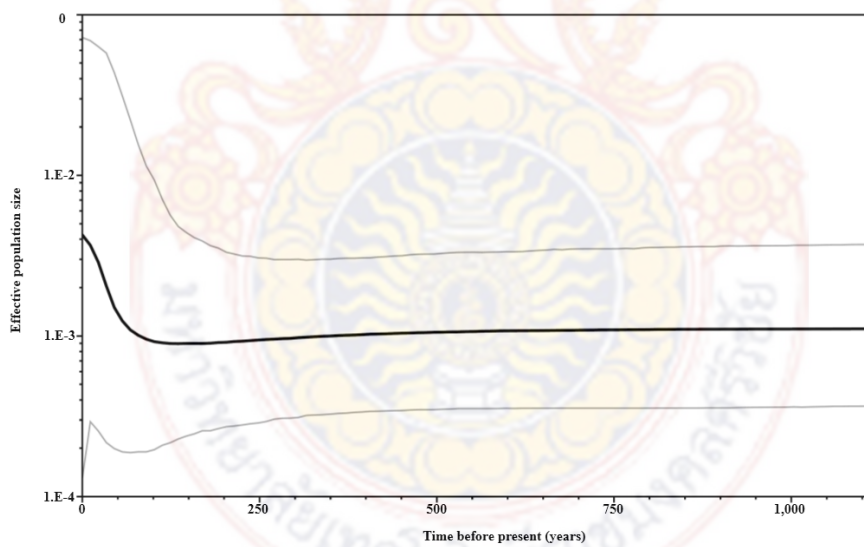
ตารางที่ 10 ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากรของหอยตะเกาะโดยศึกษาจากยีน *18S rRNA*

Collecting localities	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F_s</i>	<i>SSD</i> ^a	Rag ^b	θ_0^c	θ_1^d
Satun	0.00000 (0.10000)	0.00000 N.A.	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.00000	0.00000
Hat Samran	-1.51197* (0.04350)	-2.22268* (0.00070)	0.00051 (0.37200)	0.52680 (0.71090)	0.00000	0.17778
Trang	-2.21889* (0.00030)	0.98113 (0.70910)	0.03239 (0.06990)	0.68440 (0.64190)	0.00000	0.14688
Krabi	0.00000 (0.10000)	0.00000 N.A.	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.00000	0.00000
Total	-2.33994* (0.00000)	-3.87033* (0.01290)	0.00131 (0.13660)	0.77812 (0.80250)	0.00000	0.06733

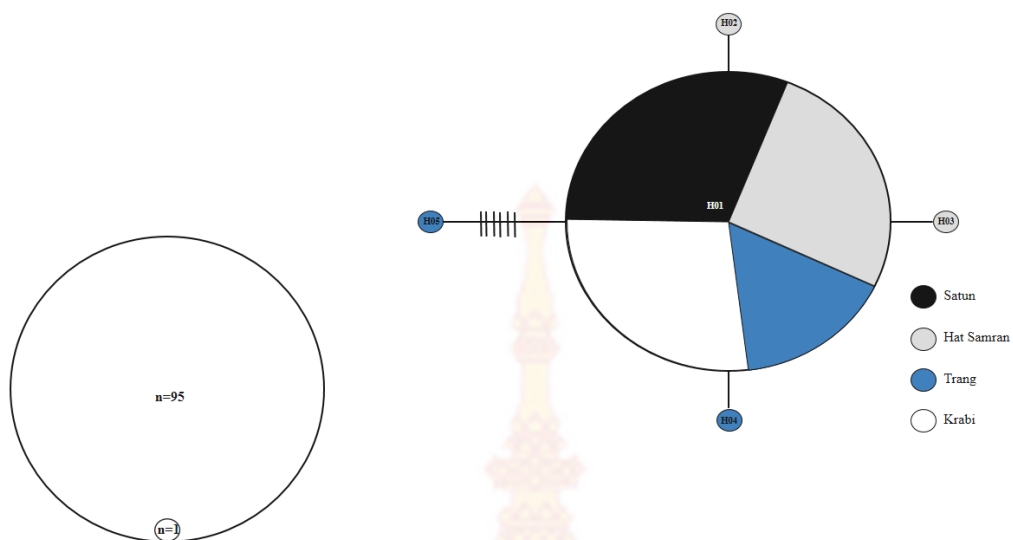
หมายเหตุ: *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), ค่าในวงเล็บคือค่า p - value



ภาพที่ 9 กราฟ mismatch distribution ของหอยตะเภาวิเคราะห์จากยีน *18S rRNA*



ภาพที่ 10 กราฟ Bayesian skyline plot ของหอยตะเภาวิเคราะห์จากยีน *18S rRNA*



ภาพที่ 11 แผนผังความสัมพันธ์ของแฮปโลไทป์ของหอยตะเภาวีเคราะห์จากยีน 18S rDNA



บทที่ 5 วิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ผลการศึกษาจากยีน cytochrome oxidase subunit I พบว่าประชากรหอยตะเกาะในทะเลอันดามันมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในประชากรถึง 100.01 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และเมื่อพิจารณาจากค่า haplotype diversity พบว่าทุกแหล่งตัวอย่างมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ซึ่งน่าจะเกิดจากยีน cytochrome oxidase subunit I มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ค่อนข้างสูง จากรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่า ทุกแหล่งตัวอย่างมีค่า haplotype diversity สูงกว่าค่า nucleotide diversity รูปแบบดังกล่าวพบได้ในประชากรที่มีการขยายขนาดโดยเกิดจากประชากรมีการสะสมการกลายพันธุ์รูปแบบใหม่ในระหว่างที่มีการขยายขนาดอย่างรวดเร็ว (Watterson, 1984) และสามารถพบรูปแบบความหลากหลายดังกล่าวได้ในสัตว์ทะเลหลายชนิด เช่น ปูม้า (*Portunus trituberculatus*) (Xu *et al.*, 2009), ปลาตะกรับ (*Scatophagus argus*) (วีระเกียรติ ทรัพย์มี, 2558) และปลากระบอก (*Liza subviridis*) (จุฬามาศ ศุภพันธ์, 2558) เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการ share haplotype ระหว่างแหล่งตัวอย่างจำนวน 11 แฮพลไทป์ ในขณะที่อีก 19 แฮพลไทป์ พบเฉพาะในแต่ละจังหวัด ซึ่งเรียกว่า private allele โดยสามารถใช้ private allele เป็นดัชนีในการระบุกลุ่มทางพันธุกรรมของแต่ละจังหวัดได้ (Xu *et al.*, 2009) สำหรับผลการศึกษาจากยีน *18S rRNA* ซึ่งเป็นยีนที่มีความอนุรักษ์ ดังนั้นจึงมีการกลายพันธุ์ที่น้อยกว่ายีน cytochrome oxidase subunit I จึงมีจำนวนแฮพลไทป์น้อยกว่าการศึกษาจากยีน cytochrome oxidase subunit I แต่อย่างไรก็ตามพบว่าจากรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่า ทุกแหล่งตัวอย่างมีค่า haplotype diversity สูงกว่าค่า nucleotide diversity ซึ่งได้ผลเหมือนกับยีน cytochrome oxidase subunit I ดังนั้นจึงน่าจะสรุปได้ว่าประชากรหอยตะเกาะในชายฝั่งทะเลอันดามันกำลังมีการขยายขนาดประชากร

5.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากผลการตรวจสอบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรจากยีน cytochrome oxidase subunit I และยีน *18S rRNA* ด้วยวิธี AMOVA พบว่าไม่เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร และไม่มี ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเมื่อทดสอบด้วยวิธี pairwise F_{ST} อีกทั้งผลการศึกษาแผนผังต้นไม้วิวัฒนาการและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ให้ผลเช่นเดียวกันคือไม่มีการแบ่งเป็นกลุ่มประชากร โดยปัจจัยที่ทำให้ไม่เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์ทะเลส่วนใหญ่ เกิดจากความสามารถในการแพร่กระจายของตัวอ่อนได้ในระยะทางไกล (Kyle and Boulding, 2000) มีรายงานว่าตัวอ่อนหอยสังข์ Queen conch (*S. gigas*) สามารถเคลื่อนที่ตามกระแสน้ำได้ไกลกว่า 900 กิโลเมตรโดยใช้เวลาสามสัปดาห์ (Davis *et al.*, 1993) ในขณะที่ตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามันระยะทางยาวประมาณ 700 กิโลเมตรไม่มีสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์และมีกระแสน้ำไหล

หมุ่นเวียนตลอดแนวชายฝั่งตามทิศทางของลมมรสุมตลอดทั้งปี (Sinsakul, 2000) อีกทั้งระยะตัวอ่อนของหอยตะเกาะใช้เวลาประมาณ 20 วัน จึงน่าจะเป็นปัจจัยที่ทำให้การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (gene flow) ระหว่างประชากรเกิดขึ้นได้ง่าย อีกสาเหตุที่ทำให้ไม่เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรในทะเลอันดามัน น่าจะเกิดจากประชากรหอยตะเกาะเคยมีการขยายขนาดประชากร ทำให้มีการแพร่กระจายของประชากรในพื้นที่กว้าง ซึ่งอาจเป็นอีกปัจจัยที่เสริมให้เกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมได้ง่ายเช่นกัน ผลการศึกษาครั้งนี้ยังสอดคล้องกับการไม่เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปูแสมก้ามขาว (Supmee *et al.*, 2012) และหอยชักตีนในทะเลอันดามัน (Suppapan, 2017) อีกด้วย จากการที่ประชากรหอยตะเกาะในทะเลอันดามันไม่เกิดโครงสร้างประชากรย่อยดังนั้นแนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมอาจทำได้โดยการใช้พ่อแม่พันธุ์จากในหลายพื้นที่ของฝั่งทะเลอันดามันปล่อยลงสู่แหล่งธรรมชาติในทะเลอันดามันด้วยกันเพื่อเป็นการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม

5.3 ประวัติประชากร

จากการศึกษาประวัติประชากรพบว่าประชากรหอยตะเกาะในทะเลอันดามันเคยมีการขยายขนาดประชากร สอดคล้องกับผลการศึกษา 5 วิธีได้แก่ 1) การทดสอบ Tajima's D test และ Fu's FS test พบว่ามีค่าติดลบซึ่งแสดงว่าประชากรเบี่ยงเบนไปจาก neutral population สำหรับค่า D statistic ที่มีค่าติดลบบ่งบอกว่าประชากรกำลังถูกคัดเลือกโดยการคัดการกลายพันธุ์ที่ไม่เหมาะสมทิ้งไป (purifying selection) หรืออาจมีการขยายขนาดประชากรเกิดขึ้น (Yang, 2006) อีกทั้งค่า FS statistic ซึ่งเป็นค่าสถิติที่ใช้ทดสอบการขยายขนาดประชากรสำหรับเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เป็นนอกรีคอมบิเนชัน (Ramirez-Soriano *et al.*, 2008) พบว่ามีค่าติดลบด้วยเช่นกัน จึงเป็นการยืนยันว่าประชากรหอยตะเกาะเคยมีการขยายขนาด 2) การทดสอบ mismatch distribution พบว่ามีรูปแบบการกระจายตัวแบบ unimodal และยอมรับการเกิด sudden expansion model จึงเป็นการยืนยันว่าเคยมีการขยายขนาดประชากรของหอยตะเกาะในทะเลอันดามัน 3) แผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์เป็นรูปแบบดาว ซึ่งพบได้ในประชากรที่เคยมีการขยายขนาดประชากร (Slatkin and Hudson, 1991) อีกทั้งไม่สามารถแบ่งกลุ่มประชากรตามจังหวัดได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการไม่เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร 4) ค่าพารามิเตอร์ θ_1 มีค่ามากกว่า θ_0 ในทุกประชากรแสดงว่ามีประชากรเพศเมียที่มีความสามารถในการสืบพันธุ์เพิ่มขึ้น ซึ่งบ่งบอกว่าประชากรเคยมีการขยายขนาด 5) ระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรทดสอบด้วยวิธี Bayesian skyline plot เริ่มมาเมื่อประมาณ 100-1,000 ปี

5.4. แนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

5.4.1 การอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในแหล่งน้ำธรรมชาติ

การปล่อยพันธุ์สัตว์น้ำลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติที่มีประชากรชนิดนั้นอาศัยอยู่อาจส่งกระทบต่อโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรธรรมชาติได้ โดยจะเกิดการแข่งขันกันในระบบนิเวศ

ระหว่างสัตว์น้ำในธรรมชาติและสัตว์น้ำที่ทำการปล่อย นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อพันธุกรรม เช่น อาจเกิดการแยกกลุ่มย่อยทางพันธุกรรมหรือการเกิดการผสมข้ามระหว่างประชากรซึ่งการจัดการทางการประมงในปัจจุบันนี้มักจะไม่ให้ความสำคัญต่อกรณีดังกล่าว ดังนั้นในกรณีที่ต้องการปล่อยสัตว์น้ำลงสู่ธรรมชาติควรทำในลักษณะบำรุงพันธุ์และรักษาพันธุกรรมดั้งเดิมซึ่งทำได้โดยการใช้พันธุ์ท้องถิ่นที่มีอยู่ในธรรมชาติปล่อยลงสู่แหล่งน้ำและต้องมีการตรวจสอบค่าทางพันธุกรรมอื่น เช่น ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความถี่ของแอลลีลในประชากร (Alendorf, 1986)

จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าไม่มีความแตกต่างของโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของหอยตะเภาในทะเลอันดามัน แสดงให้เห็นว่าประชากรในแต่ละจังหวัดมีรูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน ดังนั้นแนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถทำได้โดยการใช้แม่พันธุ์ของระหว่างจังหวัดปล่อยลงสู่ธรรมชาติเพื่อขยายพันธุ์ภายในประชากรเดียวกันเพื่อคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมเอาไว้ และจากผลการทดลองที่พบว่าประชากรหอยตะเภากำลังมีการขยายขนาดประชากรอยู่นั้นวิธีที่สามารถจัดการคือการรักษาถิ่นที่อยู่ตามธรรมชาติเอาไว้โดยการไม่ทำลายแหล่งที่อยู่หรืออาจจัดการโดยการงดจับหอยขนาดเล็ก เนื่องจากเป็นการขัดขวางการขยายขนาดประชากรและงดการใช้เครื่องมือทำลายล้างที่มีความรุนแรง รวมถึงการบังคับใช้กฎหมายอย่างเคร่งครัดต่อไป

5.4.2 การจัดการประชากรในระบบการเลี้ยง

การลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรมอาจส่งผลกระทบต่อความอยู่รอดของประชากรโดยเฉพาะประชากรในระบบการเลี้ยง (Frankham *et al.*, 2002) โดยตามปกติทั่วไปนั้นการเพาะเลี้ยงหรือการปรับปรุงพันธุ์จะทำให้องค์ประกอบพันธุกรรมของประชากรพื้นฐาน (base population) มีการลดลงทุกครั้งที่มีการเพาะพันธุ์แต่ละรุ่น (พนม และคณะ, 2555) ซึ่งการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรมมาจากการใช้ประชากรเริ่มต้นจำนวนน้อยและได้มาจากประชากรเดียวกันมาเป่นพ่อแม่พันธุ์ส่งผลกระทบต่อประชากรรุ่นต่อมาที่เกิดในระบบเพาะเลี้ยงโดยก่อให้เกิดความผิดปกติเนื่องจากการผสมภายในเครือญาติ (inbreeding depression) ซึ่งเป็นผลของปรากฏการณ์คอขวดอย่างรุนแรง ซึ่งการจัดการประชากรสัตว์น้ำในระบบเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต้องมีขนาดประชากรที่ขนาดใหญ่เพียงพอที่จะไม่ก่อให้เกิดผลกระทบจากเจเนติกส์ดริฟท์นอกจากนี้ประชากรต้องมีการผสมพันธุ์แบบสุ่มเพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม และมีอัตราส่วนระหว่างเพศในอัตราส่วนที่เท่ากันเพื่อรักษา effective population sizes ในแต่ละรุ่นให้มากที่สุด

จากการศึกษาในครั้งนี้แนะนำว่าการจัดการหอยตะเภาในระบบเพาะเลี้ยงหรือเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ต้องเริ่มจากพ่อแม่พันธุ์ที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงพอสมควร โดยพนม และคณะ (2548) ระบุว่าปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรเริ่มต้นอย่างน้อยที่สุดไม่ควรต่ำกว่าหรืออยู่ในระดับเดียวกันเมื่อเทียบกับประชากรที่อยู่ในธรรมชาติ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าหอยตะเภาในทะเลอันดามันมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์ของประชากรในระบบเพาะเลี้ยงจึงควรสร้างประชากรพ่อแม่พันธุ์ให้มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับในธรรมชาติโดยอาจมีการผสมระหว่างประชากรหรือนำประชากรจากธรรมชาติเข้ามาผสมเพื่อให้ได้

ประชากรพ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพทางพันธุกรรมที่สมบูรณ์และมีศักยภาพที่ยั่งยืนในการเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ดี



บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของหอยตะเภาที่สุ่มขึ้นมา จากแต่ละแหล่งตัวอย่างตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 426 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 727 คู่เบส พบว่าไม่มีโครงสร้างพันธุศาสตร์ ประชากรของหอยตะเภาในทะเลอันดามัน และเมื่อวิเคราะห์ประวัติประชากร พบว่า ประชากรหอย ตะเภาในทะเลอันดามันเคยมีการขยายขนาดประชากรมาประมาณ 100–1,000 ปีที่ผ่านมา ผล การศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนพิจารณาในการจัดการทรัพยากรตะเภาในทะเล อันดามันได้ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมอื่นเช่นเครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งมีอัตราการกลายพันธุ์สูง ในการพิจารณาเพื่อกำหนดแนวทางในการอนุรักษ์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยตะเภาในทะเลอันดามันควบคู่ไปด้วยกัน



เอกสารอ้างอิง

- นภารัตน์ ประไพวงศ์ และ มีชัย แก้วศรีทอง. 2549. การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์และฤดูกาลวางไข่ของ หอยตะเภา (*Donax scortum* Linnaeus). รายงานประจำปี 2549 สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดตรัง
- พนม กระจ่างพนธ์ สอดสุข สุภาพ ไพรพนาพงศ์ นิพนธ์ เสนอินทร์ ศรีรัตน์ สอดสุข และ พลชาติ ผิวณร. 2555. การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในประชากรปลาเกะพงขาวจากแหล่งเพาะพันธุ์. *Thai Journal of Genetics*. 5 (22): 166-182.
- วันศุกร์ เสนานาญ และจิราภรณ์ ไตรศักดิ์. 2551. การประยุกต์ใช้พันธุศาสตร์ประชากรในการจัดการทรัพยากรประมง. พันธุศาสตร์ประชากรเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และกองทุนสนับสนุนการวิจัย. กรุงเทพฯ.
- Alendorf, F.W. 1986. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo. Biol.* 5: 181-190.
- An. H.S., J. W. Lee., S.W. Hong. and J.I. Myeong. 2013. Population genetic structure of the Korean threadsail filefish (*Stephanolepis cirrhifer*) based on microsatellite marker analysis. *Biochemical Systematics and Ecology* 50: 397-405.
- Antoro, S., Na-Nakorn, U., Koedprang, W. 2006. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* from Thailand and Indonesia using microsatellite markers. *Mar. Biotechnol.* 8: 17-26.
- Avise, J.C., Neigel, J.E. and Arnold, J. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *J Mo. Evol.* 20 : 99-105.
- Avise, J.C., G.S. Helfman, N.C. saunders and L.S. Hales. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 4350-4354.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution.* Chapman and Hall, New York.
- Ayala, F.J. 1982. *Population and Evolutionary Genetics: A Primer.* The Benjamin Cummings Pub. Co. Inc, California.
- Bernal-Ramirez, J.H., Adcock, G.J., Hauser, L., Carvalho, G.R. and Smith, P.J. 2003. Temporal stability of genetic population structure in the New Zealand snapper, *Pagrus auratus*, and relationship to coastal currents. *Mar. Biol.* 142: 567-574.

- Boore, J. L. 1999. Survey and summary animal mitochondria genome. *Nucleic acids research*. 27(8): 1767-1780.
- Borsa, P., I. S. Arlyza., M. Laporte and P. Berrebi. 2012. Population genetic structure of blue-spotted maskray *Neotrygon kuhlii* and two other Indo-West Pacific stingray species (Myliobatiformes: Dasyatidae), inferred from size-polymorphic intron markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 43 : 32–40.
- Bowen, B.W., Bass, A.L., Rocha, L.A., Grant, W.S. and Robertson, D.R. 2001. Phylogeography of the trumpetfishes (*Aulostomus*): ring species complex on a global scale. *Evolution*. 55: 1029-1039.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. and Wilson, A. C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates, tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18: 225-239.
- Carmill, P., Umbanhowar, C.E., Teed, R., Geiss, C.E., Aldinger, J., Dvorak, L., Kenning, J., Limmer, J. and Walkup, K. 2003. Late-glacial and Holocene climatic effects on fire and vegetation dynamics at the prairie-forest ecotone in south-central Minnesota. *Journal of Ecology*. 91: 822-836.
- Cassone, B.J. and Boulding. E.G. 2006. Genetic structure and phylogeography of the lined shore crab, *Pachygrapsus scassipes*, along the northeastern and western Pacific coasts. *Marine Biology*. 149: 213-226.
- Crease, T.J. 1999. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene*. 233: 89-99.
- Di Battista, J.D., Berumen, M.L., Gaither, M.R., Rocha, L.A., Eble, J.A., Choat, J.H., Craig, M.T., Skillings, D.J. and Bowen, B.W. 2013. After continents divide: comparative phylogeography of reef fishes from the Red Sea and Indian Ocean. *J. Biogeogr.* 40: 1170-1181.
- Evans, R.D., L. van Herwerden., G.R. Russ. And A.J. Frisch. 2010. Strong genetic but not spatial subdivision of two reef fish species targeted by fishers on the Great Barrier Reef. *Fisheries Research* 102: 16–25.
- Excoffier, L. and Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Frankham, R., Briscoe, D. A. and Ballou, J. D. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, New York, New York, USA.

- Fu, F.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147: 915–925.
- Guarnieo, I., Franzellitti, S., Ungaro, N., Tommasini, S., Piccinetti, C. and Tinti, F. 2002. Control region haplotype variation in the central Mediterranean common sole indicates geographical isolation and population structuring in Italian stocks. *J. Fish. Biol.* 60: 1459-1474.
- Guo, E., Li, X., Liu, Y., Cheng, Y. and Wu, C.X. 2011. Genetic variation and population structure of swimming crab (*Portunustrituberculatus*) inferred from mitochondrial control region. *MolBiol Rep.* doi 10.1007/s11033-011-0882-3.
- Harpending, R.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66: 591-600.
- Hoffman, E.A., Kolm, N., Berglund, A., Arguello, J.R. and Jones, A.G. 2005. Genetic structure in the coral-reef-associated Banggai cardinal fish, *Pterapogonkauderni*. *Mol. Ecol.* 14: 1367-1375.
- Huang, X. and Madan, A. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9 : 868–877.
- Hung, K., Russell, B.C. and Chen, W. 2017. Molecular systematics of threadfin breams and relatives (Teleostei, Nemipteridae). *Zool. Scr.* 46(5): 536-551.
- Iamsuwansuk, A. and J. Denduangboripant. 2011. Phylogenetic study of shovel-nosed lobster *Thenus indicus* in Thailand. In The 37th Congress on Science and Technology of Thailand. 10-12 October 2011. Bangkok, Thailand.
- Klinbunga, S., K. Khetpu, B. Khamnamtong and P. Menasveta. 2007. Genetic heterogeneity of the blue swimming crab (*Portunuspelagicus*) in Thailand determined by AFLP analysis. *Biochem. Genet.* 45: 725-736.
- Kong, X.Y., Li, Y. L. and Kong, W.S.J. 2010. Genetic variation and evolutionary demography of *Fenneropenaeuschinensis* populations, as revealed by the analysis of mitochondrial control region sequences. *Genetics and Molecular Biology.* 33(2): 379-389.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D. , Gibson T.J. and Higgins, D.G. 2007. Sequence analysis Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics Applications Note.* 23 (21), 2947-2948.
- Lewontin, R.C. 1974. The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press, New York.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25, 1451-1452.

- Lim, H., A.T. Ahmad., A.A. Nuruddin and S.A.M. Nor. 2014. Genetic relationships among five nemipterid fish species from the Indian coast using allozyme analysis. Mitochondrial DNA. doi: 10.3109/19401736.2014.908354
- Mahidol, C., U. Na-Nakorn, S. Sukmanomon, N. Taniguchi and T.T.T. Nguyen. 2007. Mitochondrial DNA diversity of the Asian moon scallop, *Amusiumpleuronectes* (Pectinidae), in Thailand. *Marine Biotechnology*. 9 : 352-359.
- Menezes, M. R , U. Arolkar and V. Rathod. 2002. Genetic relationships among five nemipterid fish species from the Indian coast using allozyme analysis. *Journal of Fish Biology*. 60(5) :1326–1330.
- Mousset, S., Derome, N. and Veuille, M. 2004. A neutrality test based on the mismatch distribution. *Mol. Biol. Evol.* 21: 724-731.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Olsson, J., Florin, A., Mo, K., Aho, T. and Ryman, N. 2012. Genetic structure of whitefish (*Coregonus maraena*) in the Baltic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 97: 104-113.
- Ouithavon, K. 2009. *Molecular Phylogenetic Relationships among Thai Deer (Subfamily Cervinae)*. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.
- Panithanarak, T. Karuwancharoen, R., Na-Nakorn, U. and Nguyen, T. T.T. 2010. Population Genetics of the Spotted Seahorse (*Hippocampus kuda*) in Thai Waters: Implications for Conservation. *Zoological Studies*. 49(4) : 564-576.
- Phinchongsakuldit, J., P. Chaipakdee., J. F. Collins., M. Jaroensutasinee., J. F. Y. Brookfield. 2013. Population genetics of cobia (*Rachycentron canadum*) in the Gulf of Thailand and Andaman Sea: fisheries management implications. *Aquacult Int.* 21:197–217.
- Ramirez-Soriano A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., F. L and Navarro, A. 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*. 179: 555-567.
- Ravitchandirane, V., G. Vaithianathan, R. Vijayan, J. Bilavendiran, T. Muthusamy, S. Jayachandran, R. Vellaichamy and G. Takshnamurthy . 2012. Molecular Identification and Phylogenetic Relationships of Threadfin Breems (Family: Nemipteridae) Using mtDNA Marker. *Not. Sci. Biol.* 4(2): 13-18.
- Rogers, A.R. and Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the Distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552-569.

- Roldan, M.I., Perrotta, M., Cortey, R.G. and Pla, C. 2000. Molecular and morphologic approaches to discrimination of variability patterns in chub mackerel, *Scomberjaponicus*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 253: 63-74.
- Roman, J. and Palumbi, S. R. 2004. A global invader at home : population structure of the green crab, *Crcinusmaenas*, in Europe. Molecular Ecology. 13: 2891-2898.
- Russell, B.C., 1990. FAO Species Catalogue. Vol. 12. Nemipterid fishes of the world. (Threadfin breams, whiptail breams, monocle breams, dwarf monocle breams, and coral breams). Family Nemipteridae. An annotated and illustrated catalogue of nemipterid species known to date. FAO Fish. Synop. 125(12):149p. Rome: FAO. (Ref. 3810).
- Shih, H., Saher, N. U., Kamrani, E., Ng, P. K., Lai, Y. and Liu, M. 2015. Population genetics of the fiddler crab *Ucasindensis* (Alcock, 1900) (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae) from the Arabian Sea. Zoological Studies. 54, 1 DOI 10.1186/s40555-014-0078-3.
- Sinsakul, S. 2000. Late Quaternary geology of the Lower Central Plain, Thailand. Journal of Southeast Asian. Earth Science. 18: 415-426.
- Slatkin, M. 1987. Rare alleles as indicators of gene flow. Evolution. 39(1) : 53-65.
- Song, N., Zhang, X. and Gao, T. 2010. Genetic diversity and population structure of spottedtail goby (*Synechogobiusommaturus*) based on AFLP analysis. Biochemical Systematics and Ecology. 38: 1089-1095.
- Supmee, V., Ngernsiri L., Swatdipong A., Wonnapijit, P., Sangthong, D. and Sangthong, P. 2012a. A single population of Thai vinegar crab (*Episesarmamederi*) living in the Gulf of Thailand. In Proceeding of the 38th Congress on Science and Technology of Thailand (STT38). 17-19 October 2012. Chiang Mai, Thailand.
- Supmee, V., Ngernsiri L., Swatdipong A., Wonnapijit, P., Sangthong, D. and Sangthong, P. 2012b. A single population of Thai vinegar crab (*Episesarmamederi*) living in the Gulf of Thailand. In Proceeding of the 38th Congress on Science and Technology of Thailand (STT38). 17-19 October 2012. Chiang Mai, Thailand.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. 123: 585-595.
- Tudela, S., Garcia-Marynn, J.L. and Pla, C. 1999. Genetic structure of the European anchovy, *Engraulisencrasicolus*, in the north-west Mediterranean. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 234: 95-109.

- Xu, Q., Liu, R. and Liu, Y. 2009. Genetic population structure of the swimming crab, *Portunustrituberculatus* in the East China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 371: 121-129.
- Yang, Z. 2006. *Computational molecular evolution*. Oxford University Press, New York.





ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีราชา

ภาคผนวกที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแฮปโลไทป์จำนวน 33 แฮปโลไทป์ที่ได้จากการศึกษา

ในยีน cytochrome oxidase subunit I รวม outgroup

>H_01

ATTGAGCTGTACCGCTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTGTTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_02

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGACATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_03

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_04

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_05

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTGTTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_06

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTAGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_07

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACTGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGACATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGT TACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTTGATC

>H_08

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGACATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGT TACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTTGATC

>H_09

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTAGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGT TACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTTGATC

>H_10

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGT TACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCACC GAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTAACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTTGATC

>H_11

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAATAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTAGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGT TACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTTGATC

>H_12

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTACTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGACATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGT TACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAACTTTAATACTT
CTTTTTTTTGATC

>H_13

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGACATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGT TACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTTGATC

>H_14

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTAGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGACATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_15

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTAGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTGT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_16

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTAGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_17

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTTGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_18

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_19

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_20

ATTGAGCTGTACCACTTTTATTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_21

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTAT
TAGTAACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTCGATC

>H_22

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGACATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACTATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_23

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGTT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGACATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTAG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_24

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTAGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATAC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCACC GAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_25

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTAGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCACC GAACTACACTATTCATGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_26

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTCTAT
TAGTAACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_27

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGCATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGTACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCCGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_28

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGACATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGT TACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_29

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGACATCCAGCACCTGCAATAGAGTTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGT TACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_30

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGACATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGT GACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTTGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_31

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTGGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTAATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTGGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGACATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGT GACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>H_32

ATTGAGCTGTACCACTTTTACTAGCAGCTCCTGACATGGTTTTTGC GCGGTTAAACAACCTTAGGTTTT
GGCTTCTTCCGGCTGCTACGGTTTTATTATTGATATCTAATGAAGTAGAAGAGGGAGTAGGTACCGGGT
GAACTTTGTATCCCCCTCTTCTGCTTGGTTGGGACATCCAGCACCTGCAATAGAATTTATAATCTTGG
GGCTTCATATCGCCGGCTTATCTTCTATTTTTGCAAGAATTAATTTTGT TACTACGGGCGCTAATATGC
GGCCTGAAGGTGTAGCTCCTCAGCGAACTACACTATTCGTTGTTTCTGTTATTATTACTTCTTTTTTTAT
TAGTTACAGCTATGCCTGTATTAGCTGCTGCTTTAACCATGCTTTTGACTGATCGAAATTTAATACTT
CTTTTTTTGATC

>DQ399402.1_Meretrix meretrix

ATTGGCTGGTTCTTTAATGTTAACAGCTCCTGACATAGCTTTTCTCGTTTGAATAATTTAAGTTTCT
GATTATTAAGTAGTTCTTTGTTGCTTTTATTAGGTTCTACTTATGTGGAAGCTGGTTCTGGTACGGGTT
GAACTATTTATCCTCCTTTATCTAGTTGAAAATATCATTCTGGTGTAGTGTAGATTATTTAATTTTTAT
CTCTACATGTAGGTGGTCTTCTTCTATTATGCTGTTGTTAATTTACTTACTACTACAGCTATTTGTATAC
GTCCAGGAGTTATAGCTTTAGTTTCGAACGCCAATGTTTGGTTGGTGTATTGCTGTGACTGGTTTTTTAT
TAATTTGTGCTATACCTGTTTTAGCGGCTGGTTTAAACAATACTTTTGACAGATCGTAATTTTAAACACAG
GGTTTTTTGATC

ภาคผนวกที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแฮปโลไทป์จำนวน 6 แฮปโลไทป์ที่ได้จากการศึกษา
ในยีน cytochrome oxidase subunit I รวม outgroup

>H_01

CTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATGGTTCCCTTAGACATACCACATCCACTTGGACAACCTGTGGAAA
ATCTAGAGCTAATACATGCGACAAAGCTCCGACCTTCGGGGAAGAGCGCATTTGTTAGTACAAAACCAA
CCCGGGTTCGCCCAGCCATCTTGGTGACTCTGAACAACCTTGAGCTGATCGCACGGCCTTGCGCCGGCG
ACGTATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGTGCTATGCGTACCATGGTTCTCACGG
GTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCA
GCAGGCACGCAAATTACCCAATGCCGACACGGCGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGTCTCTTT
CGAGGCCCCGTAATTGGAATGAGTACACTCTAAATCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGCTGCGTTTAAAAAGCTCGTAG
TTGGATCTCGGTTCCAGGCCTGCGGTCCGCCTCGAGGCGGATACTGCTCGTCTGTGTTTCGACGTCGTG
GTGGTCCCTTGGTGCTCTTGACTGAGTGTCTCGGGCGGTCCCGAATGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGT
GCTCAAAGCAGGCGTATCGCCTGAATAATTCGCATG

>H_02

CTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATGGTTCCCTTAGACATACCACATCCACTTGGACAACCTGTGGAAA
ATCTAGAGCTAATACATGCGACAAAGCTCCGACCTTCGGGGAAGAGCGCATTTGTTAGTACAAAACCAA
CCCGGGTTCGCCCAGCCATCTTGGTGACTCTGAACAACCTTGAGCTGATCGCACGGCCTTGCGCCGGCG
ACGTATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGTGCTATGCGTACCATGGTTCTCACGG
GTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCA
GCAGGCACGCAAATTACCCAATGCCGACACGGCGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGTCTCTTT
CGAGGCCCCGTAATTGGAATGAGTACACTCTAAATCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGCTGCGTTTAAAAAGCTCGTAG
TTGGATCTCGGTTCCAGGCCTGCGGTCCGCCTCGAGGCGGATACTGCTCGTCTGTGTTTCGACGTCGTG
GTGGTCCCTTGGTGCTCTTGACTGAGTGTCTCGGGCGGTCCCGAATGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGT
GGTCAAAGCAGGCGTATCGCCTGAATAATTCGCATG

>H_03

CTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATGGTTCCCTTAGACATACCACATCCACTTGGACAACCTGTGGAAA
ATCTAGAGCTAATACATGCGACAAAGCTCCGACCTTCGGGGAAGAGCGCATTTGTTAGTACAAAACCAA
CCCGGGTTCGCCCAGCCATCTTGGTGACTCTGAACAACCTTGAGCTGATCGCACGGCCTTGCGCCGGCG
ACGTATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGTGCTATGCGTACCATGGTTCTCACGG
GTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCA
GCAGGCACGCAAATTACCCAATGCCGACACGGCGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGTCTCTTT
CGAGGCCCCGTAATTGGAATGAGTACACTCTAAATCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAGAGTTGCTGCGTTTAAAAAGCTCGTAG
TTGGATCTCGGTTCCAGGCCTGCGGTCCGCCTCGAGGCGGATACTGCTCGTCTGTGTTTCGACGTCGTG
GTGGTCCCTTGGTGCTCTTGACTGAGTGTCTCGGGCGGTCCCGAATGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGT
GCTCAAAGCAGGCGTATCGCCTGAATAATTCGCATG

>H_04

CTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATGGTTCCCTTAGACATGCCACATCCACTTGGACAACCTGTGGAAA
ATCTAGAGCTAATACATGCGACAAAGCTCCGACCTTCGGGGAAGAGCGCATTTGTTAGTACAAAACCAA
CCCGGGTTCGCCCAGCCATGTTGGTGACTCTGAACAACCTTGAGCTGATCGCACGGCCTTGCGCCGGCG
ACGTATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGTGCTATGCGTACCATGGTTCTCACGG
GTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCA
GCAGGCACGCAAATTACCCAATGCCGACACGGCGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGTCTCTTT
CGAGGCCCCGTAATTGGAATGAGTACACTCTAAATCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGCTGCGTTTAAAAAGCTCGTAG
TTGGATCTCGGTTCCAGGCCTGCGGTCCGCCTCGAGGCGGATACTGCTCGTCTGTGTTTCGACGTCGTG
GTGGTCCCTTGGTGCTCTTGACTGAGTGTCTCGGGCGGTCCCGAATGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGT
GCTCAAAGCAGGCGTATCGCCTGAATAATTCGCATG

>H_05

CTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATGGTTCCTTAGACATAACCACATCCACTTGGACAACCTGTGGAAA
 ATCTAGAGCTAATACATGCGACAAAGCTCCGACCTTCGGGGAAGAGCGCATTGTTAGTACAAAACCAA
 CCCGGGTTTCGCCCAGCCATCTTGGTGACTCTGAACAACCTTGAGCTGATCGCACGGCCTTTCGCGCCGGCG
 ACGTATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCGACTGACGATGGTACGTGCTATGCGTACCATGGTTCTCACGG
 GTAACGGGGAATCAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCCAGGAAGGCA
 GCAGGCACGCAAATTACCCAATGCCGACACGGCGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGGTCTCTTT
 CGAGGCCCCGTAATTGGAATGAGTACACTCTAAATCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGG
 TGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGCTGCGTTTTAAAAAGCTCGTAG
 TTGGATCTCGGTTTCCTGGCCTGTGGTCCGCTCGAGGCGGATACTGCTCGTCCTGTGTTCGACGTCGTG
 GTGGTCCCTTGGTGCTCTTGACTGAGTGTCTCGGGCGGTCCCGAATGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGT
 GCTCAAAGCAGGTGTATCGCCTGAATAATTCGCATG

>EF426291.1_Meretrix_meretrix

CTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATGGTTCCTTAGATAGTACACTCCTACTTGGATAACTGTGGCAA
 ATCTAGAGCTAATACATGCGACCCAGCTCCGACCTCTCGCGGGGACGAGCGCTTTTGTAGCTAAAAA
 ACCAATCCGGGCTCTACGCTGGTCCGCTCGCGGGGCTTCGCATTCCCGGCTTATAGCCTCTGTGA
 TGACTCTGAACAACCTTGTGCCGATCGTATGCCCTCGTGGCGACGACGTATCTATCAAATGTCTGCCCT
 ATCACACTATCGATGGTACGTGCTATGCCTACCACGGTATGACGGGTAACGGGGAATCGGGGTTTCGAT
 TCCGGAGAGGGAGCATGAGATACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATG
 CAGACACTGCGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATCGGGGACTCTTTCGAGGCCTCGTAATTGAAATGAG
 TACACTCTAAATCCTTGACACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCC
 AGCTCCAATAGCGTATACACGGGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGCGCGGGCTCG
 CGGTGTGCTCGTTCGAGGCGACCATCGCTTGTCCAAGCTCCCAGCCGGACTCTGAAAGTCCCTGGTGCT
 CTTTCATCGAGCGTCTTGGACGGCCGGCGTGTACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGTCTAG
 CCAGCCTGAATACTGTTGCATG



ภาคผนวกที่ 3 Manuscript การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

The 10th Rajamangala University of Technology International Conference

“Creative Innovation and Technology for Sustainable Agriculture”

Genetic diversity of the Leather Donax (*Donax scortum*) living in the Andaman Sea coast of Thailand

Verakiat Supmee¹, Worawitoo Meesook¹, Juthamas Suppapan² and Apirak Songrak³

¹ Department of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat, 80110, Thailand

² Master of Education in Science program, Faculty of Education, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Nakhon Si Thammarat, 80280, Thailand

³ Department of Fishery Technology, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang Campus, Trang 92150, Thailand
Corresponding e-mail: verakiat.s@rmutsv.ac.th

Abstract

Leather donax (*Donax scortum*) is an economical fishery clam in the Andaman Sea. It was dramatic decreased caused by overexploitation. In order to construct sustainable management of this species, genetic information is necessary. In our study, the genetic diversity of *D. scortum* was investigated based on the variation of the nucleotide sequence (852 bp) of mitochondrial DNA (mtDNA) in the *18S rRNA* gene. The mtDNA sequences of 62 individual collecting from 3 sampling sites along the Andaman Sea coast: Ban Bo Jed Look; Satun province (21), Sikao beach; Trang province (20), Klong Prasong; Krabi province (21) were analyzed. The result revealed that all populations showed low levels of genetic diversity. Estimated values of haplotype and nucleotide diversity were 0.312 ± 0.011 and 0.020 ± 0.004 , respectively. The results of neutrality tests, both Tajima's *D* and Fu's *F_s* statistics, yielded negative values (-0.721 and -1.423, respectively), which were a statistically significant deviation from the neutrality, indicating that the *D. scortum* living in the Andaman Sea had experienced population expansion. The AMOVA analysis did not reveal genetic differentiation of *D. scortum* between populations. Based on these results, an absence of a population structure of *D. scortum* in the Andaman Sea was possibly caused by a high level of gene flow due to the high dispersal ability of this species. This study provided basic information that could be used for conserving this species in the Andaman Sea coast of Thailand.

Keywords: *Donax scortum*, Genetic diversity, mitochondrial DNA, Thailand

Introduction

Leather donax (*Donax scortum*) is an economical fishery clam in the Andaman Sea that lives along the coast in the tidal zone which has muddy-sand (Singh *et al.* 2012). It is widely distributed in the Indian Ocean region in Thailand. The muscle of *D. scortum* has a soft, white appearance, which is widely consumed in Southern Thailand. Especially in Trang province, there is an annual *D. scortum* festival every year. In the present, *D. scortum* has been dramatic decreased, caused by overexploitation for commercial purposes. Moreover, the habitats of the *D. scortum* are found in limited areas, therefore there is a chance that *D. scortum* will be lost from the original source. As a result, an effective sustainable management strategy is needed. This plan needs to be based on genetic data of this species. In

our study, the genetic diversity of *D. scortum* was revealed based on the variation of mitochondrial nucleotide sequences. Since the mitochondrial genome is exclusively maternally inherited with a relatively rapid evolutionary rate and a lack of recombination (Avice, 2000), genetic variations of *D. scortum* populations were identified by examining the partial sequence of the *18S rRNA* gene in mitochondrial DNA. This genetic information would be helpful for designing appropriate management and sustainable exploitation of *D. scortum* in Andaman Sea coast.

Materials and Methods

Sample collection and DNA extraction

A total of 62 individuals of *D. scortum* was collected from 3 localities along the coast of the Andaman Sea including Ban Bo Jed Look; Satun province (21), Sikao beach; Trang province (20), Klong Prasong; Krabi province (21) (Table 1, Figure 1). Specimens were preserved on the ice during transportation to a laboratory and stored at -20°C until required. Total genomic DNA was extracted from muscle tissue using the Genomic DNA Extraction Kit (Tiangen BioTech, China) following manufacturer specifications.

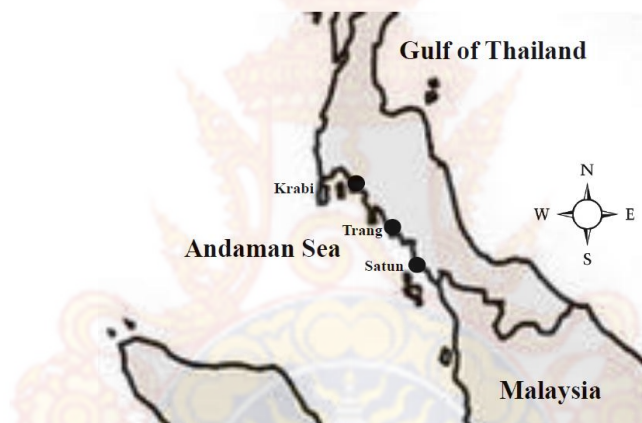


Figure 1. The collecting localities for *D. scortum* along the Andaman coast

PCR amplification and nucleotide sequencing

A segment of the mtDNA *18S rRNA* gene was amplified using the primer DS_18SrRNA_H1: 5'CAA CCT GGT TGA TCC TGC CAG T 3' and DS_18SrRNA_L1: 5'CTG ATC CTT CTG CAG GTT CAC CTA C 3'. Amplification was performed in a thermocycler (Major Cycler, CYCLER, TAIWAN) on a 50 μl reaction mixture containing 50-100 ng template DNA 5 μl , 10X Taq buffer 5 μl , 25 mM MgCl_2 5 μl , 2 mM dNTPs mix 4 μl , 10 μM each primers 2 μl , 2.5 unit Taq DNA polymerase (ThermoSCIENTIFIC, USA) 0.5 μl , and 26.5 μl of ddH₂O. The reaction mixtures were performed with the following profile: first denaturation at 94°C for 4 min, followed by 35 cycles consisting of 94°C for 40 sec, 59°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 10 min. All PCR products were separated on 1% agarose gels (1 \times TAE) for 45 min at 100 V, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. The correct size of the PCR product was purified using a DNA product purification kit (Tiangen BioTech, China) and sequenced (1ST Base Laboratory, Malaysia).

Data analysis

Genetic diversity

Sequences were viewed, edited and aligned using ClustalW version 1.83 (Thompson *et al.* 1994). The genetic diversity consisting of the polymorphic sites, nucleotide diversity (π) (Nei and Tajima, 1981), and haplotype diversity (h) (Nei, 1987) were calculated using DnaSP version 5.00 (Librado and Rozas, 2009). Neutrality analysis of *D. scortum*

population was examined. We calculated Fu's F_s (Fu, 1997) and Tajima's D (Tajima, 1989) in ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) with 10,000 permutations ($p < 0.05$) to test for demographic expansion in each population and in the dataset.

Population genetic structure

Population genetic structure of *D. scortum* was investigated using AMOVA software package implemented on ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010). A hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) was performed with 10,000 permutations ($p < 0.05$). We calculated pairwise F_{ST} as implemented on ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) with 10,000 permutations ($p < 0.05$) to analyze differentiation among populations.

Results

Genetic diversity

The alignment results showed that out of 852 aligned sites, 847 were monomorphic and 5 were polymorphic. Among the 5 polymorphic sites, 4 were a singleton and 1 site were parsimonious informative sites. An alignment of variable sites was presented in Table 1. Haplotype diversity and the nucleotide diversity value of the pool populations were 0.312 ± 0.011 and 0.020 ± 0.004 , respectively (Table 1). The number of polymorphic sites, number of haplotypes, haplotype diversity (h), and nucleotide diversity (π) within each population were presented in Table 1. In total, 5 haplotypes were identified, consisting of 2 shared (DS01, DS02) and 3 rare haplotypes (DS03, DS04, DS05) (Table 2). In general, haplotype DS01 and DS02 were shared by all populations from the Andaman Sea. The other 3 haplotypes (DS03, DS04, DS05) were unique haplotype (private alleles) (Table 2). Two populations (Satun province and Krabi province) had private alleles. Satun province population possessed 2 private alleles (DS03, DS04), followed by Krabi province with 1 private allele (DS05) respectively (Table 2). Neutrality analysis for the overall population, Tajima's D statistic was significantly different from zero ($D = -0.721$, $p = 0.039$) (Table 1). Fu's F_s test showed significant values in the pool populations ($F_s = -1.423$, $p = 0.040$) (Table 1).

Table 1 Collecting localities, code of collecting site, number of individuals per sampling site (N) and summary statistics of genetic variability for *D. scortum* along the Andaman coast

Collecting localities	N	No. haplotypes	No. polymorphic sites	Haplotype diversity (h) (mean \pm SD)	Nucleotide diversity (π) (mean \pm SD)	Tajima's D	Fu's F_s
Satun	21	4	4	0.386 ± 0.079	0.010 ± 0.000	-0.921 (0.180)	-0.604 (0.290)
Trang	20	2	1	0.379 ± 0.072	0.015 ± 0.000	1.261 (0.917)	1.131 (0.664)
Krabi	21	3	2	0.352 ± 0.066	0.011 ± 0.000	0.143 (0.645)	0.141 (0.442)
Total	62	5	5	0.312 ± 0.011	0.020 ± 0.004	-0.721 (0.039)	-1.423 (0.040)

p values in parentheses

Table 2 Haplotype distributions of *D.scortum* from three localities along the Andaman coast

Haplotype	Satun		Trang	Krabi	Total
DS01	12		13	12	37
DS02	7		7	8	22
DS03	1		-	-	1
DS04	1		-	-	1
DS05	-		-	1	1
Total	21		20	21	62

Population genetic structure

The population genetic structures of *D.scortum* collected from the Andaman Sea coast based on mtDNA *18S rRNA* gene sequence were determined. The F -statistic of the genetic structure, *D.scortum* population along the Andaman coast was not statistically significant ($\Phi_{ST}=-0.037$, $p=1.000$) (Table 3). Further, genetic differentiation between the regions was not revealed by pairwise F_{ST} analysis shows that Table 4. Every pairwise F_{ST} of the geographic-based populations showed no significant differences for most comparison between the populations.

Table 3 Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) of *D.scortum*

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	p -value
Among populations	2	0.150	-0.011 Va	-3.78	$\Phi_{ST} = -0.037$ ($p=1.000$)
Within populations	59	17.979	0.304 Vb	103.7892.70	
Total	61	18.129	0.293		

p values in parentheses

Table 4. Population pairwise F_{ST} values of *D.scortum*

	Satun	Trang	Krabi
Satun	-		
Trang	-0.038 (0.999)	-	
Krabi	-0.031 (0.999)	-0.044 (0.999)	-

p values in parentheses

Discussion

Genetic diversity

In our study, five variable sites were found in the 852 bp of 5 haplotypes, suggested a low variation in the mtDNA *18S rRNA* gene sequence in the *D. scortum*. In all population, a pattern of genetic diversity in the population of *D. scortum* living along the Andaman Sea coast presented a high haplotype diversity but a low nucleotide diversity. The variability pattern indicates that *D. scortum* had experienced a population expansion (Grant and Bowen, 1998). The cause of the population growth is responsible for retaining new mutations and help to keep up high haplotype diversity within a population (Ma *et al.* 2010). This pattern has been reported as a typical molecular character of marine species, such as the Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) (Wang *et al.* 2017) and the small yellow croaker (*Larimichthys polyacis*) (Zhang *et al.* 2017). Two haplotypes shared by all populations indicating an extensive gene flow among the sampling locations in the same geographical area.

This confirms that *D. scortum* has the habitat migration, reproductive migration and feeding migration, which is an important way for the gamete exchanging among individuals. In this study, 3 haplotypes presented only in a specific population (Table 2), suggested that these haplotypes could be used as indicators of stock identification (Xu *et al.* 2009). Interestingly, the clam samples collected from Satun province carried the highest level of genetic variations. Hence, these populations should be preserved as the base-line stocks for natural resource management. On the other hand, the clam population from Krabi province had low genetic diversity and risk to lose genetic diversity. Therefore, this province should be focused on to aid in determining breeding populations and proper units of management for conservation. Neutrality analysis showed negative Tajima's *D* and Fu's *F_s* deviated significantly ($p < 0.05$) from the neutral state of the total population. In general, Tajima's *D* test is the statistically significant negative value might have been caused by exist slightly deleterious mutations, purifying selection or a population expansion (Yang, 2006). Moreover, Fu' *F_s* statistics is a powerful statistical test for detecting demographic expansion from mitochondrial DNA sequence showed a statistically significant negative value indicated population expansion (Ramirez-Soriano *et al.* 2008). As a neutrality test result indicating that the *D. scortum* living in the Andaman Sea had experienced population expansion.

Population genetic structure

The AMOVA analysis and pairwise F_{ST} revealed that the genetic structure of *D. scortum* in the Andaman Sea was a single population. Not surprisingly, *D. scortum* population in the Andaman Sea has occurred a lack of population genetic structure. Many marine species have a high dispersal ability by spending part of their life cycle that is gametes, planktotrophic larvae, larvae, and adults in open waters and distribute by current circulation. This strategy promoted gene flow among marine species population (Russo *et al.* 1994; Uthicke and Benzie, 2003). In addition, the Andaman Sea does not have a geographic barrier along the coast. Therefore, the gene flow of *D. scortum* population was plausibly maintained by high dispersal ability. The lack of genetic structure was also reported in populations of other marine species in the Andaman Sea; *Episesarma versicolor* (Supmee *et al.* 2012), *Liza subviridis* (Supmee *et al.* 2017) and *Strombus canarium* (Suppapan and Supmee, 2016). For implication to management, *D. scortum* population along the Thailand coast should be managed as single units because *D. scortum* population carries the same genetic structure.

Conclusions

In conclusion, our study showed that the genetic diversity of *D. scortum* was low. There is no population genetic structure in *D. scortum* due to high gene flow and no geographic barrier along the Andaman Sea. These results provide necessary information for management strategies to maintain genetic diversity and suggest a proper way to catch *D. scortum* in Thailand.

Acknowledgments

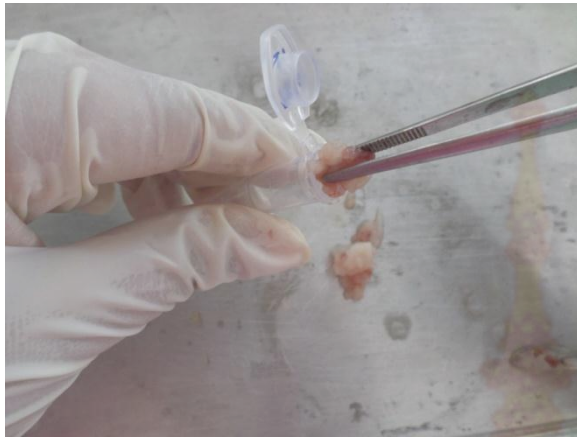
Financial support of our research was fully granted by Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat, Thailand, which we are much appreciated.

References

- Avice, J.C. (2000). Phylogeography. London: Harvard University Press.
- Excoffier, L. and H.E.L Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analysis under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. 10: 564-567.
- Fu, F.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics. 147: 915-925.

- Grant, W.S. and B.W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*. 89: 415-426.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.
- Ma, C.Y., Q.Q. Cheng, Q.Y. Zhang, P.V. Zhuang and Y.L. Zhao. 2010. Genetic variation of *Coiliaeactenes* (Clupeiformes: Engraulidae) revealed by the complete cytochrome b sequences of mitochondrial DNA. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 385: 14-19.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- Nei, M. and F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*. 97: 145-163.
- Ramirez-Soriano, A., S.E. Ramos-Onsins, J. Rozas, F. Calafell and A. Navarro. 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*. 179: 555-567.
- Russo, C.A.M., A.M. Sole-cava and J.P. Thorpe. 1994. Population structure and genetic variation in two tropical sea anemones (Cnidaria, Actinidae) with different reproductive strategies. *Marine Biology*. 119: 267-276.
- Singh, Y.T., M. Krishnamoorthy and S. Thippeswamy. 2012. Seasonal changes in the biochemical composition of wedge clam, *Donax scortum* from the Padukere beach, Karnataka. *Recent Research in Science and Technology*. 4(12): 12-17.
- Supmee, V., J. Suppapan, J. Pechsiri, P. Sangthong. 2017. Population genetic structure of Greenback mullet (*Liza subviridis*) along the Andaman Sea coast of Thailand. *Journal of Fisheries Technology Research*. 11(2): 98-110. (in Thai)
- Supmee, V., L. Ngernsiri, A. Sriboonlert, P. Wonnapijit and P. Sangthong. 2012. Population genetic analysis of Violet vinegar crab (*Episesarma versicolor*) along the Andaman sea coast of Thailand. *Zoological Studies*. 51(7): 1040-1050.
- Suppapan, J., J. Pechsiri, S. O-Thong, A. Vanichanon, P. Sangthong and V. Supmee. 2017. Population genetic analysis of Oceanic paddle crab (*Varuna litterata*) in Thailand. *Sains Malaysiana*. 46(12): 2251-2261.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585-595.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.
- Uthicke, S. and J.A.H. Benzie. 2003. Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from Indo-Pacific. *Molecular Ecology*. 12: 2635-2648.
- Xu, Q., R. Liu and Y. Liu. 2009. Genetic population structure of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the East China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 371: 121-129.
- Wang, W., C. Ma, W. Chen, H. Zhang, W. Kang, Y. Ni and L. Ma. 2017. Population genetic diversity of Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) from southeast coastal regions of China based on mitochondrial COI gene sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*. 71: 114-120.
- Yang, Z. (2006). *Computational molecular evolution*. New York: Oxford University Press.
- Zhang, Y., F. Yang, Z. Wang, Q. You, B. Lou, D. Xu, R. Chen, W. Zhan and F. Liu. 2017. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure in the Small yellow croaker at the coast of Yellow Sea and East China Sea. *Biochemical Systematics and Ecology*. 71: 236-243.

ภาคผนวกที่ 4 ภาพกิจกรรมในการทำงานวิจัย



การบรรจุเนื้อเยื่อลงหลอดทดลอง



ตัวอย่างเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง



การสกัดดีเอ็นเอ



การบดเนื้อเยื่อ



เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม



การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม



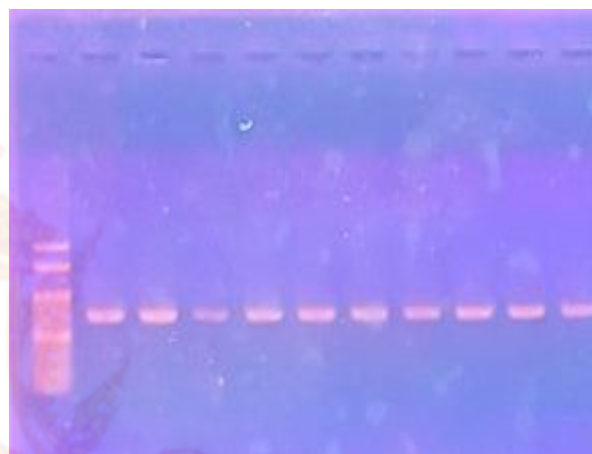
การแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า



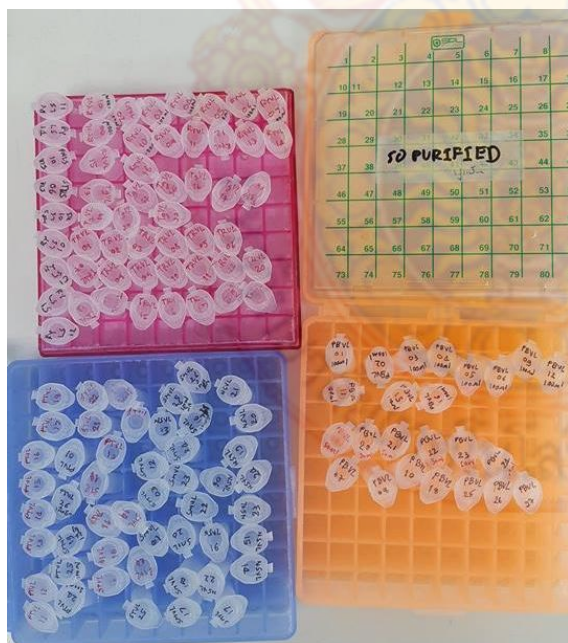
การย้อมสีดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์



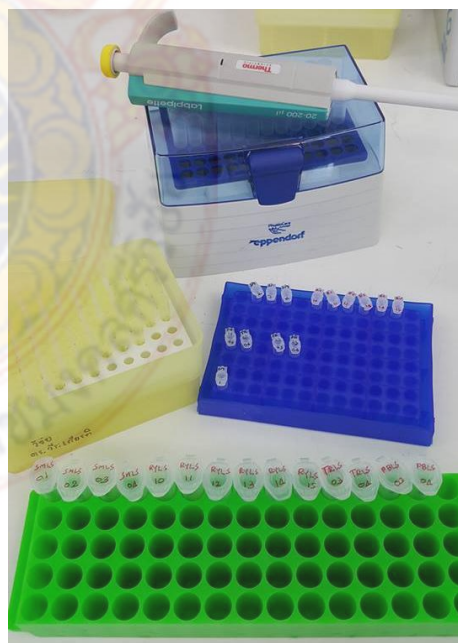
เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอ



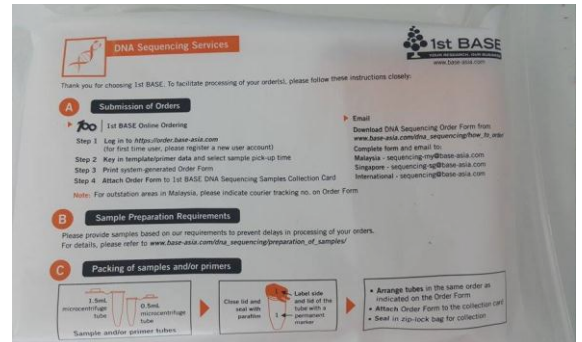
ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอ



ตัวอย่างดีเอ็นเอที่รอการทำให้บริสุทธิ์



การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์



การเตรียมตัวอย่างเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่พร้อมส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์



ผลลำดับนิวคลีโอไทด์อ่านโดยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor

