Executive summary

Pufferfish specimens were collected from twelve Provinces of Thailand, namely Chanthaburi, Trat, Ranong, Trang, Chumphon, Surat Thani, Nakhon Si Thammarat, Songkhla, Ayutthaya, Sakon Nakhon, Nakhon Phanom and Udon Thani. Thirteen pufferfish species, including *Diodon hystrix*, *D. liturosus*, *Chilomycterus orbicularis*, *Arothron reticularis*, *Lagocephalus spadiceus*, *L. lunaris*, *L. inermis*, *L. sceleratus*, *Tetraodon fangi*, *T. nigroviridis*, *T. fluviatilis*, *T. palembangensis*, *Takifugu oblongus*, were clearly classified base on morphology.

Total genomic DNA successfully extracted from almost species, except *T. palembang*ensis and, *L. sceleratus*, and their nucleotide sequences of *12sRNA* and *Cytb* genes were analyzed. The alignment analysis of *12SrRNA* and *Cytb* sequences showed the appropriate sites and types of molecular markers for pufferfish species identification. Seven types of markers were developed and named as shown below.

Marker KU_sRUFR1 was a pair of universal primers for amplification and sequencing eleven species of pufferfish and thirteen other fish species. All obtained sequences were deposited to GenBank database.

Marker Mul_ILS was a mixture of primers base on multiplex PCR method containing three pair primers for identification of the genus *Lagocephalus* including, *L. inermis*, *L. lunaris* and *L. spadiceus*.

Marker pfSR_FLI66 was a species – specific primer for *L. inermis*.

Marker pfSR_FLL678 was a species – specific primer for *L. lunaris*.

Marker pfSR_FLS108 was a species – specific primer for *L. spadiceus*.

Marker MulCB_TT was specific for species of the genus *Tetraodon* and it could separate *T. nigroviridis* from *T. fluviatilis* - *T. fangi* group.

Marker TFV_BciVI based on PCR-RFLP method for T. *fluviatilis* and *T. fangi* identification.

The validations of all markers were tested using pufferfish and fourteen other fish species. All markers showed the high accuracy without the miss identification. Moreover, the other tests showed that the sample tissues for diagnosis by developed marker in this study could be both fresh and cooked tissues.

บทคัดย่อ

เครื่องหมายโมเลกุล 7 ชนิดซึ่งตั้งชื่อว่า KU_sRUFR1, Mul_ILS, pfSR_FLI66, PfSR_FLL678, pfSR_FLS108, MulCB_TT และ TFV_BciVI ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อระบุชนิดของปลาปักเป้าที่พบในประเทศไทย เครื่องหมาย KU_sRUFR1 เป็นคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จากดีเอ็นเอต้นแบบจากปลาหลายชนิด (universal primer) ผลการใช้เครื่องหมาย KU_sRUFR1 กับปลาปักเป้าตัวอย่างที่รวบรวมได้ พบว่าสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ปลาปักเป้าได้ 11 ชนิด คือ *Diodon hystrix D. liturosus Chilomycterus orbicularis Arothron reticularis Lagocephalus spadiceus L. lunaris L. inermis Tetraodon fangi T. nigroviridis T. fluviatilis* และ *Takifugu oblongus* กับปลาอื่นๆ ที่ไม่ใช่ปลาปักเป้าอีก 13 ชนิด เครื่องหมาย Mul_ILS ใช้เทคนิค multiplex PCR ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ สามารถใช้ระบุชนิดปลาปักเป้าสกุล *Lagocephalus* 3 ชนิด คือ *L. spadiceus L. lunaris* และ*L. inermis* เครื่องหมาย pfSR_FLI66 pfSR_FLL678 และ pfSR_FLS108 เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าชนิด *L. spadiceus L. lunaris* และ*L. inermis* ตามลำดับ เครื่องหมาย MulCB_TT เป็นเครื่องหมายที่ใช้เทคนิค multiplex PCR มีความจำเพาะต่อปลาปักเป้าสกุล *Tetraodon* และสามารถใช้แยกชนิด *T. nigroviridis* ออกจากกลุ่มของชนิด *T. fluviatilis – T. fangi* ได้ เครื่องหมาย TFV_BciVI เป็นเครื่องหมายที่ใช้เทคนิค PCR-RFLP ใช้ระบุชนิดปลาปักเป้า *T. fluviatilis* และ *T. fangi* เครื่องหมายทุกชนิดผ่านการทดสอบความแม่นยำในการระบุชนิดโดยใช้ตัวอย่างที่ทดสอบเป็นปลาปักเป้าชนิดต่างๆ และปลาที่ไม่ใช่ปลาปักเป้า ผลจากการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายที่ได้มีความแม่นยำสูงมาก นอกจากนี้เครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นยังถูกทดสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากเนื้อปลาสดและเนื้อปลาแปรรูป (ลูกชิ้นปลา) พบว่าสามารถระบุชนิดได้เช่นเดียวกัน

Abstract

Seven types of molecular makers for identification of pufferfish species were developed namely KU_sRUFR1, Mul_ILS, pfSR_FLI66, PfSR_FLL678, pfSR_FLS108, MulCB_TT และ TFV_BciVI. Marker KU_sRUFR1 was a pair of universal primers for sequencing eleven spices of pufferfish including *Diodon hystrix D. liturosus Chilomycterus orbicularis Arothron reticularis Lagocephalus spadiceus L. lunaris L. inermis Tetraodon fangi T. nigroviridis T. fluviatilis* and *Takifugu oblongus*, and fourteen other fish species. Marker Mul_ILS, base on multiplex PCR method, was a mixture of six primers using for identification the pufferfish of the genus *Lagocephalus.* Markers pfSR_FLI66, PfSR_FLL678 and pfSR_FLS108 were species-specific primers for *L. inermis, L. lunaris* and *L. spadiceus*, respectively. Marker MulCB_TT, base on multiplex PCR method, was a mixture of three primers for separation *T. nigroviridis* from *T. fluviatilis – T. fangi* group. While, marker TFV_BciVI could segregrate *T. fluviatilis* from *T. fangi*. The efficiency of each marker was tested with sample tissues of pufferfish and other fishes. The results showed that all markers have high accuracy for pufferfish identification. Moreover, they worked well with both fresh and cooked tissues.