

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการสายวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมและ
โครงสร้างประชากรของสาหร่ายทะเลสีแดง *Gracilaria salicornia* ตามแนว
ชายฝั่งทะเลของประเทศไทย โดยอ้างอิงจากดีเอ็นเอในนิวเคลียสและออร์แกเนลล์
เพื่อนำไปสู่ข้อเสนอแนะเพื่อการอนุรักษ์และการจัดการ

ผู้วิจัย สังกัด

1. ผศ. ดร. ณรงค์ฤทธิ์ เมืองใหม่ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คณะที่ปรึกษา สังกัด

1. รศ. ดร. อนงค์ จีรภัทร์ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. Assoc. Prof. Dr. Giuseppe C. Zuccarello, School of Biological
Science, Victoria University of Wellington

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ความเข้าใจทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของทรัพยากรมีความจำเป็นอย่างมากในการจัดการและการอนุรักษ์แหล่งทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งของประเทศไทย สาหร่ายทะเล *Gracilaria salicornia* พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน ถึงแม้ว่าสาหร่าย *G. salicornia* มีการแพร่กระจายเป็นบริเวณกว้างและมีความหลากหลายทางนิเวศวิทยา การศึกษาทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมเชิงพื้นที่และโครงสร้างประชากรของสาหร่ายชนิดนี้ยังมีอยู่อย่างจำกัด โดยเฉพาะบริเวณคาบสมุทรมลายู การศึกษาในครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม สายวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ และโครงสร้างประชากรของสาหร่าย *G. salicornia* ในประเทศ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในคลอโรพลาสต์ (RuBisCo spacer) ไมโทคอนเดรีย (COI) และในนิวเคลียส (ITS2) ตัวอย่างสาหร่าย *G. salicornia* จำนวน 140 ตัวอย่างถูกเก็บจาก 14 กลุ่มประชากร ครอบคลุมทั้งทะเลอันดามัน (9 กลุ่มประชากร) และอ่าวไทย (5 กลุ่มประชากร) จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่า *G. salicornia* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ โดยประกอบไปด้วย 6 แฮพโลไทป์ (GS1 – GS6) ของยีน RuBisCo spacer 8 แฮพโลไทป์ (GC1 – GC8) ของยีน COI และ 5 แฮพโลไทป์ (GI1 – GI5) ของยีน ITS2 นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรในอ่าวไทยมีความคล้ายคลึงกันมาก ในขณะที่ประชากรบริเวณทะเลอันดามันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง การวิเคราะห์ความแตกต่างของประชากรด้วยค่า F_{ST} ชี้ให้เห็นว่าประชากรทางชายฝั่งทะเลอันดามันและอ่าวไทยมีความแตกต่างทางพันธุกรรม ผลการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรด้วยวิธี SAMOVA จากข้อมูลยีน COI ทำให้ทราบว่าประชากรทางชายฝั่งอันดามันและอ่าวไทยแยกออกจากกันอย่างชัดเจน จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้พบว่าสายวิวัฒนาการทางภูมิศาสตร์ของประชากรสาหร่าย *G. salicornia* บริเวณคาบสมุทรมลายูมีการแยกออกจากกันระหว่างชายฝั่งทะเลทางด้านตะวันตกและตะวันออก และรูปแบบการแพร่กระจายดังกล่าวอาจเกิดจากเหตุการณ์ทางชีวภูมิศาสตร์ของแผ่นดินซุนดา การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศและกระแสน้ำและการเคลื่อนย้ายของมวลน้ำในมหาสมุทร

คำสำคัญ: การแพร่กระจาย ความหลากหลายทางพันธุกรรม ประชากร วงศ์วานวิวัฒนาการ สาหร่ายขนาดใหญ่ สาหร่ายทะเล

Abstract

For long-term management and conservation of marine resources in Thailand an understanding of their genetic diversity and geographic distribution is necessary. *Gracilaria salicornia* is a marine red alga, which commonly found in tropical and subtropical regions. Despite its diverse ecology and broad distribution, spatial genetic variation and population structure of this species remains understudied, especially in Thai-Malay peninsula. We analyzed genetic diversity, phylogeographic patterns and population structure of *G. salicornia* using nuclear (ITS2), chloroplast (RuBisCo spacer) and mitochondrial DNA (COI) sequence from eastern and western coasts of Thailand. A total of 140 samples was collected from 14 populations (9 populations from Andaman Sea and 5 populations from the Gulf of Thailand). Our genetic analysis indicated a relatively low genetic diversity, consisting of six haplotypes of RuBisCo spacer (GS1 – GS6), eight haplotypes for COI (GC1 – GC8) and five haplotypes for ITS2 (GI1 – GI5). Our data also demonstrated a genetically homogeneous populations in the Gulf of Thailand. While, a high genetic diversity was observed from Andaman Sea populations. Population pairwise F_{ST} values indicated that Andaman Sea population was genetically distinct from the gulf populations. Results of SAMOVA based on COI sequences also indicated weak but significant genetic break between eastern and western populations. Our study suggests the east–west phylogeographic break of *G. salicornia* population in Thai-Malay peninsula and this pattern can likely be facilitated by historical biogeographic events of Sundaland, climate change and regional and local current pattern.

Keyword: genetic diversity, distribution, macroalgae, phylogeny, population, seaweed

Executive Summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในการจัดการและการอนุรักษ์แหล่งทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งของประเทศไทย ความเข้าใจทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของทรัพยากรดังกล่าวมีความจำเป็นอย่างมาก สาหร่ายทะเลสีแดงมีความสำคัญทั้งทางด้านนิเวศวิทยาและเศรษฐกิจ สาหร่ายสีแดง *Gracilaria salicornia* (C. Agardh) E.Y. Dawson หรือที่คนไทยเรียกว่า “สาหร่ายข้อ” ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เช่น นำมาบริโภค และนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดวุ้น (agar) นอกจากนี้ สารสกัดที่ได้จากสาหร่าย *G. salicornia* ยังมีคุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด สาหร่ายชนิดนี้มีการแพร่กระจายเป็นบริเวณกว้างในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน โดยเฉพาะในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สาหร่าย *G. salicornia* มีลักษณะทลัสส์เป็นข้ออย่างชัดเจนและมีการแตกแขนงอย่างไม่เป็นระเบียบ

ในประเทศไทย สาหร่าย *G. salicornia* มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางทั้งทางด้านอ่าวไทยและทะเลอันดามัน สาหร่ายชนิดนี้ถูกนำมาบริโภคและใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตปุ๋ยหมักอย่างแพร่หลาย ในบริเวณภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ของสาหร่าย *G. salicornia* ในประเทศไทยมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่การเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ยังมีข้อจำกัด กล่าวคือการเพาะเลี้ยงยังอยู่ในพื้นที่ฟาร์มที่มีขนาดเล็กหรือขนาดกลางเท่านั้น งานวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการติดตามศึกษาระยะยาวของประชากรสาหร่ายวุ้นสกุล *Gracilaria* ในประเทศไทย พบว่ามีการลดลงของจำนวนประชากรสาหร่าย *G. salicornia* บริเวณอ่าวไทยตอนบน จากการศึกษาชี้ให้เห็นถึงการใช้ทรัพยากรมากเกินไปถึงศักยภาพของประชากรสาหร่าย *G. salicornia* ที่มีอยู่ในธรรมชาติ ด้วยอาจเนื่องมาจากการขยายตัวของตลาดและความต้องการที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจนำไปสู่การทำลายแหล่งทรัพยากรธรรมชาติของประชากรสาหร่าย *G. salicornia* รวมไปถึงการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมและส่งผลกระทบต่อพันธุกรรมในระดับประชากรและการสูญเสียความสามารถในการปรับตัวต่อการรบกวนจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ถึงแม้ว่าจะมีการใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์จากสาหร่าย *G. salicornia* อย่างแพร่หลายในประเทศไทย แต่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายชนิดนี้ยังไม่เคยมีการศึกษา

ด้วยเหตุนี้ความรู้และความเข้าใจที่เกี่ยวข้องกับความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างประชากร และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของสาหร่าย *G. salicornia* จึงมีความจำเป็นเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดการและการอนุรักษ์ รวมไปถึงการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนของแหล่งทรัพยากรในธรรมชาติ

2. วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบของสายวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ ความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างประชากรของสาหร่ายสีแดง *G. salicornia* ในประเทศไทย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในนิวเคลียสคลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้การศึกษานี้ยังสำรวจความเชื่อมโยงประชากรของสาหร่ายชนิดนี้ระหว่างชายฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน

3. ระเบียบวิธีวิจัย

การเก็บตัวอย่างสาหร่าย

เก็บตัวอย่างสาหร่าย *G. salicornia* จากชายฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน โดยกำหนดจุดเก็บทางฝั่งอ่าวไทย ได้แก่ ตราด จันทบุรี ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี และ นครศรีธรรมราช และทางชายฝั่งทะเลอันดามัน ได้แก่ ระนอง พังงา ภูเก็ต กระบี่ ตรัง และสตูล ซึ่งในแต่ละจุดเก็บ จะทำการเก็บตัวอย่าง อย่างน้อย 15 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างโดยรวมประมาณ 200 ตัวอย่าง และเก็บบันทึกพิกัดของจุดเก็บตัวอย่างอย่างละเอียดโดยใช้เครื่อง GPS ตัวอย่างสาหร่ายจะถูกเก็บในซิลิกาเจล อัดแห้ง และบางส่วนดองในน้ำยาฟอร์มาลิน 4 %

การศึกษาในปฏิบัติการ

การสกัดดีเอ็นเอ

โดยใช้ชิ้นส่วนบริเวณปลายยอดของสาหร่าย ขนาด 5-10 มิลลิกรัม และใช้ชุดสกัด DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) หรือสกัดโดยใช้ Chelex 100 Molecular Biology Grade Resin

การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พรีเมอเรส เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณ ITS2 (nuclear DNA), COI (mitochondrial DNA) and RuBisCo spacer (plastid DNA) และทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose) ความเข้มข้น 1 % หลังจากนั้นทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มขนาดได้ด้วย QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) หรือ ExoSap-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix) หลังจากนั้นส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว ไปยังบริษัท Macrogen ที่ประเทศเกาหลีใต้ เพื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์ ตรวจสอบและตัดแต่งเส้นลายนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Geneious (Biomatters, <http://www.geneious.com>) การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากร โดยใช้โปรแกรม DnaSP v 5.10.1, Arlequin v 3.5.1.3 และ SPADS 1.0 นอกจากนี้ วิเคราะห์สายวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ โดยสร้างวงศาวินัยวิวัฒนาการ ด้วยวิธีการ Maximum Likelihood และ Bayesian Inference โดยใช้ซอฟต์แวร์ raxmlGUI v1 5b1 และ MrBayes 3.2 ตามลำดับ และสร้าง haplotype network เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมของประชากร ด้วยวิธี minimum spanning โดยใช้โปรแกรม PopART v1.7

4. ผลการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรสาหร่าย *G. salicornia* ที่แพร่กระจายอยู่บริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน (9 ประชากร) และอ่าวไทย (5 ประชากร) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน RuBisCo spacer, COI และ ITS2 พบว่าสาหร่าย *G. salicornia* มีความหลากหลายที่ไม่สูงมากนัก เมื่อเทียบกับการศึกษาในสาหร่ายชนิดเดียวกันก่อนหน้านี้ในบริเวณอื่น

การวิเคราะห์ความหลากหลายของแฮพโลไทป์ของทั้ง 3 ยีน ทำให้พบว่า ยีน RuBisCo spacer ประกอบไปด้วย 6 แฮพโลไทป์ (GS1 – GS6) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 124 ตัวอย่าง ยีน COI ประกอบไปด้วย 8 แฮพโลไทป์ (GC1 – GC8) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 135 ตัวอย่าง และ ยีน ITS2 ประกอบไปด้วย 5 แฮพโลไทป์ (GI1 – GI5) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 41 ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมชี้ให้เห็นว่า ยีน COI (0.1 – 1.8%) มีความหลากหลายสูงที่สุด รองลงมาคือ ยีน RuBisCo spacer (0.2 – 1.4%) และ ยีน ITS2 (0.1 – 0.8%) นอกจากนี้ข้อมูลทางพันธุกรรมของทั้ง 3 ยีนชี้ให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรในอ่าวไทยค่อนข้างต่ำ ในขณะที่ประชากรจากทะเลอันดามันมีความหลากหลายที่สูงกว่า การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างระหว่างประชากรของยีน COI และ RuBisCo spacer ชี้ให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างประชากรจชายฝั่งทะเลอันดามันและอ่าวไทย

การวิเคราะห์โครงสร้างทางประชากรด้วยวิธี SAMOVA ของข้อมูล COI สามารถจัดกลุ่มประชากรได้ 2 กลุ่ม แบ่งเป็น กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยประชากรจากทะเลอันดามัน และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยประชากรจากอ่าวไทย

ความแตกต่างทางประชากรของสาหร่าย *G. salicornia* บริเวณชายฝั่งทะเลที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงของแผ่นดินซุนดา การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ และกระแสน้ำและการเคลื่อนย้ายของมวลน้ำในมหาสมุทร ผลการวิจัยนี้สามารถนำมาใช้ในการวางแผนการจัดการและการอนุรักษ์ทรัพยากรชีวภาพสาหร่ายในประเทศไทย

Introduction to the research problem and its significance

Red alga *Gracilaria salicornia* (C.Agardh) E.Y.Dawson is relatively common in tropical and subtropical regions, especially in Southeast Asia (Lim et al. 2001; Yang et al. 2013). It is characterized by decumbent and segmented constricted thallus and irregularly branching pattern (Lewmanomont 1994) (Fig. 1). This species has been used for local food and as a source of agar (Critcheley and Ohno 1998; Lewmanomont 1998). Furthermore, the extract of *G. salicornia* possesses antioxidant activity and appreciable antimicrobial activity (Vijayavel and Martinez 2010; Rasooli et al. 2015).



Fig. 1. Habit of *Gracilaria salicornia* from southern Thailand

In Thailand, *G. salicornia* is widely distributed along two coastal areas of the country: west coast – the Andaman Sea (Indian Ocean) and east coast – the Gulf of Thailand (Pacific Ocean)

(Lewmonomont 1994, Chirapart 2008). This alga is used more commonly as a source of local food and fertilizer, especially in southern and eastern part (Lewmanomont 1978).

Recently commercial utilizations of *G. salicornia* are likely to be rapidly increased in Thailand, while the cultivation of *G. salicornia* is still limited to small and medium scale. In addition, previous study on long term monitoring of gracilarioid algae in Thailand clearly indicated the decrease of *G. salicornia* biomass along the coasts of the upper Gulf of Thailand (Chirapart, 2016). It is likely that the natural population of *G. salicornia* is being threatened by overharvesting due to expanding markets and increasing demand, and this can lead to the resources destruction, including the losses in genetic diversity that result in the extinction at population level or even whole species. However, there have been no studies examining the population genetic diversity of *G. salicornia* in Thailand.

As a result, knowledge regarding genetic diversity, population structure and geographic distribution of this alga is needed for the establishment of resources management as well as for the conservation and sustainable use of natural community.

Literature review

***Gracilaria* in Thailand**

Red alga *Gracilaria* Greville is the most diverse genus within the Family Gracilariaceae, which includes more than 120 species widely distributed in tropical and subtropical waters throughout the world (Guiry and Guiry 2016). This alga is a major source of food for human and aquatic animal, and also plays an important role in the production of agar (Oliveira et al. 2002). In addition, some species of *Gracilaria* have the potential of pharmacological use for treating condition such as cancer, AIDS, general inflammation, arthritis as well as bacteria infection (Almeida et al. 2011). Due to their economic and medical importance, many *Gracilaria* species are currently cultivated in several countries, for example, Chile, China, Taiwan, Indonesia, Philippine and Thailand (Armisen 1995; Lewmanomont 1998).

In Thailand, about 17 species of *Gracilaria* have been recognized, including *G. bangmeina*, *G. changii*, *G. edulis*, *G. eucheumatoides*, *G. firma*, *G. fisheri*, *G. lantanensis*, *G. longirostris*, *G. minuta*, *G. multifurcata*, *G. percurrents*, *G. rhodymenioides*, *G. rubra*, *G. salicornia*, *G. tenuistipitata*, *G. textorii* and *G. urvillei* (Lewmanomont 1994; Chirapart and Ruangchaui 1999; Lewmanomont and Chirapart 2004, Chirapart 2008, Muangmai et al. 2014a) (Fig. 2.). These taxa are found in several parts of the country, particularly in Pattani, Songkhla and Trat Provinces.

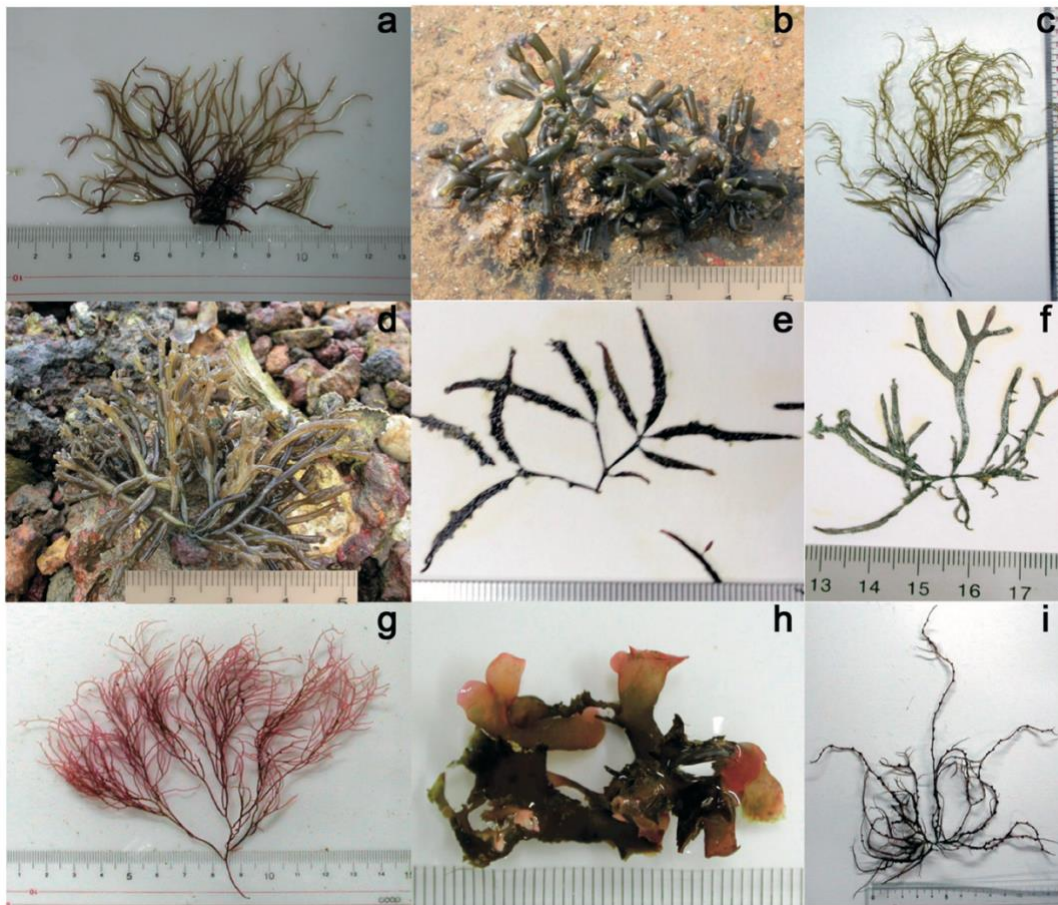


Fig. 2. Habit of some *Gracilaria* distributed in Thai waters. (a) *G. edulis*, (b) *G. salicornia* (c) *Gracilariopsis* sp., (d) *G. firma*, (e) *G. changii*, (f) *Gracilaria* sp., (g) *G. rubra*, (h) *G. rhodymenioides*, and (i) *G. tenuistipitata* (Chirapart et al. 2016)

Among Thai *Gracilaria* species, *G. changii*, *G. edulis*, *G. fisheri*, *G. salicornia* and *G. tenuistipitata* are the most abundant and are commonly harvested for human food, agar extraction and abalone feed (Chirapart 2016) (Fig. 3).



Fig. 3. Monoline cultivation of *Gracilaria fisheri* in earthen pond (Photo by Anong Chirapart)

Classification of Thai *Gracilaria* species is traditionally based on habit morphology and reproductive features (Lewmanomont 1994; Chirapart and Ruangchaui 1999; Lewmanomont and Chirapart 2004, Chirapart 2008). Due to a few diagnostic morphological characteristics and high level of intraspecific morphological variation, species identification is still uncertain. Recently a combined morphological and molecular data is applied to solve a taxonomic problem of some *Gracilaria* species in Thailand, for examples, the transfer of *Gracilaria irregularis* to the genus *Gracilariopsis* (Muangmai et al 2014b), and to establish a new species, for example, a flattened species *Gracilaria lantaensis* (Muangmai et al 2014a) (Fig. 4.). However, diversity and taxonomic studies of *Gracilaria* species in the country are poorly documented in comparison with that research from other country in Asia, such as Malaysia (Lim and Phang 2004; Yow et al. 2011, 2013; Ng et al. 2014), Singapore (Ng et al. 2015), Taiwan (Lin 2006; Lin et al. 2012) and Korea (Yang et al. 2008, 2012, 2013). Taking this into account, the species richness of *Gracilaria* species could be underestimated, with many yet to be described species in Thai water.



Fig. 4. Habit of *Gracilaria lantanensis*, a flattened species from Lanta Island, Krabi province, southern Thailand (Photo by Jantana Saengkaew)

Phylogeny and genetic diversity of *Gracilaria*

Molecular biology has revolutionized the understanding of diversity and phylogenetic relationships of the Gracilariaceae (Bird et al. 1992; Bellorin et al. 2002; Gurgel and Fredericq 2004; Lyra et al. 2015). Plastid DNA, especially the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (*rbcL*), has often been used to investigate the systematics and phylogeny of the Gracilariaceae, and clearly indicated the two main clades, one clade representing the genus *Gracilaria* (a species with solitary spermatangial cavity) and another clade representing the genus *Hydropuntia* (a species with multi spermatangial cavities) (Gurgel and Fredericq 2004). However, a recent study using the combined three-gene (*rbcL*, *UPA* and *cox1*) showed that the monophyly of the two genera is not supported and returned all the species to the genus *Gracilaria* (Lyra et al. 2015) (Fig. 5.).

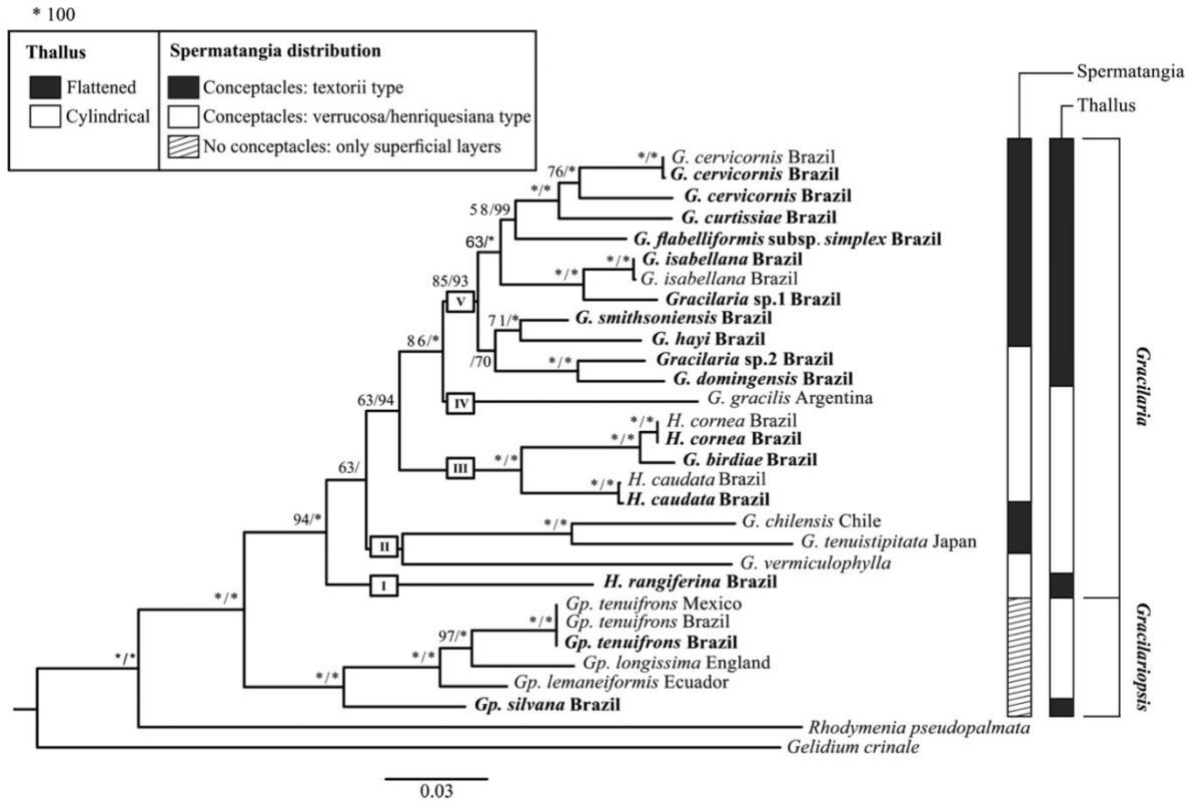


Fig. 5. Maximum likelihood (ML) tree based on the combined three-gene (*rbcL*, UPA, and *cox1*) of *Gracilaria* species.

Different molecular markers have been applied in studies of phylogeny and genetic diversity of *Gracilaria*, including internal transcribed spacer (ITS) of nuclear DNA (Goff et al. 1994; Bellorin et al. 2002), cytochrome oxidase 2-cytochrome oxidase 3 intergenic spacer (*cox2-3* spacer) (Rueness 2005; Yang et al. 2013) and cytochrome c oxidase subunit I (COI) (Yang et al. 2008, 2013) of mitochondrial DNA, and RuBisCo large and small subunit intergenic spacer (RuBisCo spacer) of plastid DNA (Byrne et al. 2002, Guillemín et al. 2008). These molecular markers can be useful to determine the intra- and interspecific genetic variation, population structure and connectivity of *Gracilaria* species (Yang et al. 2008; Kim et al. 2010; Yang et al. 2013; Yow et al. 2013, 2014; Guillemín et al. 2014).

In Southeast Asia, many previous studies have been done to examine the genetic diversity of some *Gracilaria* species. For example, intraspecific genetic variation of *G. tenuistipitata* has been investigated, suggesting a low level of genetic diversity in Southeast Asian waters (Song et al, 2015). In contrast, pattern of high genetic diversity was observed in *G. salicornia*, and eight mitochondrial haplotypes (H1 – H2) were detected along the coastal areas of Southeast Asian (Ng et al. 2015, Yang et al 2013) (Fig. 6.)

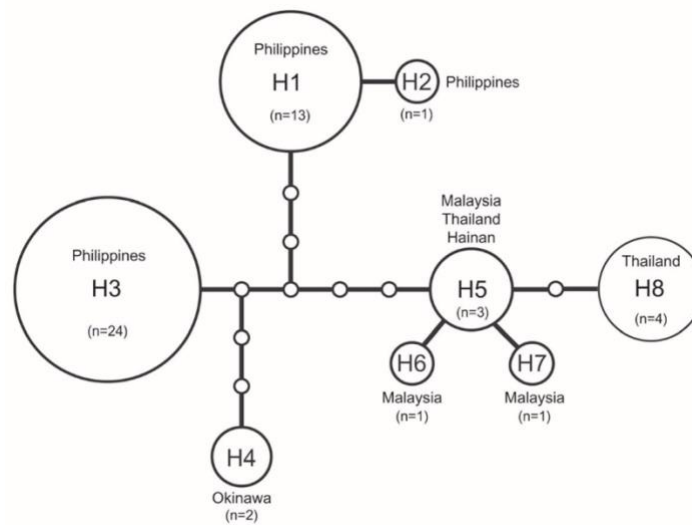


Fig. 6. A statistical parsimony network for COI sequences of 8 haplotypes (H1-H8) in *Gracilaria salicornia* (Yang et al. 2013)

Phylogeographic pattern of *Gracilaria* in Southeast Asia

Phylogeography is the field of study that aims to explain the process of geographical distribution of gene lineages within the population (Avice 2000). Mitochondrial DNA (mtDNA) sequences are most frequently employed for studying intraspecific phylogeography, especially cytochrome oxidase I (COI) because of its relatively rapid substitution rate and non-recombining maternal mode of inheritance (Avice 2000). In marine algae, other genetic markers are also used, for

example, RuBisCo spacer (plastid DNA) and ITS (non-coding nuclear regions) (Cho et al. 2007; Zuccarello et al. 2011).

Phylogeography and population genetic structure have been done in *G. salicornia* along the coast of Malaysia (Ng et al 2015), indicating the low level of genetic variation among algal populations, and lack of apparent geographic structure. Despite low genetic variation, molecular data clearly suggested a phylogeographic split that largely corresponded to Peninsular Malaysia and East Malaysia (Ng et al 2015). Additionally, Ferrer et al. (2019) examined the genetic diversity of *G. salicornia* populations in Philippines and found the high level of genetic diversity, with recognition of eight novel COI haplotypes (Fig. 7). Recently 16 COI haplotypes of *G. salicornia* are reported worldwide.

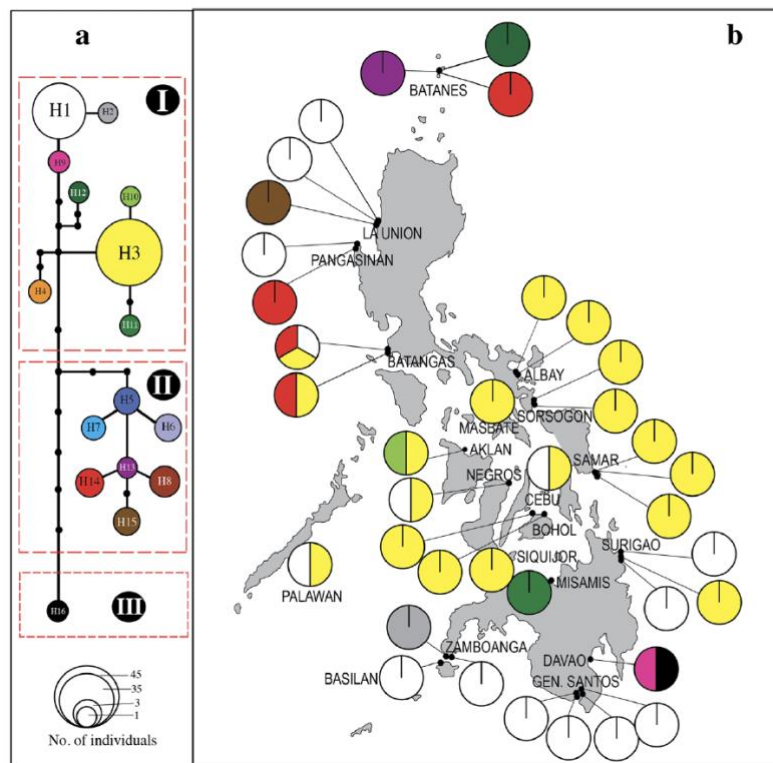


Fig. 7. Haplotype diversity of *G. salicornia*. (a) COI haplotype network, (b) COI haplotype distribution in Philippine (Ferrer et al 2019)

In Thailand, many phylogeographic studies have been mostly conducted for marine brown algae along the coasts of Thai-Malay peninsula. Molecular genetic analyses have found a genetic break between Andaman Sea and Gulf of Thailand populations of *Sargassum polycystum* (Kantachumpoo et al. 2014) and *Padina boryana* (Wichachucherd et al. 2014). This phylogeographic separation may potentially affect other algal species around the peninsula. However, very little is known about the phylogeographic structure, genetic variation and population structure of red seaweed, including *Gracilaria* species, in the country.

Materials and methods

Algal Sampling

Samples of *Gracilaria salicornia* were collected from 14 sites along the Gulf of Thailand and the Andaman Sea (Fig. 8.) in 2017 to 2018. In each study site, algal samples were randomly collected at least 10–15 samples and then preserved in silica gel for both morphological and molecular analyses. Voucher specimens were deposited at the Department of Fishery Biology, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Thailand. For morphological observation, hand cut sections of preserved samples were made with razor blades and subsequently simultaneously staining and preserving the specimens in 1 % aniline blue acidified with 1 % HCl and mounted in 50 % glucose syrup (Karo Syrup, Corn Products) on microscope slides. Images were photographed with a microscope digital camera and eventually edited using Photoshop 2020 (Adobe, San Jose, CA, USA). All specimens were morphologically identified based on previous species descriptions (e.g. Lewmanomont 1994, Lewmanomont and Ogawa 1995). For DNA analyses, algal samples were rinsed with autoclaved seawater to remove any sand and dirt, and then the apical portions were used for DNA isolation.

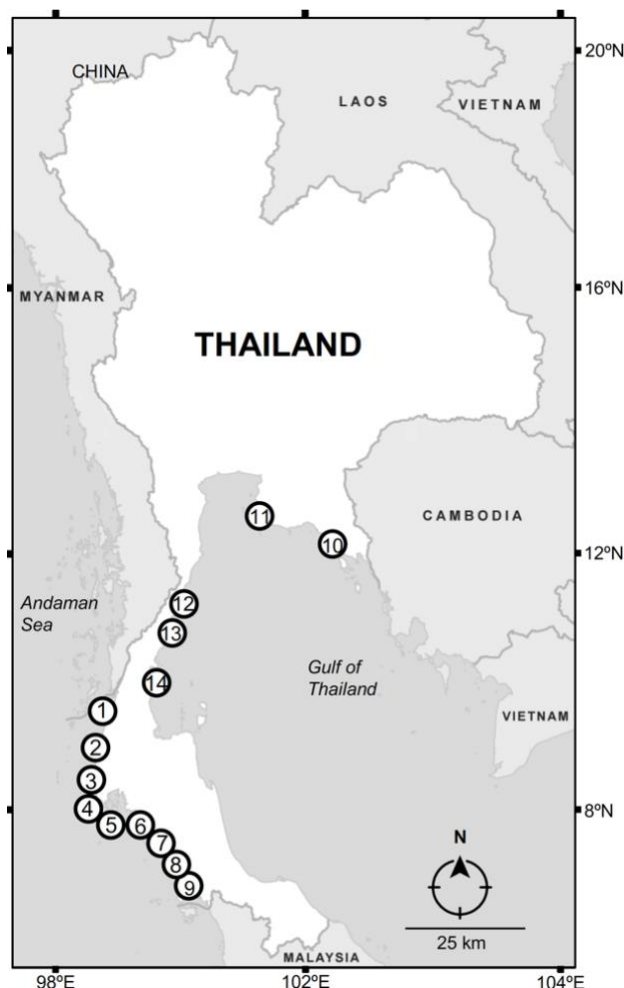


Fig. 8. Map showing the collection sides around Thailand

Andaman Sea: (1-2) Ranong Province, (3) PhangNga Province, (4-5) Phuket Province, (6) Krabi Province, (7-8) Trang Province, (9) Satun Province

The Gulf of Thailand: (10) Trad Province, (11) Chonburi Province, (12-13) Prachuap Khiri Khan Province, (14) Chumphon Province

DNA Extraction, PCR and Sequencing

Total DNA was extracted from 5–10 mg of dried algal tissue using a modified Chelex method (Zuccarello et al. 1999a) or using a QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California USA) according to the manufacturer's protocols. Four different molecular markers were used: ITS2 (nuclear DNA), and COI (mitochondrial DNA) and RuBisCo spacer (plastid DNA). PCR and sequencing will be performed using different primer combination: ITS3 and ITS4 (White et al. 1990) for ITS2; GazF1 and GazR1 (Saunders 2005) for COI; spacer-F and spacer-R, or rbcF1 and rbcR2-M2 (Maggs et al. 1992; Zuccarello et al. 1992b) for RuBisCo spacer. PCR procedures followed Nunez-Resendiz et al. (2015). PCR products were confirmed by gel electrophoresis in 1% agarose, and

then purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, California USA). Purified PCR products were commercially sequenced (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

Alignment of DNA sequence and data analyses

All DNA sequences were edited and aligned using Geneious Prime software (Biomatters, <http://www.geneious.com>) and then manually checked by eye. For phylogenetic analyses, the data set included haplotypes obtained from this study and additional sequences retrieved from GenBank. Phylogenetic relationships were determined using maximum likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI). DNA substitution models were determined using jModelTest 2 (Tanabe 2011). ML analyses were performed in raxmlGUI v1.3 (Silvestro and Michalak 2012) with the GTR + I + R under the option 'ML + thorough bootstrap', and bootstrapping values were calculated from 1,000 pseudoreplicates. BI analyses were conducted with MrBayes v3.2 (Ronquist et al. 2012) under the appropriated model indicated by BIC (K80 + G to the codon position 1 and HKY85 + G to the codon position 2 and 3). Analyses were run for 2,000,000 generations of four Markov chains in two runs, sampling every 100 generation, and the first 25% of saved trees will be discarded as burn-in. ML and BI trees were edited with the program FigTree v1.3.1 (Rambaut 2009).

Haplotype analysis was performed using the data set that included all sequences generated in this study and haplotypes from previous studies (e.g. Yang et al. 2013). The genetic diversity indices, including number of haplotype (H), haplotype diversity (H_d) and nucleotide diversity (π), for each population was assessed using DnaSP v5.10.01 (Librado and Rozas 2009). Statistical parsimony networks were constructed using PopART v1.7 (University of Otago, available from <http://popart.otago.ac.nz>.) to observe the relationship among haplotypes.

For population structure analysis, pairwise fixation index (F_{ST}) values between populations was calculated through Arlequin v 3.5.1.3 (Excoffier and Lischer 2010). Population structure was further analyzed using the SAMOVA algorithm (Dupanloup et al. 2002) to define groups of populations based on the combined information between geographic distances and genetic variation, implemented in SPADS 1.0 (Dellicour and Mardulyn 2014).

Historic population demography was determined using two different methods: statistical tests of neutrality and mismatch distribution. Tajima's D (Tajima 1989) and Fu's F_S tests will be used to test for deviation from selective neutrality, and these analyses were carried out using

DnaSP. Analyses of mismatch distribution were performed in Arlequin with 1000 bootstrap replicates. This method was usually applied to measure the past population expansion with two different mode shapes: unimodal for a recent population expansion and multimodal for a stationary population at demographic equilibrium (Harpending 1994).

Results

Morphological observation

Morphologically, *G. salicornia* is characterized by prostrate, semierect or erect thalli, cylindrical branches with constricted segments, oval spermatangial conceptacle, globose cystocarp with thick pericarp and lateral and upper nutritive filaments within mature cystocarp.

All samples of *G. salicornia* collected in this study were identified into two major thallus type: an erect form with segmented constricted thalli (Fig. 9A) and a prostrate form with non-segmented constricted thalli (Fig. 9B). The two forms can be found on both coasts of the country.



Fig. 9. Habit of *Gracilaria salicornia*

(A) Erect form, with segmented constricted thalli
(B) Prostrate form, with non-segmented constricted thalli

Molecular analyses

RuBisCo spacer sequences

The RuBisCo spacer sequences of 340 – 360 bp, including gaps, were successfully generated from 121 samples of 14 populations of *G. salicornia* from both coasts of Thailand; nine populations (1–9) from Andaman Sea and five populations (10–14) from the Gulf of Thailand (Table 1). Genetic distance among these sequences ranged from 0.2 to 1.4%. ML and BI analyses yielded almost completely topologically congruent, and ML tree is only presented in Fig. 10. Phylogenetic analyses demonstrated the monophyly of *G. salicornia*, with a recognition of two clade: one for Pacific Ocean populations and one for Indian Ocean populations. A total of 6 different haplotypes (CS1 – CS6) were identified in this study (Table 1). Haplotype and genetic diversity indices of the two cryptic species in each population are presented in Table 1. Haplotype diversity (H_d) ranged from 0.00 to 0.436. Nucleotide diversity (π) was relatively low, varying from 0.0000 to 0.0059 (Table 1).

Table 1. Collection localities and genetic diversity parameters referred from RuBisCo spacer of *Gracilaria salicornia* in Thailand

Population number	Locality	Number of individuals examined	Haplotype Present	<i>Hd</i>	π
<i>Andaman Sea</i>					
1	Bang Ben Beach, Ranong	9	GS3(5), GS5(1), GS6(3)	0.537($\pm$ 0.13)	0.00236($\pm$ 0.0001)
2	Koh Kum Nui, Ranong	10	GS3(4), GS5(2), GS6(4)	0.522($\pm$ 0.11)	0.00408($\pm$ 0.0001)
3	Ao Khoei, Phang Nga	10	GS2(2), GS4(2), GS5(3), GS6(3)	0.611($\pm$ 0.07)	0.00593($\pm$ 0.0004)
4	Nai Yang Beach, Phuket	9	GS2(1), GS4(2), GS5(3), GS6(2)	0.436($\pm$ 0.13)	0.00187($\pm$ 0.0012)
5	Rawai Beach, Phuket	7	GS2(1), GS3(3), GS4(3),	0.462($\pm$ 0.09)	0.00261($\pm$ 0.0005)
6	Lanta Island, Krabi	9	GS2(1), GS3(2), GS4(3), GS6(2)	0.600($\pm$ 0.10)	0.00234($\pm$ 0.0001)
7	Li Bong Island, Trang	10	GS2(2), GS3(2), GS5(3), GS6(3)	0.572($\pm$ 0.06)	0.00322($\pm$ 0.0006)

8	Ratchamongkol Beach, Trang	7	GS1(3), GS4(3), GS5(1)	0.551(± 0.09)	0.00208(± 0.0017)
9	Pak Bara, Satun	10	GS1(2), GS2(2), GS4(3), GS6(3)	0.678(± 0.09)	0.00341(± 0.0012)
<i>The Gulf of Thailand</i>					
10	Laem Sok, Trad	9	GS1(5), GS2(4)	0.436(± 0.13)	0.00153(± 0.0004)
11	Samaesan, Chonburi	9	GS1(5), GS2(4)	0.436(± 0.13)	0.00153(± 0.0004)
12	Ta Mong Rai, Prachuap Khan	7	GS1(7)	0.00	0.00
13	Wanakorn Beach, Prachuap Khan	8	GS1(7)	0.00	0.00
14	Thungwualaen Beach, Chumphon	7	GS1(7)	0.00	0.00

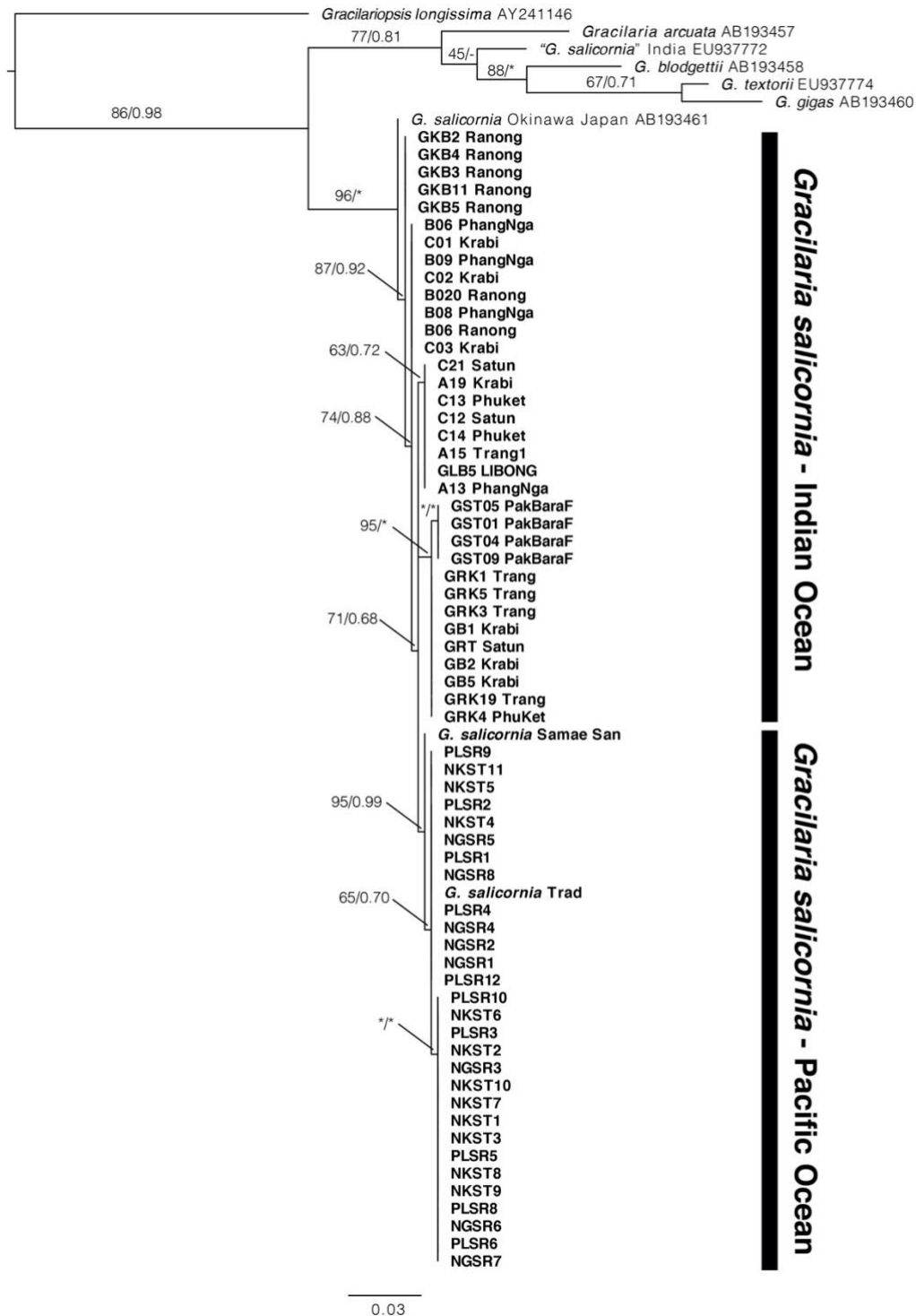


Fig. 11. ML tree of RuBisCo spacer sequence data of *Gracilaria salicornia* and other closely related species. Support values at each node are bootstrap percentage from ML (left) and Bayesian poster probability (PP) (right). Asterisk (*) indicates full support (100%, 1.0). Taxa in bold labeled correspond to new sequences from this study.

COI sequences

The COI sequences of 666 bp were successfully generated from 135 samples of 14 populations of *G. salicornia* from both coasts of Thailand; nine populations (1-9) from Andaman Sea and five populations (10–14) from the Gulf of Thailand (Table 2). Genetic distance among these sequences ranged from 0.1 to 1.8%. ML and BI analyses yielded almost completely topologically congruent, and ML tree is only presented in Fig. 11. Phylogenetic analyses demonstrated the monophyly of *G. salicornia*, with a recognition of two clade: one for Pacific Ocean population and one for Indian Ocean population. A total of 8 different haplotypes (GC1 – GC8) were identified in this study (Table 2) Haplotype and genetic diversity indices of the two cryptic species in each population are presented in Table 2. Haplotype diversity (H_d) ranged from 0.00 to 0.71. Nucleotide diversity (π) was relatively low, varying from 0.0000 to 0.0059 (Table 2).

Table 2. Collection localities and genetic diversity parameters referred from COI of *Gracilaria salicornia* in Thailand

Population number	Locality	Number of individuals examined	Haplotype Present	<i>Hd</i>	π
<i>Andaman Sea</i>					
1	Bang Ben Beach, Ranong	10	GC7(4), GC4(6)	0.530(±0.13)	0.00236(±0.0001)
2	Koh Kum Nui, Ranong	10	GC2(5), GC4(5)	0.510(±0.11)	0.00331(±0.0003)
3	Ao Khoei, Phang Nga	10	GC2(6), GC3(2), GC4(2)	0.621(±0.11)	0.00293(±0.0008)
4	Nai Yang Beach, Phuket	8	GC6(5), GC7(3)	0.363(±0.13)	0.00153(±0.0005)
5	Rawai Beach, Phuket	10	GC6(5), GC7(5)	0.420(±0.11)	0.00251(±0.0003)
6	Lanta Island, Krabi	8	GC2(4), GC8(4)	0.445(±0.10)	0.00360(±0.00001)
7	Li Bong Island, Trang	14	GC3(3), GC5(6), GC6(4), GC7(1)	0.580(±0.11)	0.00313(±0.00001)
8	Ratchamongkol Beach, Trang	12	GC2(1), GC4(3), GC5(5), GC6(3)	0.713(±0.11)	0.00594(±0.0008)
9	Pak Bara, Satun	7	GC2(3), GC5(1), GC4(2), GC8(1)	0.502(±0.11)	0.00133(±0.0012)

The Gulf of Thailand

10	Laem Sok, Trad	10	GC1(10)	0.00	0.00
11	Samaesan, Chonburi	10	GC1(10)	0.00	0.00
12	Ta Mong Rai, Prachuap Khiri Khan	9	GC1(9)	0.00	0.00
13	Wanakorn Beach, Prachuap Khiri Khan	7	GC1(7)	0.00	0.00
14	Thungwualaen Beach, Chumphon	10	GC1(10)	0.00	0.00

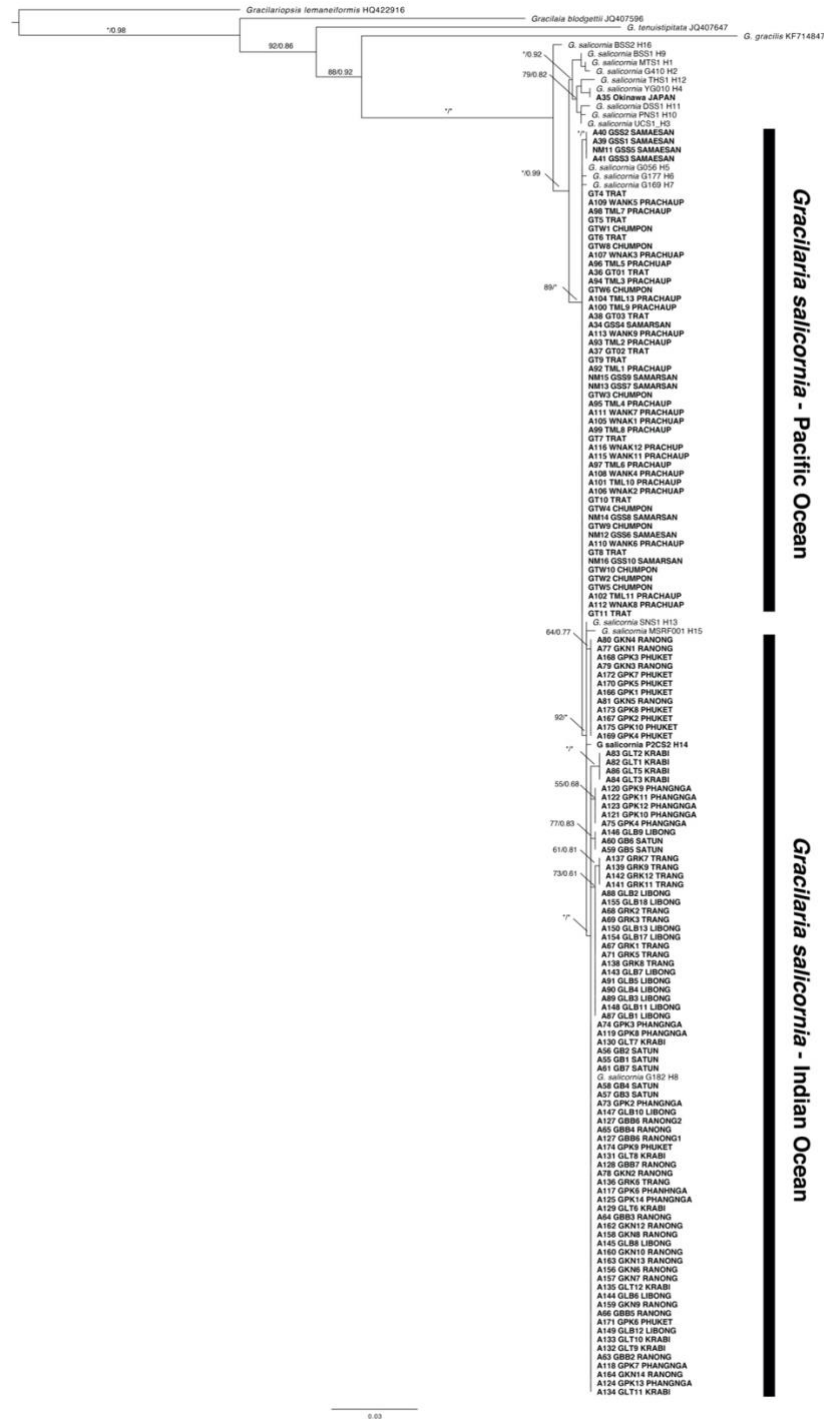


Fig. 11. ML tree of COI sequence data of *Gracilaria salicornia* and other closely related species. Support values at each node are bootstrap percentage from ML (left) and Bayesian posterior probability (PP) (right). Asterisk (*) indicates full support (100%, 1.0). Taxa in bold labeled correspond to new sequences from this study.

ITS2 sequences

The ITS2 sequences of 911 bp, including gaps, were successfully generated from 41 samples of 14 populations of *G. salicornia* from both coasts of Thailand (Table 3). Genetic distance among these sequences ranged from 0.1 to 0.8%. ML and BI analyses yielded almost completely topologically congruent, and ML tree is only presented in Fig. 12. Phylogenetic analyses demonstrated the monophyly of *G. salicornia*, with a recognition of two clade: one for Pacific Ocean population and one for Indian Ocean population. A total of 5 different haplotypes (GI1 – GI5) were identified in this study (Table 3). Haplotype and genetic diversity indices of the two cryptic species in each population are presented in Table 3. Haplotype diversity (H_d) ranged from 0.00 to 0.43. Nucleotide diversity (π) was relatively low, varying from 0.0000 to 0.0037 (Table 3).

Table 3. Collection localities and genetic diversity parameters referred from ITS2 of *Gracilaria salicornia* in Thailand

Population number	Locality	Number of individuals examined	Haplotype Present	<i>Hd</i>	π
<i>Andaman Sea</i>					
1	Bang Ben Beach, Ranong	5	GI2(3), GI3(1), GI4(1)	0.432($\pm$ 0.13)	0.00336($\pm$ 0.0001)
2	Koh Kum Nui, Ranong	3	GI2(2), GI3(1)	0.282($\pm$ 0.01)	0.00214($\pm$ 0.00001)
3	Ao Khoei, Phang Nga	2	GI2(2)	0.00	0.00
4	Nai Yang Beach, Phuket	2	GI3(2)	0.00	0.00
5	Rawai Beach, Phuket	2	GI2(2)	0.00	0.00
6	Lanta Island, Krabi	2	GI2(2)	0.00	0.00
7	Li Bong Island, Trang	3	GI2(2), GI4(1)	0.312($\pm$ 0.05)	0.00372($\pm$ 0.00005)
8	Ratchamongkol Beach, Trang	3	GI2(3)	0.00	0.00
9	Pak Bara, Satun	1	GI2(1)	0.00	0.00
<i>The Gulf of Thailand</i>					
10	Laem Sok, Trad	5	GI1(5)	0.00	0.00
11	Samaesan, Chonburi	4	GI1(3), GI5(1)	0.412($\pm$ 0.03)	0.00112 ($\pm$ 0.00001)

12	Ta Mong Rai, Prachuap Khiri Khan	5	GI1(5)	0.00	0.00
13	Wanakorn Beach, Prachuap Khiri Khan	3	GI1(2), GI5(1)	0.307(± 0.03)	0.00212(± 0.00001)
14	Thungwualaen Beach, Chumphon	3	GI1(3)	0.00	0.00

Haplotype distribution

Due to a limited sequence of ITS2, we used only COI and RuBisCO spacer sequences for generating the pattern of haplotype distribution pattern (Fig. 13). Along the Gulf of Thailand, diversity of COI and RuBisCo spacer sequences were homogenous. Only COI haplotype GC1 and RuBisCo haplotypes GS1 and GS2 were observed in the gulf (Fig. 13). On the other hand, COI haplotypes GC2 – GC8 and RuBisCo haplotypes GS1 – GS6 were distributed along the Andaman Sea. Haplotype diversity in Andaman Sea populations was higher than the Gulf of Thailand populations.

Haplotypes network

RuBisco haplotype network

Median-joining haplotype network constructed using RuBisco spacer sequences was presented in Fig. 14. *Gracilaria salicornia* consisted of six haplotypes (GS1 – GS6). Haplotypes network of this species was relatively complex. Common haplotype was GS1 (45% of samples) and GS2 (25% of samples), occurring across nearly all populations (Table 1). Haplotype GS1 and GS2 were shared on both coasts of the country. Other four haplotypes were restricted to Andaman Sea. Population pairwise F_{ST} values showed moderately significant population differentiation between Andaman Sea and the upper Gulf of Thailand ($P < 0.05$).

COI haplotype network

Gracilaria salicornia revealed eight haplotypes (GC1 – GC8) (Fig. 15.). Haplotype GC1 was common, accounting for 30% of all samples, and it occurred only in the Gulf of Thailand. Haplotype GC2 was common, accounting for 25% of all sample, and confined in Andaman Sea (Table 2). Haplotype GC2 – GC8 was only detected from Andaman Sea. Population pairwise F_{ST} values indicated that Andaman Sea population was genetically distinct from the gulf populations

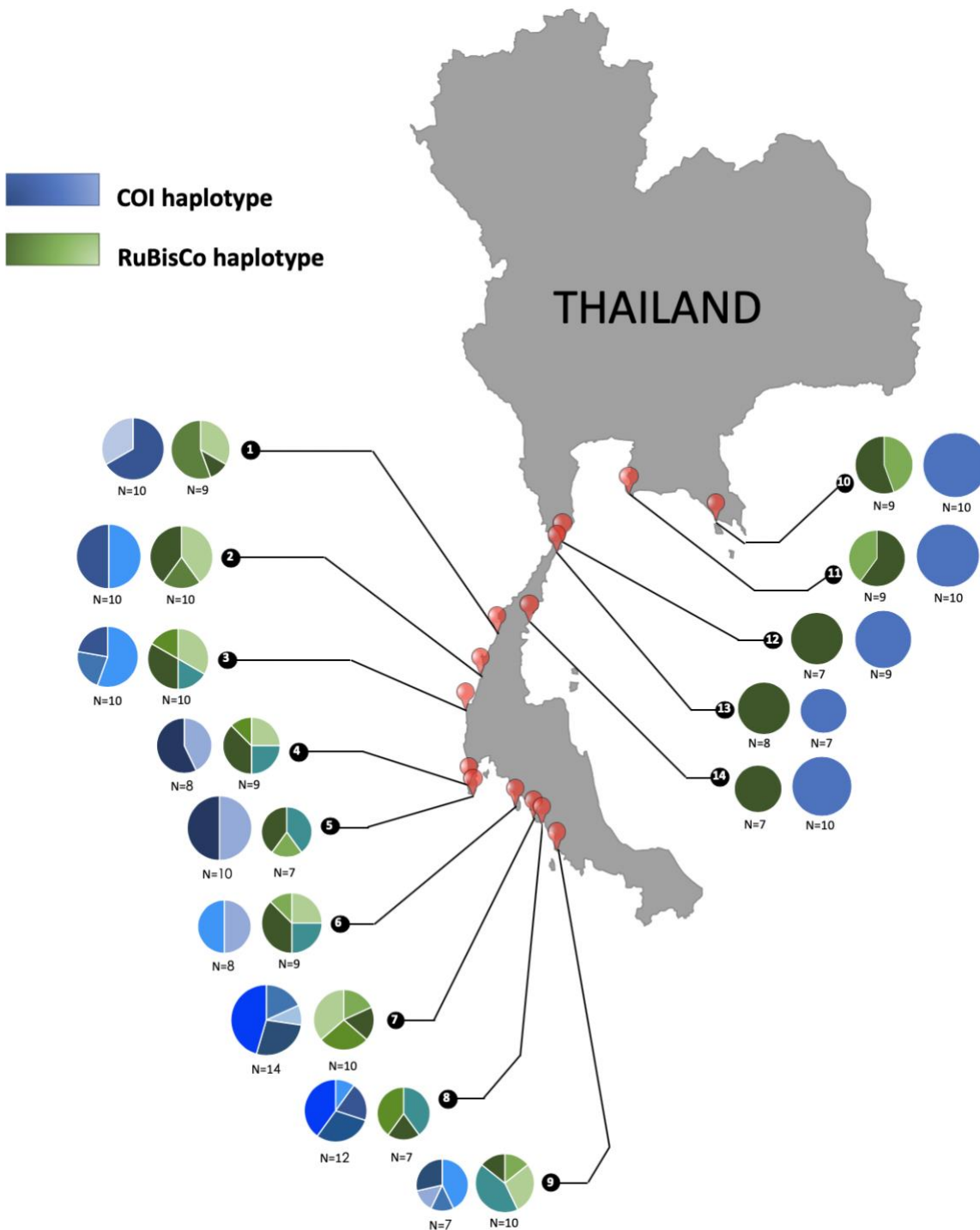


Fig. 13. Haplotype distribution of *Gracilaria salicornia* referred from COI and RuBisCo spacer sequences along the coastal areas of Thailand. Each pie chart shows the proportion of haplotypes. Population codes and sample sizes (in parentheses) are indicated next to the pie charts.

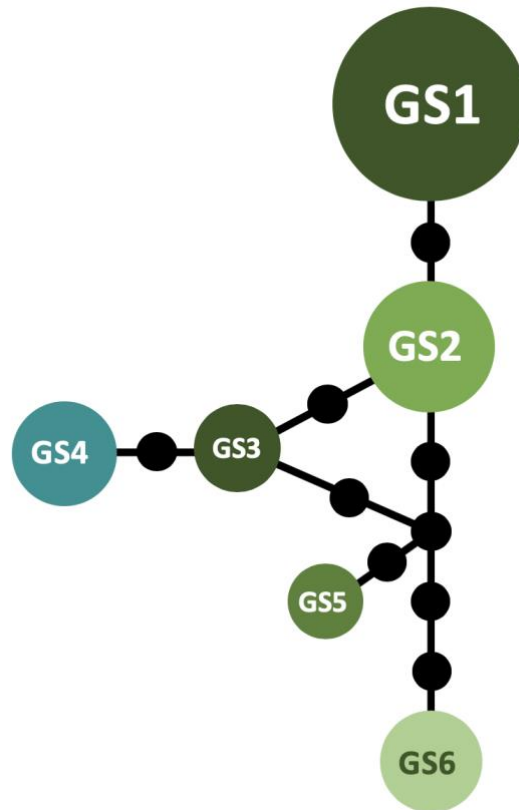


Fig. 14. RuBisCo haplotype networks *Gracilaria salicornia* obtained from the median-joining analyses.

ITS2 haplotype network

Five haplotypes (GI1 – GI5) was detected for *G. Salicornia* (Fig. 16). Haplotypes GI1 and G5 were mainly observed from the gulf, and GI2, GI3 and GI4 were detected from Andaman Sea. Haplotypes GI1 and GI2 were common in this study. Haplotype GI3 was confined to northern Andaman Sea (populations 1 and 2 from Ranong Province) and Haplotype GI4 was found in populations 1 (Ranong Province) and 7 (Trang Province) (Table 3).

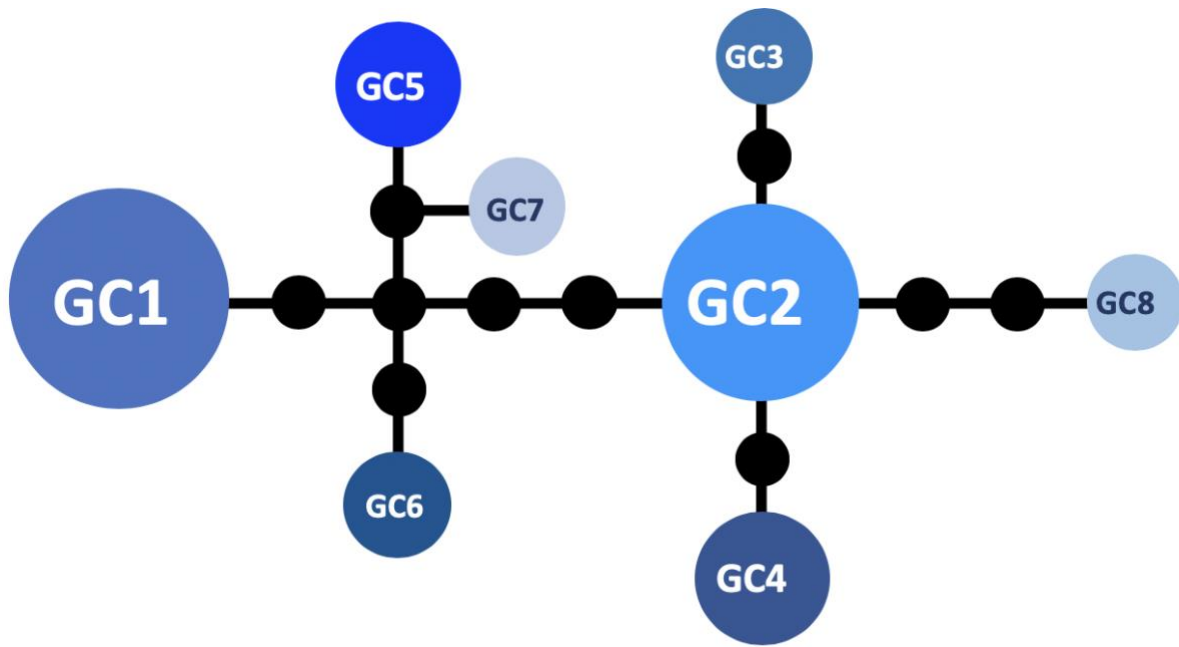


Fig. 15. COI haplotype networks *Gracilaria salicornia* obtained from the median-joining analyses.

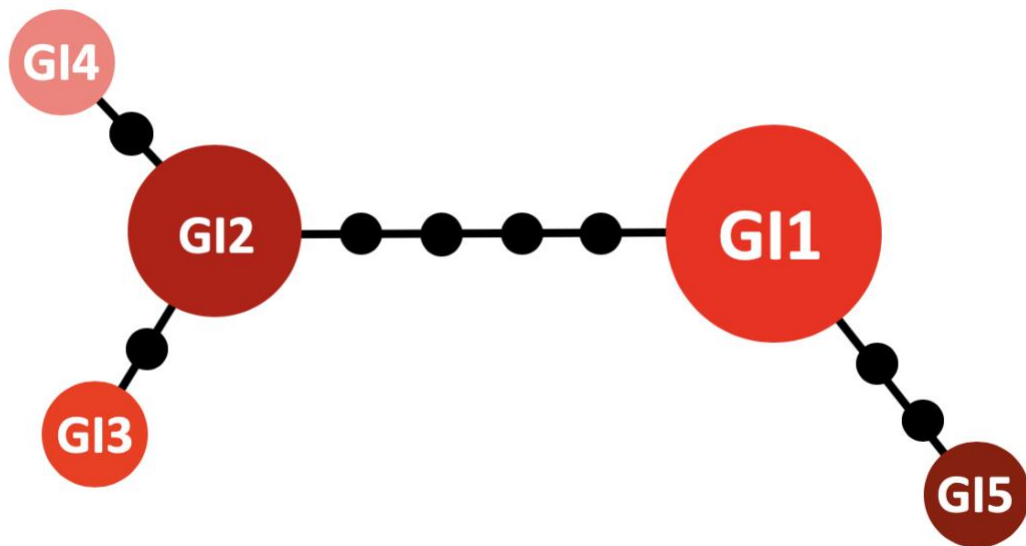


Fig. 16. COI haplotype networks *Gracilaria salicornia* obtained from the median-joining analyses.

Populations structure

SAMOVA (Spatial Analysis of Molecular Variance) was employed to group populations of *G. salicornia* based on genetic similarity and geographic distance. COI sequences of population 1, 2, 5, 6, 8 and 9 from Andaman Sea and population 10, 11, 12, 13 and 14 from the gulf were used for SAMOVA analysis. Population structure analyses based on the SAMOVA algorithm showed that 10 populations of *G. salicornia* were clustered into two groups ($K = 2$, $F_{CT} = 0.52$, $P < 0.05$): Andaman Sea population (group 1) and the Gulf of Thailand population (group 2) (Fig. 17). SAMOVA analysis indicated the genetic differentiation between the two sides of peninsula.

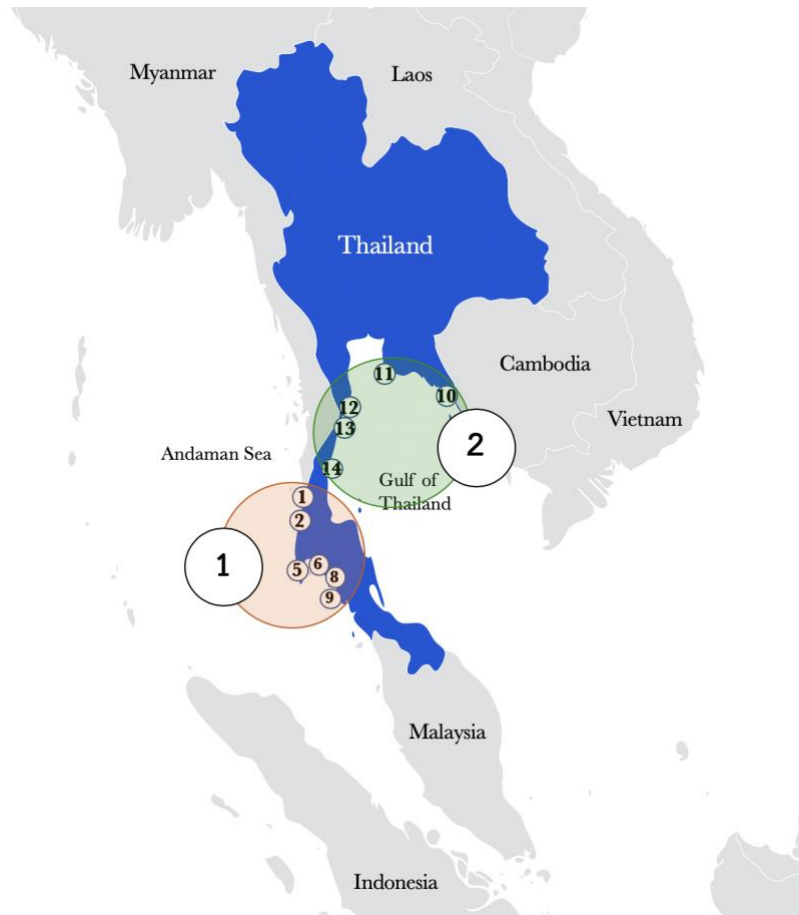


Fig. 17. Cluster analyses based on SAMOVA for species *Gracilaria salicornia*. Small circles represent the populations sampled in this analysis (Table 2). Shaded areas show population grouping designated by $K=2$; orange circle for group 1 and green circle for group 2.

Discussions

In Thailand, *G. salicornia* possesses a relatively low genetic diversity comparing to other studies of *G. salicornia* in other areas (Kim et al. 2016, Ferrer et al. 2019). For example, Ferrer et al. (2019) reported about 16 COI haplotypes of *G. salicornia* from Philippine, which consisted of eight endemic haplotypes. This could be due to limited sampling site in this study.

Low genetic diversity is also observed in other algal marine species in Asia. For example, commercial red seaweed, *Kappaphycus alvarezii* contained five haplotypes from southeast Asian region (Lim et al. 2014). Common brown seaweed, *Sargassum polycystum*, comprised seven different haplotypes occurring across southeast Asia, and only four haplotypes were record in Thailand (Kantachumpoo et al. 2014). Additionally, phylogeographical study of the brown macroalga, *Sargassum aquifolium* revealed genetic homogeneity in Southeast Asia (Chan et al., 2014). Low genetic diversity of several species of seaweed could be explained by their recent recolonization, high dispersal ability or asexual propagation.

The present study also showed that genetic diversity *G. salicornia* from Andaman Sea was higher than from the Gulf of Thailand. Similarly, *S. polycystum* showed higher *cox3* haplotype diversity (four haplotype) in Andaman Sea than in the Gulf of Thailand (one haplotype). *Padina boryana* also demonstrated higher genetic diversity from Andaman Sea (seven ribotypes) than from the Gulf of Thailand populations (four ribotypes) (Wichachucherd et al. 2014). The difference of genetic composition between east-west coasts of Thailand could be explained by local ocean circulation and historical event.

Analysis of population structure of *G. salicornia* indicated the genetic discontinuity between Andaman Sea and the Gulf of Thailand. Many previous phylogeographic studies indicated the genetic difference between east and west coast of Thailand for marine species, for example, seagrass *Halophila ovalis* (R. Brown) J.D. Hooker (Nguyen et al., 2014), the mangrove *Rhizophora apiculata* Blume (Ng et al., 2015) and Asian moon scallop *Amusium pleuronectes* Linnaeus (Mahidol, U. et al. 2007). Genetic differences between the two coastal areas of Thailand could be explained based on the basis of physical oceanographic difference around the Thai-Malay peninsula.

References

- Armisen, R. 1995. World-wide use and importance of *Gracilaria*. J. Appl. Phycol. 7:231–243.
- Avice, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, UK. 447 pp.
- Bellorin, A. M., Oliveira, M. C. and Oliveira, E. C. 2002. Phylogeny and systematics of the marine algal family Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) based on small subunit rDNA and ITS sequences of Atlantic and Pacific species. J. Phycol. 38: 551–563.
- Bird, C. J., Ragan, M. A., Critchley, A. T., Rice, E. L. and Gutell, R. R. 1994. Molecular relationships among the Gracilariaceae (Rhodophyta): further observations on some undetermined species. Eur. J. Phycol. 29: 195–202.
- Byrne, K., Zuccarello, G. C., West, A. J., Liao, M. L. and Kraft, G.T. 2002. *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta) from southeastern Australia, including a new species, *Gracilaria perplexa* sp. nov.: morphology, molecular relationships and agar content. Phycol. Res. 50: 295–311
- Chirapart, A. and Ruangchaui, R. 1999. A new record of *Gracilaria*, *G. rubra* C.F. Chang et B.M. Xia from Thailand. In: I. A. Abbott (ed), *Taxonomy of Economic Seaweeds with reference to some Pacific species Vol. 7*, California Sea Grant College System. pp. 137–143.
- Chirapart, A. 2008. A review of the *Gracilaria* (sensu lato) from Thailand. In: S. M. Phang, K. Lewmanomont and P. E. Lim (eds), *Taxonomy of southeast Asian seaweeds*, Institute of Ocean and Earth Sciences monograph series 2. University of Malaya, Kuala Lumpur. pp. 45–61.
- Chirapart, A. 2016. Transition of species composition, abundance and distribution of the gracilarioid seaweeds (Rhodophyta) in coastal areas of the upper gulf of Thailand observed from 2004 to 2007. Nat. Hist. Bull. Siam Soc. (In press).
- Critchley, A.T. and Ohno, M. (eds). 1998. *Seaweed resources of the world*. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, Japan. 429 pp
- Cho, G. Y., Kogame, K. Kawai, H. and Boo, S. M. 2007. Genetic diversity of

- Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonaceae, Phaeophyceae) from the Pacific and Europe based on RuBisCo large subunit and spacer, and ITS nrDNA sequences. *Phycologia* 46:657-65.
- Dellicour, S. and Mardulyn, P. 2014. SPADS 1.0: a toolbox to perform spatial analyses on DNA sequence data sets. *Mol. Ecol. Resour.* 14: 647–51.
- Ferrer, M. S. R., Gomez R. N., Nacido C.B., Moises M.T. and R. V. Dumilag. 2019. Genetic diversity of Philippine *Gracilaria salicornia* (Gracilariaceae, Rhodophyta) based on mitochondrial COI-5P sequences. *Biologia*. 74:599–607.
- 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. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564–7.
- Goff, L. J., Moon, D. A. and Coleman, A. W. 1994. Molecular delineation of species and species relationships in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *J. Phycol.* 30:521–537.
- Guillemin, M. L., Akki, S. A., Givernaud, T., Mouradi, A., Valero M. and Destombe C. 2008. Molecular characterisation and development of rapid molecular methods to identify species of Gracilariaceae from the Atlantic coast of Morocco. *Aqua. Bot.* 89:324–330.
- Guillemin, M. L., Valero, M., Faugeron, S., Nelson, W. and Destombe C. 2014. Tracing the trans-Pacific evolutionary history of a domesticated seaweed (*Gracilaria chilensis*) with archaeological and genetic data. *PLoS ONE* 9: e114039.
- Guiry, M. D. and Guiry, G. M. 2012. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 30 June 2016.
- Gurgel, C. F. D. and Fredericq, S. 2004. Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): a critical assessment based on rbcL sequence analysis. *J. Phycol.* 40:138–159.
- Harpending, H. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66:591–600.
- Huynh, N. and Nguyen, D. 1998. The seaweed resources of Vietnam. In: Critchley,

- A., and Ohno, M. (eds) *Seaweed Resources of the World*. JICA, Yokosuka, Japan, pp. 62–69.
- Kantachumpoo, A., Uwai, S., Noiraksar, T. and Komatsu, T. 2014. Levels and distribution patterns of mitochondrial cox 3 gene variation in brown seaweed, *Sargassum polycystum* C. Agardh (Fucales, Phaeophyceae) from Southeast Asia. *J. Appl. Phycol.* 26:1301–1308.
- Kim, S. Y., Weinberger, F. and Boo, S. M. 2010. Genetic data hint at a common donor region for invasive Atlantic and Pacific populations of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 46:1346–1349
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–2.
- Lim, P. E., Thong, K. L. and Phang, S. M. 2001. Molecular differentiation of two morphological variants of *Gracilaria salicornia*. *J. Appl. Phycol.* 13:335–342.
- Lim, P. E. and Phang, S. M. 2004. *Gracilaria* species (Gracilariales, Rhodophyta) of Malaysia including two new records. *Malaysian Journal of Science.* 23:71–80.
- Lin, S.M. 2006. Observations on flattened species of *Gracilaria* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Taiwan. *J. Appl. Phycol.* 18:671–678.
- Lin, S. M., Liu, L.C. and Payri C. 2012. Characterization of *Gracilaria vieillardii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) and molecular phylogeny of foliose species from the western Pacific Ocean, including a description of *G. taiwanensis* sp. nov. *Phycologia.* 51:421–431.
- Lewmanomont, K. 1978. Some edible algae of Thailand. *The Kasetsart Journal.* 12: 119–129 (in Thai).
- Lewmanomont, K. 1994. The species of *Gracilaria* from Thailand. In: I. A. Abbott (ed), *Taxonomy of economic seaweed with reference to some Pacific species. Vol.4*, California Sea Grant College Program. pp. 135–148.
- Lewmanomont, K. and Ogawa, H. 1995. Common Seaweeds and Seagrasses of Thailand, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok. pp. 154.
- Lewmanomont, K. 1998. The seaweed resources of Thailand. In: A. Critchley and M. Ohno (eds), *Seaweed Resources of the World*. JICA, Yokosuka, Japan, pp. 70–78.

- Lewmanomont, K. and Chirapart, A. 2004. Additional records of *Gracilaria* from Thailand. In: I. A. Abbott and K. J. McDermid (eds), *Taxonomy of economic seaweed with reference to some Pacific species*, vol. 9, The University of Hawaii Sea Grant College Program. pp. 201–210.
- Lyra, G. de M., Costa, E. da Silva, Barreto de Jesus, P., Caires, T. A., Gama de Matos, J. C., Oliveira, M. C., Oliveira, E. C., Xi, Z. X., Nunes, J. M. C. and Davis, C. C. 2015. Phylogeny of Gracilariaceae (Rhodophyta): evidence from plastid and mitochondrial nucleotide sequences. *J. Phycol.* 51:356–366.
- Maggs, C. A., Douglas, S. E., Fenety, J. and Bird, C. J. 1992. A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *J. Phycol.* 28: 214–232.
- Mahidol, C., U. Na-Nakorn, S., Sukmanomon, N., Taniguchi, and Nguyen, T. T. T. 2007. Mitochondrial DNA diversity of the Asian moon scallop, *Amusium pleuronectes* (Pectinidae), in Thailand. *Mar. Biotechnol.* 9:352–359.
- Muangmai, N., Yamagishi, Y., Zuccarello, G. C., Chirapart, A. and Lewmanomont, K. 2014a. Transferring *Gracilaria irregularis* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Thailand to *Gracilariopsis* based on morphological and molecular analyses. *Phycol. Res.* 62:29–35.
- Muangmai, N., Zuccarello, G. C., Noiraksa, T. and Lewmanomont, K. 2014b. A new flat *Gracilaria*: *Gracilaria lantaensis* sp. nov. (Gracilariales, Rhodophyta) from the Andaman coast of Thailand. *Phycologia*. 53:137–145.
- Ng, P. K., Lim, P. E., and Phang, S. M. 2014. Radiation of the Red Algal Parasite *Congracilaria babae* onto a Secondary Host Species, *Hydropuntia* sp. (Gracilariaceae, Rhodophyta). *PLoS ONE*. 9:e97450.
- Ng, P. K., Lim, P. E., and Phang, S. M. 2015a. Small-scale genetic structure of *Gracilaria salicornia* and its red algal parasite, *G. babae* (Gracilariaceae, Rhodophyta), in Malaysia. *Bot. Mar.* 58:175–187.
- Ng, P. K., Lim, P. E. and Phang, S. M. 2015b. The first report of the parasitic red alga *Gracilaria babae* (Rhodophyta: Gracilariaceae) from Singapore. *Raffles Bull. Zool. Supplement* 31: 7–15.

- Ng, W. L., Y. Onishi, N. Inomuta, K. M. Teshima, T. H. Chan, S. Baba and Szmidt., A. E. 2015. Closely related and sympatric but not all the same: genetic variation of Indo-West Pacific *Rhizophora* mangroves across the Malay Peninsula. *Conserv. Genet.* 16: 137–150.
- Nguyen, V. X., Detcharoen, M., Tuntiprapas, P., Soe-Htun, U., Sidik, J. B., Harah, H. M. Z. and Papenbrock, J. 2014. Genetic species identification and population structure of *Halophila* (Hydrocharitaceae) from the Western Pacific to The Eastern Indian Ocean. *BMC Evol. Biol.* 14:92.
- Núñez-Resendiz, M. L., Dreckmann, K. M., Senties, A., Díaz-Larrea, J. and Zuccarello G. C. 2015. Genetically recognizable but not morphologically: the cryptic nature of *Hydropuntia cornea* and *H. usneoides* (Gracilariales, Rhodophyta) in the Yucatan Peninsula. *Phycologia*. 54:407–416.
- Rasooli, S., Sattari, M., Ramezanzpour, Z. and Namin, J. I. 2015. Antibacterial activities of bioactive compounds extracted from marine algae *Gracilaria salicornia* against *Aeromonas hydrophila*. *Intl. J. Aquat. Biol.* 3: 155–160.
- Rueness J. 2005. Life history and molecular sequences of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta), a new introduction to European waters. *Phycologia* 44: 120–128.
- Silvestro, D. and Michalak I. 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Org. Divers. Evol.* 12: 335–7.
- Saunders, G. W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future application. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360:1879–1888.
- Song, S. L., Lim, P. E., Poong, S. W. and Phang, S. M. 2015. Genetic variation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) from northern Singapore and neighbouring countries. *Raffles Bull. Zool. Supplement.* 31:16–23.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–95.
- Tanabe, A. S. 2011. Kakusan4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional, and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Mol. Ecol. Resour.* 11:914–21.

- Vijayavel, K. and Martinez, J. A. 2010. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of two Hawaiian marine limu: *Ulva fasciata* (Chlorophyta) and *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta). J. Med. Food. 13:1494–1499.
- Yang, E. C., Kim, M. S., Geraldino, P. J. L., Sahoo, D., Shin, J. A. and Boo, S. M. 2008. Mitochondrial cox1 and plastid rbcL genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). J. Appl. Phycol. 20:161–168.
- Yang, M, Y., Geraldino, P. J. L. and Kim, M. S. 2013. DNA barcode assessment of *Gracilaria salicornia* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Southeast Asia. Bot. Stud. 54: 27.
- Yow, Y. Y., Lim, P. E. and Phang, S. M. 2011. Genetic diversity of *Gracilaria changii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from west coast, Peninsular Malaysia based on mitochondrial cox1 gene analysis. J. Appl. Phycol. 23:219–226.
- Yow, Y. Y., Lim, P. E. and Phang, S. M. 2013. Assessing the use of mitochondrial cox1 gene and cox2-3 spacer for genetic diversity study of Malaysian *Gracilaria changii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Peninsular Malaysia. J. Appl. Phycol. 25:831–838.
- Zuccarello G. C., West J. A., Kamiya M. and King R. J. 1999a. A rapid method to score plastid haplotypes in red seaweeds and its use in determining parental inheritance of plastid in the red alga *Bostrychia* (Ceramiales). Hydrobiologia 401: 207–214.
- Zuccarello, G. C., West, J. A. and King, R. J. 1999b. Evolutionary divergence in the *Bostrychia moritziana*/B. *radicans* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta): molecular and hybridisation data. Phycologia 38: 234–244.
- Zuccarello, G. C., Buchanan, J., West, J. A. and Pedroche, F. F. 2011. Genetic diversity of the mangrove-associated alga *Bostrychia radicans*/*Bostrychia moritziana* (Ceramiales, Rhodophyta) from southern Central America. Phycol. Res. 59:98–104.