ปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยมหิดล สามารถถ่ายภาพส่วนของ hinge teeth ของลูกหอยนางรมได้ชัดเจนดี แต่การเตรียมตัวอย่างต้องอาศัยความชำนาญและประสบการณ์

การพัฒนาของลูกหอยตะโกรมกรามขาว *Crassostrea belcheri* จะคล้ายคลึงกับหอยชนิดอื่นในสกุล *Crassostrea* คือมีการเพิ่มขนาดขึ้นของ umbone ข้างซ้ายซึ่งยกขึ้นเหนือระนาบบานพับและม้วนตัวลงสู่บริเวณของบานพับที่เรียกว่า Opisthogyrate และมีการเจริญอย่างรวดเร็วที่ขอบด้าน anteroventral ทำให้เปลือกข้างซ้ายและข้างขวาเจริญไม่เท่ากัน ซึ่งแตกต่างจากที่พบในหอยนางรมสกุล *Saccostrea* และสกุล *Dendostrea* ที่มีการเจริญแบบ Orthogyrate คือบริเวณด้านหน้าและด้านหลังมีการเจริญเกือบเท่าๆกัน แต่ชนิด *Dendostrea folium* จะพบว่าความยาวยังคงมากกว่าความกว้างแม้ว่าการเจริญในระยะหลังก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับสกุล *Saccostrea* และ *Crassostrea* ที่ศึกษาในครั้งนี้

ระยะการพัฒนาตัวอ่อนของหอยตะโกรมกรามขาว *Crassostrea belcheri* ใช้เวลาประมาณ 15 วัน หอยนางรมกรามดำ *Crassostrea iredalei* ใช้เวลาประมาณ 19 วัน หอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata (=forskali)* ใช้เวลาประมาณ 21 วัน (Jarayabhand et al. 1994) และเป็นที่น่าสังเกตุว่าระยะที่ใช้ในการพัฒนานั้นมีผลแตกต่างจากสภาวะสิ่งแวดล้อมด้วยเช่นอุณหภูมิของน้ำทะเลและปริมาณแพลงก์ตอนที่ให้เป็นอาหารเป็นต้น ((Loosanoff และ Davis, 1963)

รูปร่างลักษณะและระยะพัฒนาการเจริญเติบโตของ *Dendostrea folium* ในระยะ Pediveliger larvae ที่บริเวณ umbo ที่บริเวณ umbo คล้ายกับสกุล *Saccostrea* คือเป็นแบบ Orthogyrate ซึ่งต่างจากสกุล *Crassostrea* ซึ่งเป็นแบบ Opisthogyrate สำหรับความแตกต่างระหว่างสกุล *Saccostrea* กับสกุล *Dendostrea* นั้น สังเกตได้จากสกุล *Dendostrea* จะมีฟันทางด้านหน้าและหลังอย่างละ 2 ซี่ ในขณะที่สกุล *Saccostrea* มี 3-4 ซี่ การเจริญเติบโตทางด้านความกว้างและความยาวในระยะ pedivelger larvae แตกต่างกัน จากการศึกษาในครั้งนี้ขนาดของไข่ (egg) และ D-shape larvae ในสกุล *Dendostrea* จะมีขนาดใหญ่กว่าในสกุล *Crassostrea* และ *Saccostrea*

สำหรับ *Crassostrea iredalei*, *Saccostrea cucullata* และ *Striostrea (Parastriostrea) mytiloides* อนุบาลได้แค่อายุ 8 วัน จึงไม่สามารถศึกษารายละเอียดในระยะ Pediveliger stage ได้

สรุป

1. หอยตะโกรมกรามขาว (*Crasssostrea belcheri*) มีการพัฒนาการเปลือกแบบ Opisthogyrate ในช่วงการเจริญเติบโต โดยเริ่มต้นจากระยะ D-shape อายุ 1 วัน ความยาวเฉลี่ย 69 ไมครอน ความกว้างเฉลี่ย 64 ไมครอน ลักษณะเปลือกทั่วไปจะเรียบ ด้านบน hinge เป็นแนวเส้นตรง ด้านล่างรูปทรงโค้งกลม และเปลือกสองข้างขนาดเท่ากัน เมื่อเข้าสู่ระยะ early umbo อายุประมาณ 5-10 วัน บริเวณตรงกลางด้านบนจะเริ่มนูนขึ้นบดบังบริเวณ Hinge และจะมีฟัน 2-3 อันอยู่ด้านหน้าและด้านหลัง เริ่มมีการเจริญเติบโตทางด้านความกว้างมากกว่าความยาว เมื่อเจริญเข้าสู่ระยะ late umbo บริเวณขอบบน umbone มีการพัฒนาเป็นปุ่มนูนมากขึ้นและเริ่มมีการเจริญเติบโตของฝาเปลือกสองข้างไม่เท่ากัน โดยเปลือกซ้ายด้านบนจะเจริญขยายเร็วกว่าและจะใหญ่กว่าเปลือกขวา ประกอบกับการเจริญขยายตัวด้านหน้า (anteroventral) มากกว่าด้านหลัง มีผลทำให้มีการบิดเฉียง (skew) ของ umbo ชี้ไปด้านหลัง (posterior) ขณะเดียวกันจะพบว่าความกว้างของเปลือกจะมากกว่าความยาวในระยะ pediveliger ที่ลูกหอยพร้อมที่ลงเกาะบนวัสดุ ความยาวเฉลี่ย 236 ไมครอน ความกว้างเฉลี่ย 271 ไมครอน ที่อายุประมาณ 15 วัน

2. หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea forskali*) มีการพัฒนาการเปลือกแบบ Orthogyrate ในช่วงการเจริญเติบโตโดยเริ่มต้นจากระยะ D-shape อายุ 2 วัน ความยาวเฉลี่ย 67.5 ไมครอน ความกว้างเฉลี่ย 56.1 ไมครอน

ลักษณะเปลือกทั่วไปจะเรียบ ด้านบน hinge เป็นแนวเส้นตรง ด้านล่างรูปทรงโค้งกลม เปลือกสองข้างขนาดเท่ากัน ลูกหอยเข้าสู่ระยะ early umbo ด้านบนบริเวณตรงกลางจะนูนขึ้นบดบังบริเวณ Hinge และจะมีฟัน 3-4 อันอยู่ด้านหน้าและด้านหลัง โดยเริ่มมี umbo นูนขึ้นจากเปลือกด้านบน 2 ข้างเท่าๆกัน เปลือกข้างซ้ายและขวาจะคล้ายคลึงกัน โดยจะมีการเจริญเติบโตทางด้านความกว้างมากกว่าความยาว ความยาวเฉลี่ย 134 ไมครอน ความกว้างเฉลี่ย 143 ไมครอน ในระยะ Pediveliger ส่วนด้านบนตรงกลางจะนูนขึ้นจากเปลือก 2 ข้างเท่าๆกัน เปลือกข้างซ้ายและขวาจะคล้ายคลึงกัน โดยเปลือกทั้งสองข้างไม่มีการม้วนตัวไปด้านหลังเหมือนในสกุล *Crassostrea* ที่ลูกหอยพร้อมที่ลงเกาะบนวัสดุ ความยาวเฉลี่ย 225 ไมครอน ความกว้างเฉลี่ย 228 ไมครอน ที่อายุประมาณ 22 วัน

3. หอยนางรมลอย (*Dendostrea folium*) มีการพัฒนาการเปลือกแบบ Orthogyrate ในช่วงการเจริญเติบโตโดยเริ่มต้นจากระยะ D-shape อายุ 1-2 วัน ความยาวเฉลี่ย 129-133 ไมครอน ความกว้างเฉลี่ย 118-120 ไมครอน ลักษณะเปลือกทั่วไปจะเรียบ ด้านบน hinge เป็นแนวเส้นตรง ด้านล่างรูปทรงโค้งกลม เปลือกสองข้างขนาดเท่ากัน ลูกหอยเข้าสู่ระยะ early umbo เมื่ออายุประมาณ 8 วัน โดยด้านบนบริเวณตรงกลางจะนูนขึ้นบดบังบริเวณ Hinge และจะมีฟัน 2-3 อันอยู่ด้านหน้าและด้านหลัง โดยเริ่มมี umbo นูนขึ้นจากเปลือกด้านบน 2 ข้างเท่าๆกัน เปลือกข้างซ้ายและขวาจะคล้ายคลึงกัน โดยจะมีการเจริญเติบโตทางด้านความยาวมากกว่าความกว้าง ความยาวเฉลี่ย 216 ไมครอน ความกว้างเฉลี่ย 197 ไมครอน ในระยะ late umbo ส่วนด้านบนตรงกลางจะนูนขึ้นจากเปลือก 2 ข้างเท่าๆกัน เปลือกข้างซ้ายและขวาจะคล้ายคลึงกัน โดยเปลือกทั้งสองข้างไม่มีการม้วนตัวไปด้านหลังเหมือนในสกุล *Crassostrea* ที่ลูกหอยพร้อมที่ลงเกาะบนวัสดุ ความยาวเฉลี่ย 257 ไมครอน ความกว้างเฉลี่ย 234 ไมครอน ที่อายุประมาณ 14 วัน

4. โดยอาศัย *Crassostrea belcheri* เป็นตัวแทนของสกุล *Crassostrea*, *Saccostrea forskali* เป็นตัวแทนของสกุล *Saccostrea* และ *Dendostrea folium* เป็นตัวแทนของสกุล *Dendostrea* เราสามารถจำแนกลูกหอยนางรมวัยอ่อนทั้งสามสกุลออกจากกันได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือกของลูกหอย แต่ยังไม่สามารถจำแนกลงไปได้ถึงระดับชนิดของแต่ละสกุลได้ เพราะจำเป็นต้องมีตัวอย่างลูกหอยวัยอ่อนทุกชนิดในสกุลนั้นๆครบทุกระยะการพัฒนาเจริญเติบโตถึงระยะลงเกาะเพื่อใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัดด้วย

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. Kurt W. Ockelmann, Helsingor Marine Biological Laboratory, Denmark ที่ช่วยชี้นำในการศึกษาลูกหอยนางรมวัยอ่อน Ms. Aileen Tan, Muka Head Marine Station , Universiti Sain Malaysia, Penang, Malaysia และคุณจินตนา นักระนาด ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์ ที่ให้คำแนะนำและแลกเปลี่ยนประสบการณ์เกี่ยวกับการพัฒนาของหอยนางรมวัยอ่อน

เอกสารอ้างอิง

Jarayabhand, P., S. Jaroentia, C. Srisaard and P. Menasveta, 1994. Experiments on Larviculture of Thai Oyster Species. Thai. J, Aqua. Sci. 1(1):43-53.

Loosanoff, V.L. and H.C. Davis. 1963. Rearing of bivalve molluscs. In Advance in Marine Biology. Vol. 1. Academic Press, London. Pp. 1-136.

Loosanoff, V.C., H.C. Davis and P.E. Chanley, 1966. Dimensions and shapes of larvae of some marine bivalve molluscs. Malacologia 4(2):351-435.

Ockelmann, K.W. 1994. Future work on the oyster fauna of Southeast Asia especially Thailand: Proposal of a project. Phuket mar. biol. Cent. Spec. Publ. 13:105-108.

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายต่ำ

ภาพวาดจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายต่ำ

D - shape

อายุ 2 วัน

อายุ 2 วัน

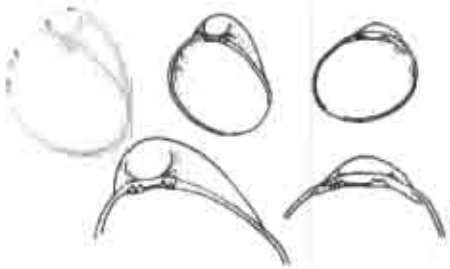
Early umbo larvae

อายุ 6 วัน

อายุ 6 วัน

Umbo larvae

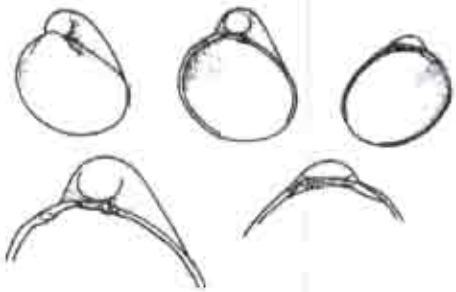
อายุ 13 วัน



อายุ 13 วัน

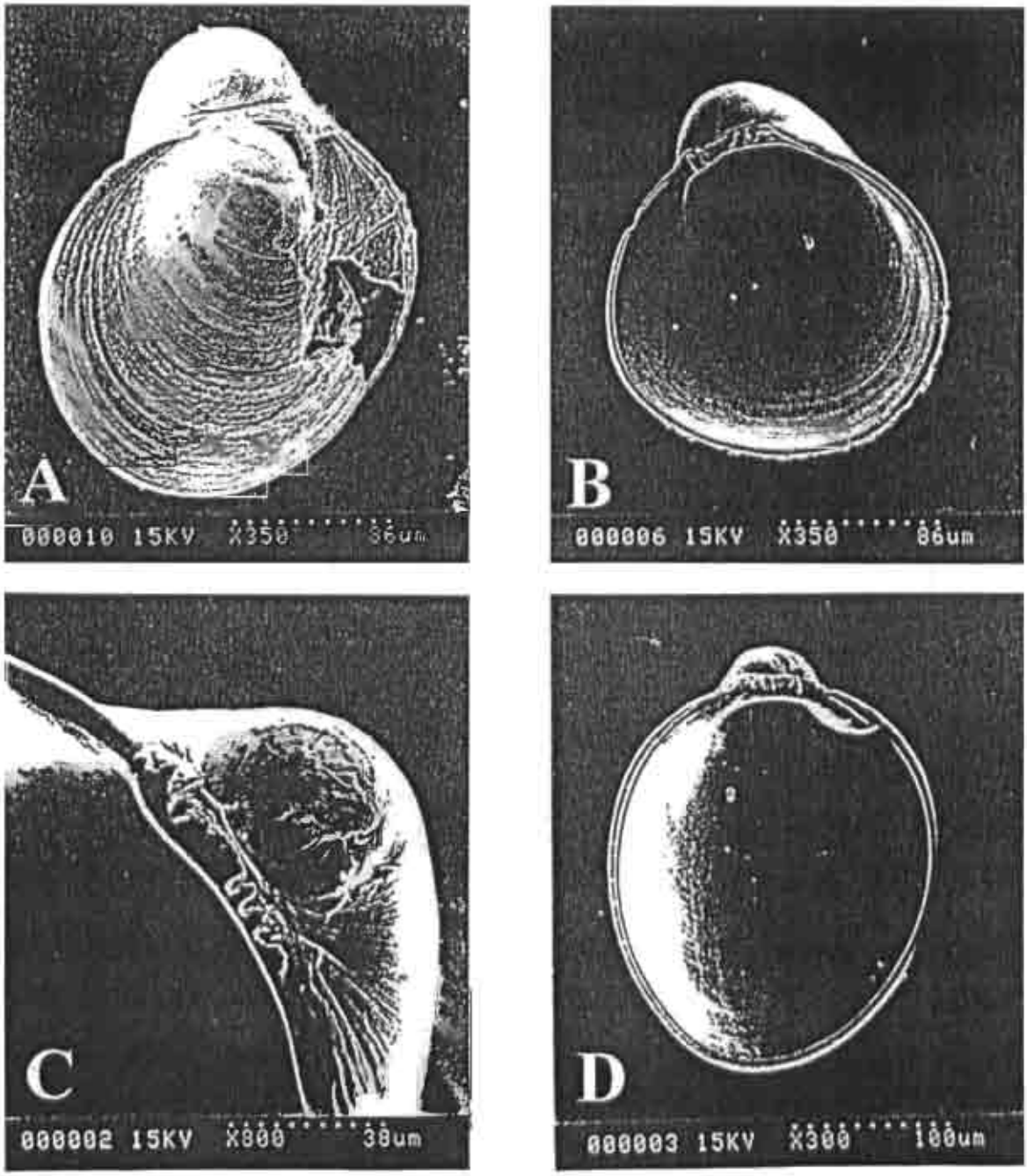
Late umbo larvae

อายุ 15 วัน



อายุ 15 วัน

ภาพที่ 1 ลักษณะลูกหอยตะโกรมกรามขาว *Crassostrea belcheri* อายุ 2, 6, 13 และ 15 วัน



ภาพที่ 2. ลักษณะลูกหอยตะโกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri*) ระยะ umbo (อายุ 13 วัน) จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)

A. ลูกหอยทั้งตัว
B. ฝาข้างซ้าย
C. ฟันที่บานพับ (hinge teeth)
D. ฝาข้างขวา

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายต่ำ

ภาพวาดจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายต่ำ

D - shape

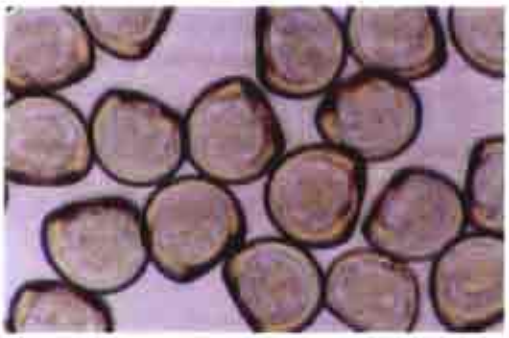
อายุ 2 วัน

อายุ 2 วัน

อายุ 4 วัน

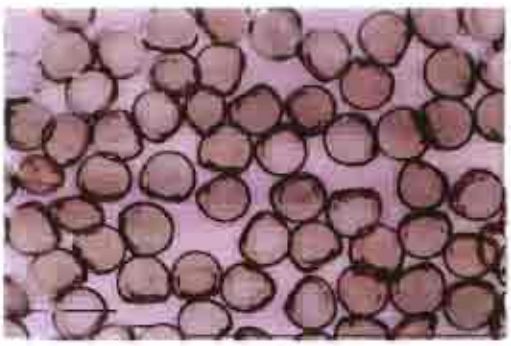
อายุ 4 วัน

Early umbo larvae

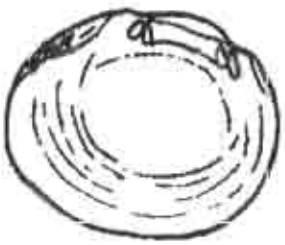


อายุ 6 วัน

อายุ 6 วัน



อายุ 8 วัน



อายุ 8 วัน

ภาพที่ 3. ลักษณะลูกหอยตะโกรมกรามดำ *Crassostrea iredalei* อายุ 2, 4, 6 และ 8 วัน

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายต่ำ

ภาพวาดจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายต่ำ

D – shape

อายุ 2 วัน

อายุ 2 วัน

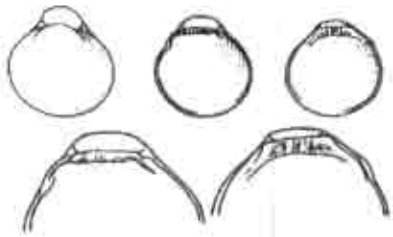
Early umbo larvae

อายุ 6 วัน

อายุ 6 วัน

Umbo larvae

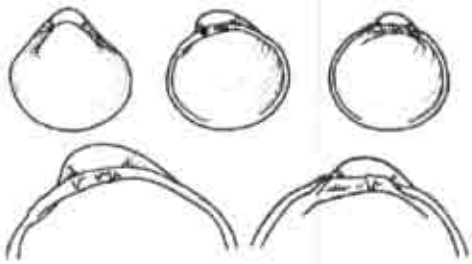
อายุ 10 วัน



อายุ 10 วัน

Pediveliger larvae

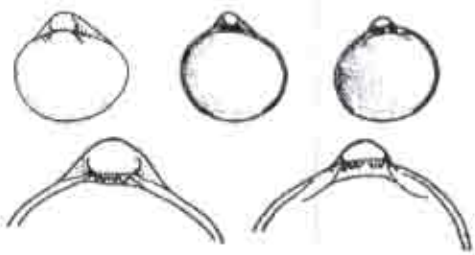
อายุ 15 วัน



อายุ 15 วัน

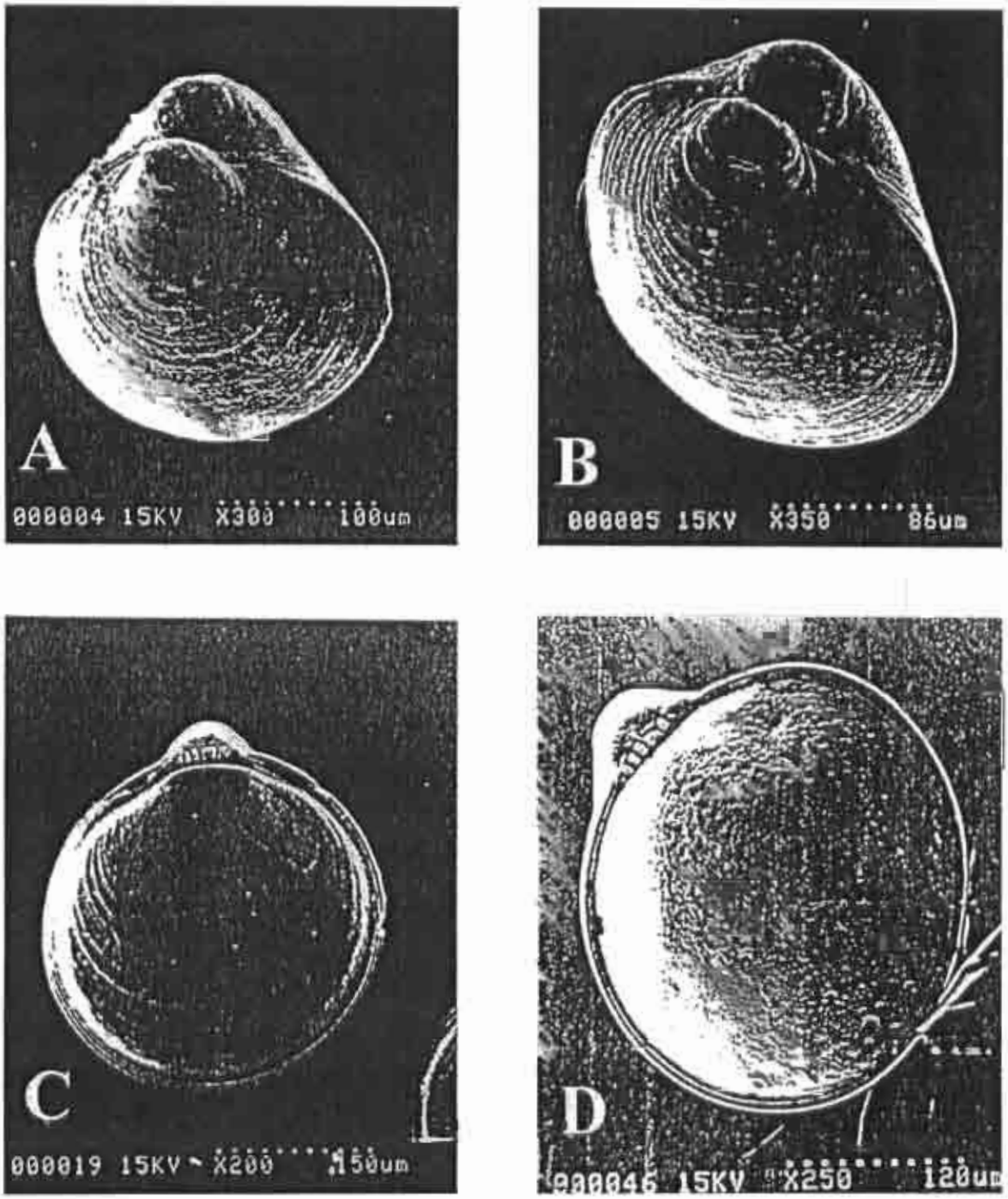
Plantigrade larvae

อายุ 22 วัน



อายุ 22 วัน

ภาพที่ 4. ลักษณะลูกหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea forskali* อายุ 2, 6, 10, 15 และ 22 วัน



ภาพที่ 5. ลักษณะลูกหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea forskali*) ระยะ early umbo (อายุ 22 วัน) จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)

A-B. ลูกหอยทั้งตัว C. ฝาข้างซ้าย D ฝาข้างขวา

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายต่ำ

ภาพวาดจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายต่ำ

D - shape

อายุ 2 วัน

อายุ 2 วัน

Early umbo larvae

อายุ 4 วัน

อายุ 4 วัน

Umbo larvae

อายุ 6 วัน

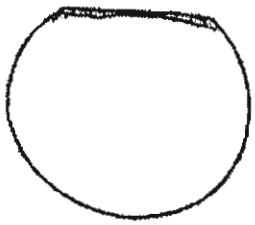
อายุ 6 วัน

Pediveliger larvae

อายุ 8 วัน

อายุ 8 วัน

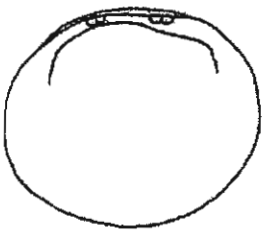
ภาพที่ 6. ลักษณะลูกหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* อายุ 2, 4, 6 และ 8 วัน



อายุ 1 วัน

อายุ 2 วัน

อายุ 4 วัน



อายุ 6 วัน

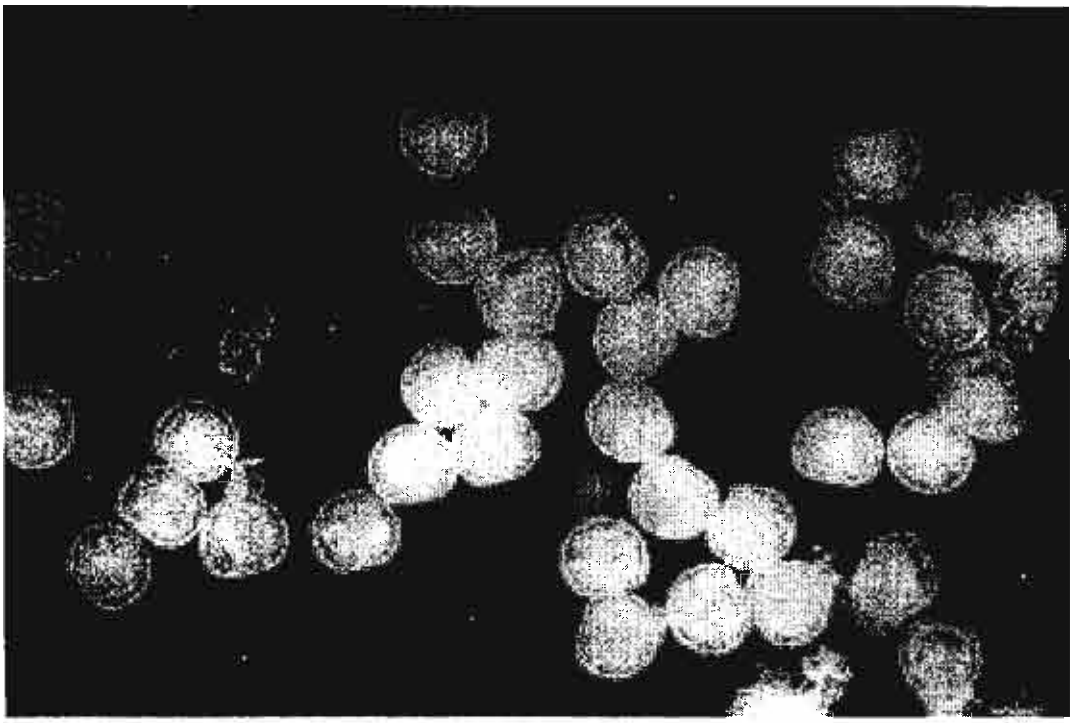
อายุ 8 วัน

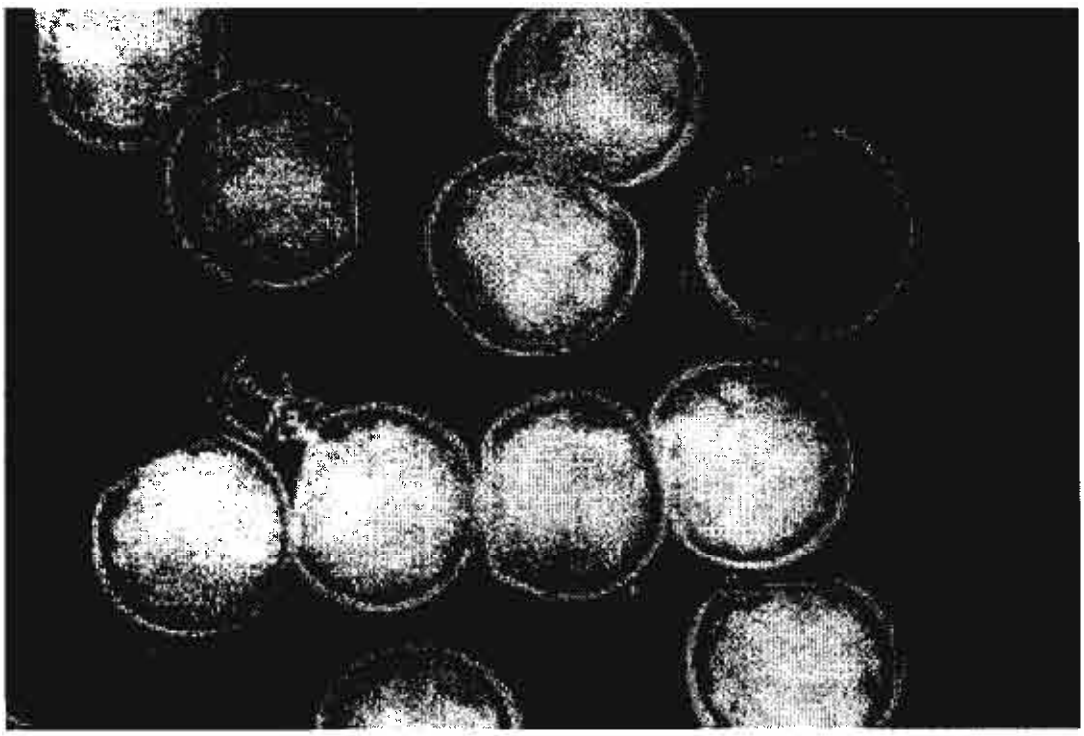
อายุ 10 วัน

อายุ 12 วัน

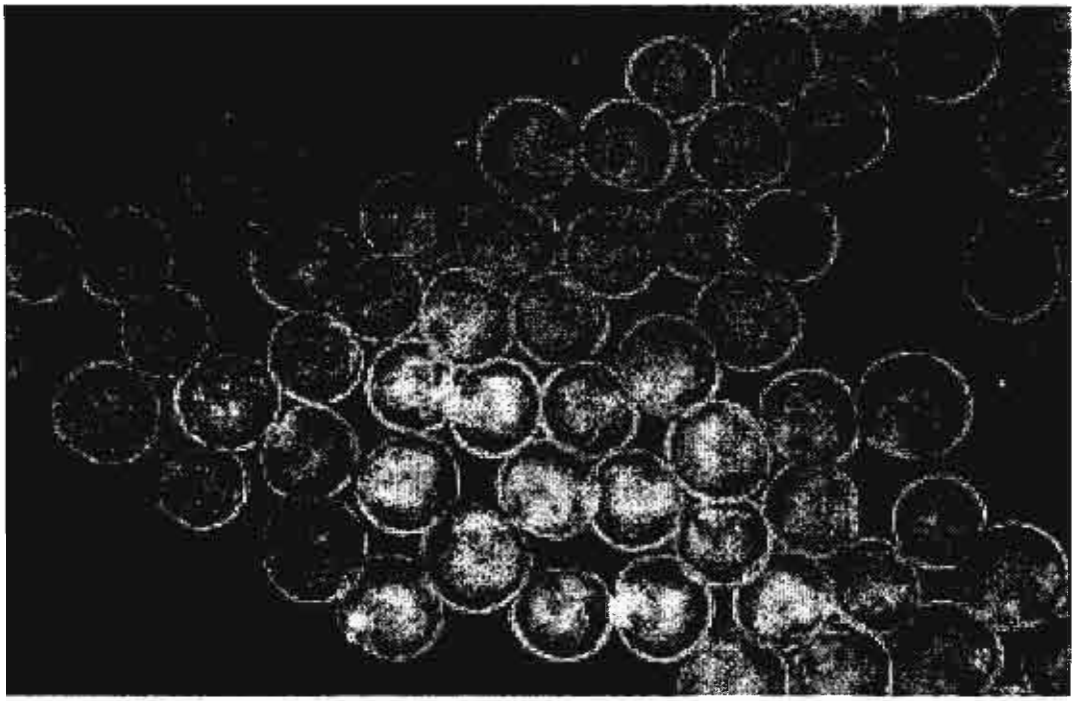
อายุ 14 วัน

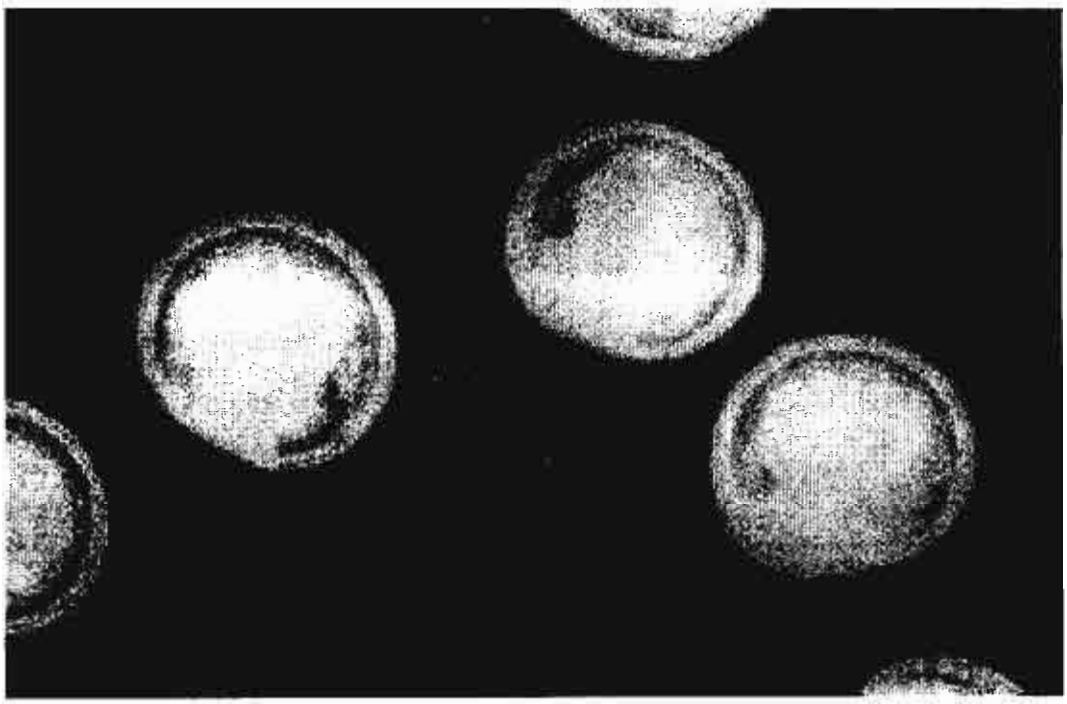
<u>ภาพที่ 7</u>. ลักษณะลูกหอยนางรม *Dendostrea folium* อายุ 1,2, 4, 6, 8, 10,12 และ 14 วัน (ภาพวาดจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ)



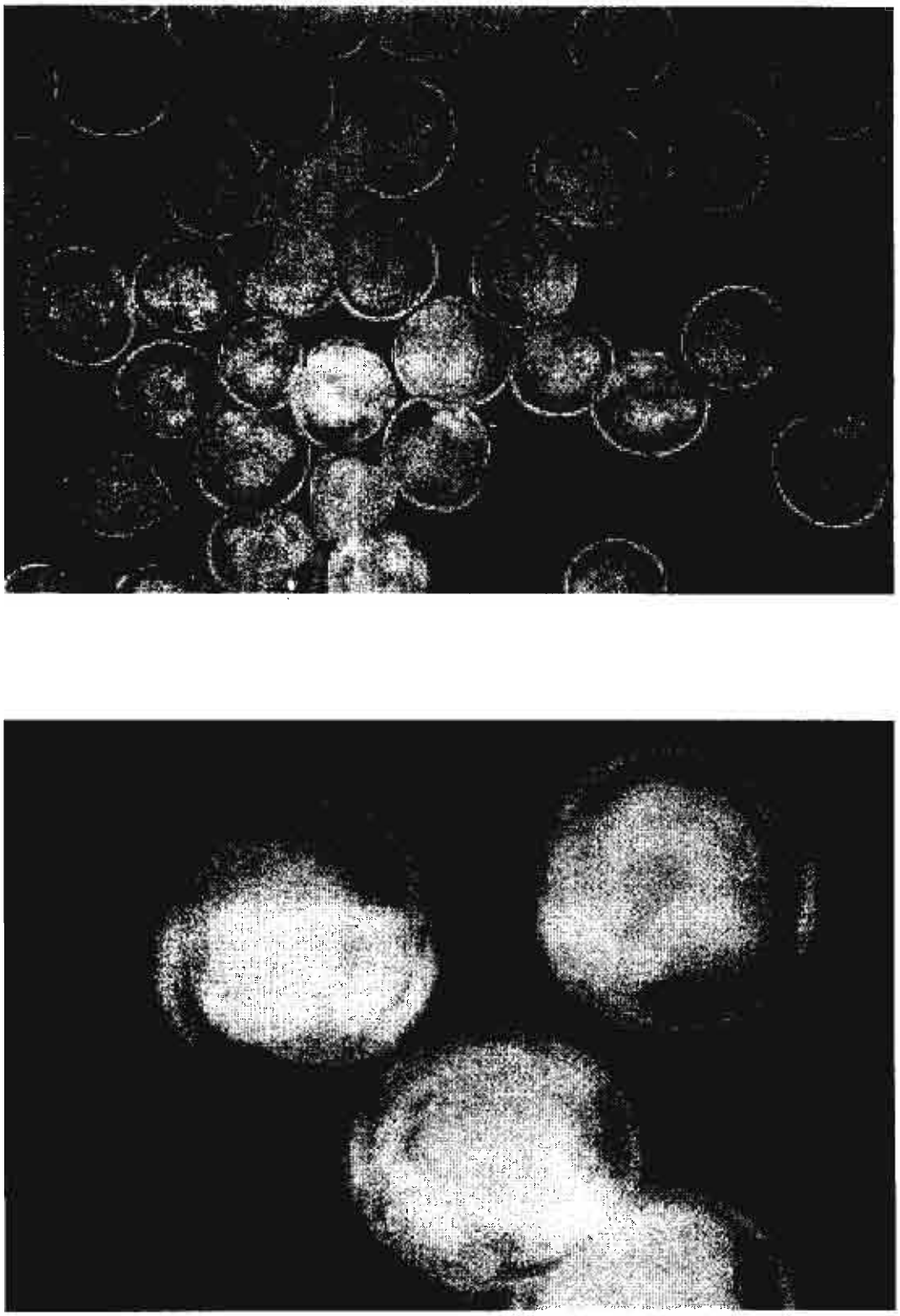


<u>ภาพที่ 8</u>. ลักษณะลูกหอยนางรม *Dendostrea folium* อายุ 1 วัน
(ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ)

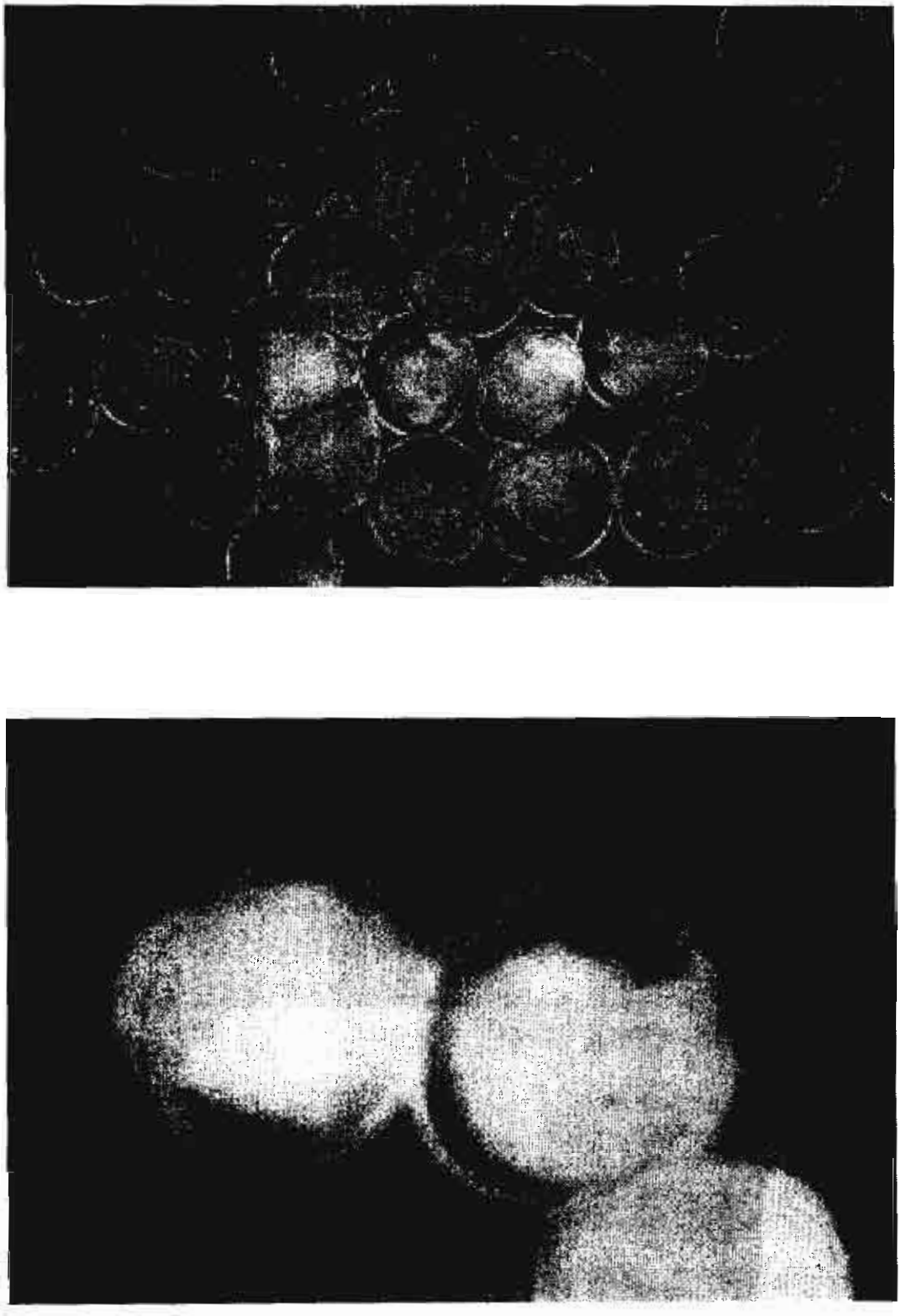




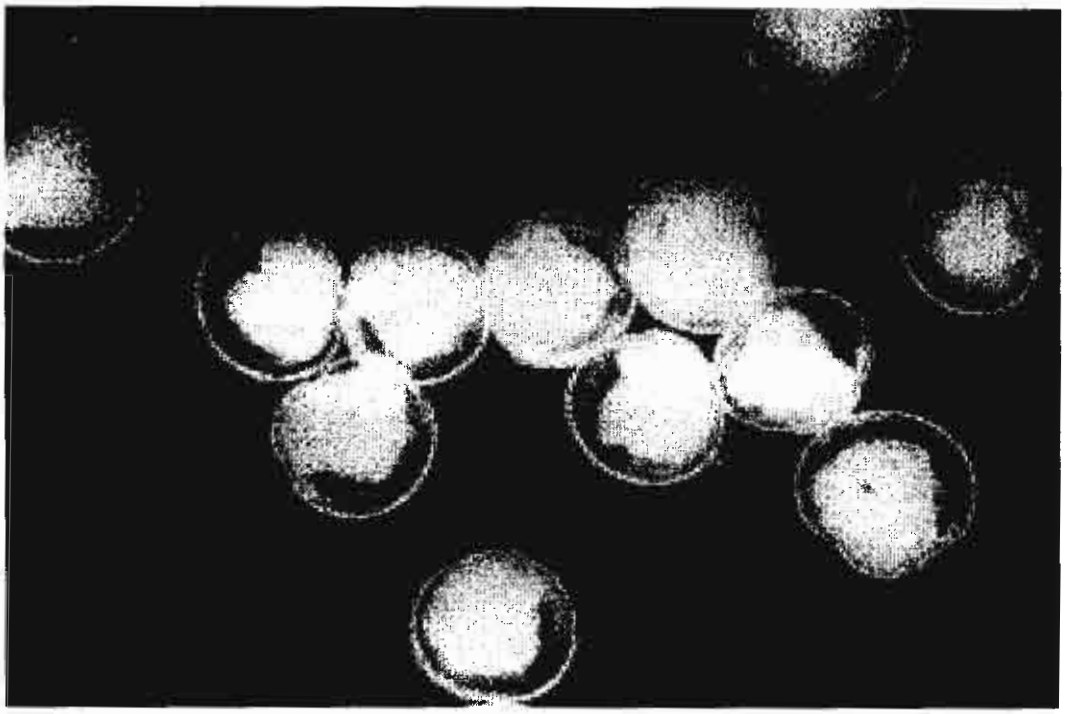
<u>ภาพที่ 9</u>. ลักษณะลูกหอยนางรม *Dendostrea folium* อายุ 4 วัน
(ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ)

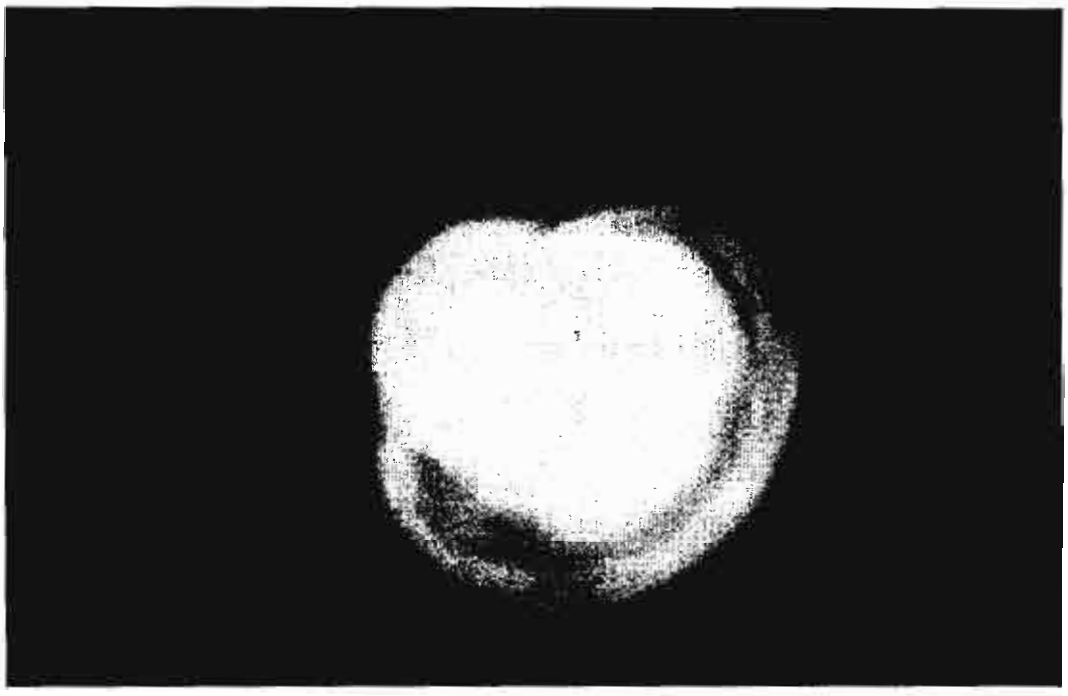


ภาพที่ 10. ลักษณะลูกหอยนางรม *Dendostrea folium* อายุ 8 วัน
(ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ)



ภาพที่ 11. ลักษณะลูกหอยนางรม *Dendostrea folium* อายุ 12 วัน
(ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ)





<u>ภาพที่ 12</u>. ลักษณะลูกหอยนางรม *Dendostrea folium* อายุ 14 วัน
(ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ)

การศึกษาอณูพันธุศาสตร์

โครงการอนุกรมวิธานของหอยนางรมที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ของไทย

(Taxonomy of Commercial Oysters in Thailand)

ผลงานวิจัย: การศึกษาอณูพันธุศาสตร์ (Molecular genetics)

ผู้รับผิดชอบ ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา

(อังกฤษ) Dr. Sirawut Klinbunga

ที่ทำงาน- หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท กรุงเทพ ฯ 10330

โทรศัพท์: 218-5279 โทรสาร: 254-7640

บทคัดย่อ

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะกับชนิดของหอยนางรม 5 ชนิดในประเทศไทยประกอบด้วย *Crassostrea belcheri* (Sowerby, 1871), *C. iredalei* (Faustino, 1932), *Saccostrea cucullata* (Born, 1778), *S. forskali* (Gmelin, 1791) and *S. mytiloides* (Lamarck, 1819) ด้วยเทคนิค RAPD พบแถบดีเอนเอจำนวนทั้งหมด 254 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 200 – 2500 คู่เบส ค่าเฉลี่ยของจำนวนแถบดีเอนเอต่อไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 12.4 – 32.2 แถบ โดยเปอร์เซ็นต์ polymorphic bands ในหอยสกุล *Crassostrea* มีค่าเท่ากับ 53.23% - 74.67% ซึ่งมีต่ำกว่าในหอยสกุล *Saccostrea* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 89.55% - 99.40%

นอกจากนี้ยังพบเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อหอยนางรมชนิด *C. belcheri, C. iredalei* และ *S. cucullata* จำนวน 10, 5 และ 2 แถบ ตามลำดับ จึงได้คัดเลือกแถบดีเอนเอที่จำเพาะต่อ *C. belcheri* จำนวน 3 แถบ มาทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแต่ละ recombinant clone (pPACB1, pPACB2 และ pPACB3) เพื่อนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอนเออย่างจำเพาะด้วยเทคนิค PCR และพบว่าผลิตผลของ PCR ที่ได้มีขนาด 536 คู่เบส 600 คู่เบส และ 506 คู่เบส ตามลำดับ โดยไพรเมอร์แต่ละคู่มีความไวต่อการตรวจสอบดีเอนเอของ *C. belcheri* ที่มีความเข้มข้นเพียง 30 พิโคกรัม

จากนั้นได้คัดเลือกไพรเมอร์ pPACB1-F/R มาตรวจสอบความจำเพาะกับตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 203 ตัวอย่าง ประกอบด้วยหอยนางรมทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้ หอยนางรมชนิด *S. commercialis* จากประเทศออสเตรเลีย และหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) จากผลการตรวจสอบพบว่าไพรเมอร์ pPACB-F/R ให้เครื่องหมายทางพันธุกรรมขนาด 536 คู่เบส ใน *C. belcheri* เท่านั้น ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่างจำนวนของจีโนไทป์ต่อไพรเมอร์และต่อจำนวนตัวอย่างใน *C. belcheri, C. iredalei, S. cucullata,S. forskali* และ *S. mytiloides* มีค่า 0.58 0.90 0.98 1.00 และ 1.00 ตามลำดับ โดยค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ geographic samples มีค่าระหว่าง 0.105 - 0.811 แผนภูมิ neighbor-joining แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ชัดเจนระหว่างหอยสกุล *Crassostrea* และ *Saccostrea* โดยภายในหอยสกุล *Saccostrea* นั้น พบว่า *S. forskali* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับ *S. mytiloides* มาก

เมื่อทำการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างหอยนางรมในประเทศไทย ด้วยวิธี PCR-RFLP ของยีน 16S ribosomal (r) DNA ด้วย *Acs* I, *Alu* I, *Dde* I, *Dra* I, *Taq* I และ *Rsa* I, 18S rDNA ด้วย *Hin* fI และ cytochrome oxidase subunits I (COI) ด้วย *Acs* I, *Dde* I

และ *Mbo* I พบจำนวน composite haplotypes ทั้งสิ้น 54 haplotypes โดย composite haplotypes I, II และ III พบเฉพาะในหอยนางรมชนิด *C. belcheri* ส่วน composite haplotypes IV, V และ VI พบเฉพาะใน *C. iredalei* และ composite haplotypes VII – XI พบใน *S. cucullata* เท่านั้น ค่าเฉลี่ยของ haplotype diversity มีระหว่าง 0.1857 – 0.9044 ในขณะที่ค่าเฉลี่ย nucleotide diversity ภายในชนิด (สปีชีส์) ของหอยนางรมมีค่าเท่ากับ 0.0912% และ 3.2388% แสดงว่าหอยนางรมในประเทศไทย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลจากวิธี RAPD

จากการศึกษาครั้งนี้พบหอยนางรมจำนวน 4 กลุ่ม ประกอบด้วย *Crassostrea* sp. (CsKB), *Saccostrea* sp. group 1 (S1SR), *Saccostrea* sp. group 2 (S2RN) and *Saccostrea* sp. group 3 (S3SS) ซึ่งไม่สามารถจำแนกชนิดอย่างแน่ชัดโดยสัณฐานวิทยา อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทางพันธุกรรมด้วยวิธี RAPD และ PCR-RFLP บ่งชี้ว่า *Crassostrea* sp. จากกระบี่ และ *Saccostrea* sp. group 2 จากระนองเป็นหอยนางรมชนิดใหม่ที่ยังไม่ทราบว่าเป็นชนิดใด จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและด้านพันธุศาสตร์เพื่อระบุชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง ส่วน *Saccostrea* sp. group 1 จากสุราษฎร์ธานีนั้นควรจัดเป็น *S. forskali* ในขณะที่ *Saccostrea* sp. group 3 จากสมุทรสาคร ยังไม่สามารถสรุปอย่างแน่ชัดว่าเป็นหอยนางรมชนิดใด เนื่องจากผลของ phylogenetic tree จากวิธี RAPD ระบุว่าเป็น *S. mytiloides* แต่ผลจาก PCR-RFLP แสดงว่าตัวอย่างกลุ่มนี้มี mtDNA จีโนไทป์ที่พบทั้งใน *S. forskali* และ *S. mytiloides*

ABSTRACT

Genetic diversity and species-diagnostic markers of five oysters in Thailand; *Crassostrea belcheri* (Sowerby, 1871), *C. iredalei* (Faustino, 1932), *Saccostrea cucullata* (Born, 1778), *S. forskali* (Gmelin, 1791) and *S. mytiloides* (Lamarck, 1819), were investigated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Two hundred and fifty-four reproducible and polymorphic fragments (200 - 2500 bp in length) were generated across the five investigated species. The average number of bands per primer varied between 12.4 to 32.2. The percentage of polymorphic bands within *Crassostrea* (53.23% - 74.67%) was lower than that of *Saccostrea* oysters (89.55% - 99.40%).

Ten, five and two species-specific markers were found in *C. belcheri, C. iredalei*, and *S. cucullata*, respectively. Three *C. belcheri*-specific RAPD fragments were cloned and sequenced. A pair of primer set was designed from each recombinant clone (pPACB1, pPACB2 and pPACB3). The PCR products showed expected product sizes of 536 bp, 600 bp and 506 bp, respectively, with the sensitivity of detection reached approximately 30 pg of *C. belcheri* total DNA template. Specificity of pPACB1 was examined against indigenous oyster species in Thailand, and outgroup references; *S. commercialis* and *Perna viridis* (N = 203). Results indicated species-specific nature of primers developed from pPACB1. This primer set can be used for broodstock selection and determination of *C. belcheri* larvae to assist selective breeding programme in this commercially important species.

The mean of a ratio between the number of genotypes generated by each primer and the number of investigated specimens of *C. belcheri* (0.58) was lower than that of the remaining species (0.90 - 1.00). Genetic distances between pairs of oyster samples were between 0.105 - 0.811. A neighbor-joining tree indicated distant relationships between *Crassostrea* and *Saccostrea* oysters. Within the latter genus, genetically close relationships were observed between *S. forskali* and *S. mytiloides*

Genetic diversity of the same sample set of oysters was also examined using PCR-RFLP of 16S ribosomal (r) DNA with *Acs* I, *Alu* I, *Dde* I, *Dra* I, *Taq* I and *Rsa* I, 18S rDNA with *Hin* fI and cytochrome oxidase subunit I (COI) with *Acs* I, *Dde* I and *Mbo* I. A total of fifty-four mtDNA composite haplotypes were identified. Composite haplotypes I, II and III was specifically found in *C. belcheri* whereas composite haplotypes IV, V and VI was only found in *C. iredalei*. Five composite haplotypes (VII – XI) were specifically observed in *S. cucullata*. These composite haplotypes can be used to differentiate commercially cultured oyster species unambiguously. Haplotype and nucleotide diversity within each oyster species in this study was 0.1857 – 0.9044 and 0.0912% – 3.2388%, respectively. These indicated high genetic diversity of oysters in Thai waters.

Four groups of oysters could not be differentiated based on morphological characters. They were *Crassostrea* sp. (CsKB), *Saccostrea* sp. group 1 (S1SR), *Saccostrea* sp. group 2 (S2RN) and *Saccostrea* sp. group 3 (S3SS). Molecular markers developed from RAPD and PCR-RFLP of the present study revealed the existence of genetically unidentified new species including *Crassostrea* sp. from Krabi and *Saccostrea* sp. group 2 from Ranong. Accordingly, scientific names of these oysters should be further clarified by taxonomists using both morphological and molecular data. The *Saccostrea* sp. group 1 from Surat Thani should be genetically regarded as *S. forskali*. Nevertheless, the species status of *Saccostrea* sp. group 3 from Samut Sakhon could not be concluded because they showed phylogenetically closed relationships with *S. mytiloides* when analysed with RAPD but their mtDNA genotypes were commonly found in both *S. forskali* and *S. mytiloides*.

สารบัญเนื้อหา

	หน้า
บทคัดย่อ	i
ENGLISH ABSTRACT	iii
สารบัญเนื้อหา	v
สารบัญตาราง	vi
สารบัญภาพ	viii
คำอธิบายคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	xi
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	5
ผลการทดลอง	13
วิจารณ์ผลการทดลอง	97
สรุปและข้อเสนอแนะ	108
เอกสารอ้างอิง	109
ภาคผนวก 1	114
ภาคผนวก 2	120
ภาคผนวก 3	124

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1.1 แสดงผลผลิตและมูลค่าของหอยนางรมในประเทศไทยระหว่าง ปี 2529-2539 2

ตาราง 2.1 แสดงสถานที่เก็บ และจำนวนตัวอย่างของหอยนางรมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 5

ตาราง 2.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง 11

ตาราง 2.3 Restriction enzymes ที่ใช้ในการทดลอง 12

ตาราง 3.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ RAPD primers ขนาดและจำนวนของ RAPD bands และ เปอร์เซนต์ polymorphic bands ของหอยนางรมในประเทศไทยที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย RAPD-PCR 15

ตาราง 3.2 แสดงจำนวน bands ทั้งหมด และเปอร์เซนต์ของ polymorphic และ monomorphic bands ภายในหอยนางรมแต่ละชนิด และหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA09, OPB01, OPB08, UBC210 and UBC220 16

ตาราง 3.3 แสดงค่า similarity indices (S) ภายในแต่ละกลุ่มของประชากรของหอยนางรม และหอยแมลงภู่ *P. viridis* โดยใช้ RAPD primers 37

ตาราง 3.4 แสดงค่า genetic distances (ข้างใต้เส้นทแยงมุม) และค่า similarity indices (S_{ij}, เหนือเส้นทแยงมุม) ระหว่างและภายในกลุ่มประชากรของหอยนางรมในประเทศไทย และหอยนางรม *S. commercialis* จากประเทศออสเตรเลีย และหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) 38

ตาราง 3.5 เครื่องหมายทางพันธุกรรม RAPD ที่จำเพาะต่อสปีชีส์ของหอยนางรมที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ของไทย ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD-PCR 42

ตาราง 3.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. belcheri*-specific primers ที่ออกแบบมาจากแต่ละ recombinant clone 45

ตาราง 3.7 แสดงขนาดของชิ้น DNA ที่ได้จากการย่อยด้วย restriction enzymes ชนิดต่างๆ 61

ตาราง 3.8 Single haplotypes ที่พบจาก restriction analysis ของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา 66

ตาราง 3.9 Molecular taxonomic key สำหรับหอยนางรมที่มีความสำคัญเชิงพานิชย์ในประเทศไทย 82

ตาราง 3.10 จำนวน Composite haplotypes ที่พบจาก restriction analysis ของ 16S and 18S rDNAs และ COI ของหอยนางรมในประเทศไทย, the Australian oyster (*S. commercialis*) และหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) 83

ตาราง 3.11 ความถี่ของ Composite haplotypes ที่พบจาก restriction analysis ของ 16S and 18S rDNAs และ COI ของหอยนางรมในประเทศไทย the Australian oyster (*S. commercialis*) และหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) 88

ตาราง 3.12 Haplotype diversity และ nucleotide diversityภายในชนิดของหอยนางรมในประเทศไทยและสปีชีส์อ้างอิง (*S. commercialis* และ *P. viridis*) 94

ตาราง 3.13 ค่า Nuicleotide divergence ระหว่างชนิดของตัวอย่างหอยนางรมและหอยแมลงภู่ที่ใช้ในการทดลอง 95

สารบัญภาพ

หน้า

รูป 2.1 แสดงแหล่งตัวอย่างของหอยนางรมในประเทศไทยที่ใช้ในการทดลอง 7

รูป 3.1 Total DNA ที่สกัดจากส่วนของ adductor muscle ของหอยนางรมซึ่งนำมาแยกผ่านกระแสไฟฟ้าบน 0.8% agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide 14

รูป 3.2 RAPD patterns ของ *C. belcheri* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPA09 18

รูป 3.3 RAPD patterns ของ *C. iredalei* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPA09 19

รูป 3.4 RAPD patterns ของ *S. cucullata* และ *S. forskali* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPA09 20

รูป 3.5 RAPD patterns ที่ได้จากไพรเมอร์ OPA09 21

รูป 3.6 RAPD patterns ของ *C. belcheri* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB01 22

รูป 3.7 RAPD patterns ของ *C. iredalei* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB01 23

รูป 3.8 RAPD patterns ของ *S. forskali* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB01 24

รูป 3.9 RAPD patterns ของ *C. belcheri* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB01 25

รูป 3.10 RAPD patterns ของ *C. iredalei* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB08 26

รูป 3.11 RAPD patterns ของ *S. cucullata* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB08 27

รูป 3.12 RAPD patterns ของ *C. iredalei* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC210 28

รูป 3.13 RAPD patterns ของ *S. cucullata* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC210 29

รูป 3.14 RAPD patterns ของ *S. forskali* และ *S. mytiloides* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC210 30

หน้า

รูป 3.15 RAPD patterns ของ *S. commercialis* และ *P. viridis* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC210 31

รูป 3.16 RAPD patterns ของ *C. belcheri* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC220 32

รูป 3.17 RAPD patterns ของ *S. cucullata* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC220 33

รูป 3.18 RAPD patterns ของ *Crassostrea* sp. และ *Saccostrea* sp. group 2 ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC220 34

รูป 3.19 RAPD patterns ของ *S. commercialis* และ *P. viridis* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC220 35

รูป 3.20 แผนภูมิ Neighbor-joining tree สร้างจากค่าเฉลี่ยของ genetic distance ระหว่างกลุ่มประชากรในแต่ละสปีชีส์ ที่ได้จาก 5 ไพรเมอร์ 40

รูป3.21 แสดงการตรวจสอบชิ้น DNA inserts ของ 3 recombinant clones (pPACB1, pPACB2 และ pPACB3) บน 1.0% agarose gel electrophoresis 43

รูป 3.22 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA insert ของ pPACB1 (A) pPACB2 (B) และ pPACB3 (C) 44

รูป 3.23 แสดงการทดสอบ sensitivity ของไพรเมอร์ pPACB1-F/R, pPACB2-F/R และ pPACB3-F/R โดยการแปรเปลี่ยน ความเข้มข้น DNA ของ *C. belcheri* 46

รูป 3.24 แสดงการตรวจความจำเพาะแต่ละคู่ของไพรเมอร์ pPACB1-F/R ต่อ *C. belcheri* ที่มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 536 bp 47

รูปที่ 3.25 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 16S rDNA ด้วย *Acs* I 49

รูปที่ 3.26 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 16S rDNA ด้วย *Alu* I 50

รูปที่ 3.27 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 16S ด้วย *Dde* I 51

หน้า

รูปที่ 3.28 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 16S rDNA ด้วย *Dra* I 52

รูปที่ 3.29 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 16S rDNA ด้วย *Taq* I 53

รูปที่ 3.30 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 16S ด้วย *Rsa* I 54

รูปที่ 3.31 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 18S rDNA ด้วย *Hin* fI 55

รูปที่ 3.32 แสดง restriction pattern ที่ได้ จากการย่อย COI ด้วย *Acs* I 56

รูปที่ 3.33 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย COI ของ ด้วย *Dde* I 57

รูปที่ 3.34 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย COI ด้วย *Mbo* I 58

รูป 3.35 แผนภูมิ Neighbor-joining tree สร้างจากค่าเฉลี่ยของ genetic distance ระหว่างcomposite haplotypes ที่พบในการทดลองนี้ 93

รูป 3.36 แผนภูมิ Neighbor-joining tree สร้างจากค่า percentage of nucleotide divergence ระหว่างหอยสปีชีส์ต่างๆในการทดลองนี้ 96

สารบัญคำย่อ

bp	Base pair
°C	Degree Celsius
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphate
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
µg	microgramme
µl	microlitre
µM	micromolar
ml	millilitre
mM	millimolar
ng	nanogramme
PCR	polymerase chain reaction
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Taq polymerase	*Thermus aquaticus* DNA polymerase
Tris	Tris(hydroxy methyl)aminomethane
U	Unit
UV	Ultraviolet
V	Volt

บทนำ

หอยนางรมเป็นสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลังประเภทหอยสองฝา มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์เนื่องจากเป็นอาหารชั้นดีที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงเป็นที่นิยมบริโภคโดยทั่วไป นอกจากนี้เปลือกหอยนางรมก็ยังสามารถนำมาใช้เป็นปูนขาวหรือทำเป็นอาหารเสริมสำหรับการเลี้ยงเป็ดและไก่ รวมทั้งนำมาใช้ในการก่อสร้างได้อีกด้วย เมื่อหอยนางรมพ้นสภาพวัยอ่อน ฝาด้านล่างจะเกาะติดอยู่กับวัตถุที่แข็งแน่น ได้แก่ ก้อนหิน หลักไม้ เสาซากโป๊ะหรือโรงเรือน ตลอดจนรากไม้แสมและโกงกางที่จมอยู่ใต้น้ำ ฝาหอยด้านบนค่อนข้างแบนราบ ฝาทั้งสองเชื่อมประสานกันด้วยบานพับ ผิวภายนอกของเปลือกมีสภาพคล้ายเกล็ดเรียงซ้อนกัน ปรากฏเป็นวงริ้ว และรอยนูนเว้าคล้ายลูกฟูก (กองวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2530)

หอยนางรมอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำกร่อยและน้ำเค็ม มีชุกชุมในบริเวณแนวระดับน้ำต่ำสุดถึงสูงสุด หรือบริเวณที่ตื้นตามปากแม่น้ำและลำคลอง ตามชายเกาะหรือฝั่งทะเลที่มีกระแสน้ำหมุนเวียนถ่ายเทดี มีน้ำขึ้นและน้ำลงอยู่เป็นประจำ จากรายงานการศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยพบว่าหอยนางรมที่พบในน่านน้ำไทยมีประมาณ 15 ชนิด (Yoosukh, 2000) แต่ที่นำมาเลี้ยงในเชิงพาณิชย์มี 3 ชนิดได้แก่ หอยนางรมพันธุ์เล็กหรือหอยนางรมปากจีบ ส่วนใหญ่เป็นหอยนางรมสกุล *Saccostrea* กับหอยนางรมพันธุ์ใหญ่หรือหอยตะโกรม ซึ่งมี 2 ชนิดคือ หอยตะโกรมกรามขาว (*Crassostre belcheri* Sowerby,1871) และหอยตะโกรมกรามดำ (*C. iredali* Faustino, 1932)

ผลผลิตหอยนางรมในประเทศไทยระหว่างปี 2529 ถึง 2539 มีผลผลิตอยู่ระหว่าง 580 ตัน ถึง 23,420 ตัน (ตาราง 1.1) อย่างไรก็ตามผลผลิตหอยนางรมได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 3,774 ตันในปี 2535 ไปเป็น 17,810 ตัน ในปี 2536 และเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอไปจนถึง 23,420 ตัน ในปี 2539 ส่วนมูลค่าผลผลิตของหอยนางรมในปี 2535 ถึงปี 2539 ได้เพิ่มขึ้นจาก 54 ล้านบาทไปเป็น 655 ล้านบาท (Department of Fisheries, 1999a)

พื้นที่การเพาะเลี้ยงหอยนางรมทั่วประเทศในปี 2539 มีประมาณ 8,127 ไร่ โดย จ. สุราษฎร์ธานี เป็นจังหวัดที่มีพื้นที่การเพาะเลี้ยงมากที่สุดถึงประมาณ 4,040 ไร่ คิดเป็น 49.7% ของพื้นที่ทั้งหมด รองลงมาคือ จ. ชลบุรี มีจำนวน 1,697 ไร่ คิดเป็น 20.9% และ จ. จันทบุรี มีจำนวน 1,230 ไร่ คิดเป็น 15.1% ของพื้นที่ทั้งหมด (Department of Fisheries, 1999b)

งานวิจัยเกี่ยวกับหอยนางรมในประเทศไทยมักจะเน้นในเรื่องเทคนิคการเลี้ยงและการผลิต ส่วนการศึกษาด้านอนุกรมวิธานมีอยู่น้อยมาก ทำให้ขาดข้อมูลที่จะนำมาอ้างอิงในการจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ของหอยนางรมชนิดที่นำมาศึกษาและวิจัยในงานด้านต่างๆ โดยทั่วไปแล้วหอยนางรมมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แปรผันตามสภาพแวดล้อมของแหล่งกำเนิดและวัตถุที่หอยเกาะ

ตาราง 1.1 แสดงผลผลิตและมูลค่าของหอยนางรมในประเทศไทยระหว่าง ปี 2529-2539

ปี	ผลผลิต (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
2529	580	10.997
2530	1,483	17.486
2531	1,858	25.434
2532	1,399	23.466
2533	1,370	24.755
2534	3,311	49.291
2535	3,774	54.053
2536	17,810	576.383
2537	19,273	522.623
2538	23,037	591.983
2539	23,420	655.512

ที่มา : Fisheries Statistics and Information Technology Sub-Division, Department of Fisheries, 1999a

ดังนั้นหอยนางรมชนิดเดียวกันอาจมีรูปร่างที่แตกต่างกันเนื่องจากสภาพพื้นที่ที่อาศัย (ecological variation) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความสับสนในการจำแนกชนิด เช่น หอยนางรมพันธุ์เล็กซึ่งมีการแพร่กระจายอยู่ในหลายท้องที่ทั้งในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน เมื่อดูจากลักษณะสัณฐานวิทยาแล้วยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นชนิดเดียวกันทั้งหมดหรือไม่ นับเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงครบวงจร (closed culturing system) นอกจากนี้การเรียกชื่อวิทยาศาสตร์ของหอยนางรมพันธุ์เล็กที่ต่างกันยังไม่สามารถตกลงกันได้ ตัวอย่างเช่น หอยนางรมปากจีบที่เลี้ยงกันที่ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี มีชื่อวิทยาศาสตร์ที่เรียกต่างๆกันไป บางรายงานใช้ *Crassostrea commercialis* (ชุติมา ตันติกิตติ , 2525) ขณะที่บางรายงานใช้ *Saccostrea commercialis* (กรมประมง , 2536) หรือ *S. cucullata* (วันทนา อยู่สุข , 2531) และ *S. forskalli* (สมชัย บุศราวิช, 2539) เป็นต้น ซึ่งในกรณีนี้ยังไม่สามารถหาคำตอบที่แน่ชัดโดยมีข้อมูลที่สามารถอ้างอิงได้ว่า หอยนางรมปากจีบที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ต่างกันเป็นชนิดเดียวกันหรือคนละชนิด มีความแตกต่างกันอย่างไร มีชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องอย่างไร

จากการที่ข้อมูลเกี่ยวกับอนุกรมวิธานของหอยนางรมของไทยมีอยู่อย่างจำกัดทำให้การจำแนกชนิด และการใช้ชื่อวิทยาศาสตร์สับสน เป็นที่ทราบกันดีว่าชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name) มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อนักชีววิทยา เพราะจะเป็นชื่อที่บ่งบอกได้อย่างแน่นอนว่าสิ่งมีชีวิตที่กล่าวถึงหรือนำมาศึกษานั้นเป็นชนิดใดหากชื่อวิทยาศาสตร์ที่กล่าวถึงไม่ถูกต้องจะทำให้การสื่อความหมายผิดพลาด อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างเดียวนั้นไม่เพียงพอ เนื่องจากลักษณะดังกล่าวอาจผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมได้ จึงมีความจำเป็นที่จะหาวิธีศึกษาความแตกต่างด้านอื่นด้วย เช่น เครื่องหมายพันธุกรรมในระดับโมเลกุล

เครื่องหมายพันธุกรรมในระดับโมเลกุล สามารถใช้ในการศึกษาหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ในหอยนางรมได้มีการใช้เทคนิค Allozyme electrophoresis ศึกษาความแปรผันของโปรตีนในหอยนางรมชนิดต่างๆ (Buroker et al., 1979) เทคนิคนี้มีข้อดีคือ ราคาถูก และทำได้รวดเร็วเมื่อเทียบกับเทคนิคการศึกษาทางพันธุกรรมอื่น ๆ แต่เนื่องจากเทคนิค Allozyme electrophoresis จะสามารถศึกษาความเปลี่ยนแปลงได้เฉพาะส่วนของยีน ซึ่งเป็นสัดส่วนน้อยมากเมื่อเทียบกับจีโนมทั้งหมด ทำให้ไม่สามารถตรวจความหลากหลายในส่วนที่ไม่ใช่ยีน

ในปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้ในระดับดีเอ็นเอทั้งในส่วน nuclear DNA และ mitochondrial (mt)DNA สามารถใช้ตรวจความแปรผันทางพันธุกรรมได้อย่างละเอียดและมีประสิทธิภาพมาก โดยในกลุ่มหอยนางรมมีการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของหอยนางรมชนิด *C. virginica* (Reeb and Avise, 1990) และ *C. gigas* (Boom et al., 1994) โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ความแตกต่างของ mitochondrial genome ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphisms หรือ RFLP) ต่อมาได้มีการนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) มาใช้ในงานทางด้านอณูพันธุศาสตร์ เทคนิค PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ในช่วงเวลาสั้น ๆ อย่างจำเพาะโดยมีดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ และมีโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ และใช้ดีออกซีนิวคลีโอไทด์เป็นสับสเตรทสร้างสายนิวคลีโอไทด์โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว และใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการวิเคราะห์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงได้มีการนำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้กับงานด้านพันธุศาสตร์อย่างกว้างขวาง

ในปี ค.ศ. 1990 ได้มีการพัฒนาเทคนิค Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Williams et al., 1990; Welsh และ McClelland, 1990) ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยไพรเมอร์สายสั้น ๆ ที่มีความยาวประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ และมีลำดับเบสแบบไม่จำเพาะ (arbitrary primers) ซึ่งพบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD สามารถให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้ (polymorphic bands) สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมี

ชีวิตได้ ซึ่งเทคนิค RAPD นี้ ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตนั้น และใช้ปริมาณของดีเอ็นเอในการวิเคราะห์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ต่อมาได้มีการนำเทคนิค RAPD มาใช้ศึกษากับสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิด ทั้งใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งผลจากเทคนิค RAPD สามารถนำมาใช้ในงานด้านโปรแกรมการผสมพันธุ์ (Garcia and Benzie, 1995) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Stothard and Rollinson , 1996; Tassanakajon et al., 1997 และ 1998) และการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะกับสปีชีส์ (Klinbunga et al., 2000) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับDNAของหอยนางรมในประเทศไทย ซึ่งความรู้พื้นฐานนี้เป็นส่วนสำคัญที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการพัฒนาโปรแกรมการผสมพันธุ์ และการคัดเลือกพันธุ์ของหอยนางรมที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ของไทย

มีการนำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้กับเทคนิค RFLPs เรียกว่า เทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Karl and Avise, 1992 และ 1993; Hu and Foltz, 1996; Boudry et al., 1998) คือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะโดยเทคนิค PCR และนำ PCR product มาตัดวิเคราะห์ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ข้อมูลที่ได้จะมีความถูกต้องมากกว่า RAPD-PCR ผลที่ได้จากเทคนิคนี้สามารถนำมาใช้หาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตรวมทั้งใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและงานด้านอนุกรมวิธาน มีการนำเทคนิค PCR – RFLP มาใช้ศึกษาในหอยนางรมหลายกรณี เช่น ศึกษาความแปรผันภายในสปีชีส์ *Crassostrea virginica* (Small and Chapman, 1997) จำแนกสปีชีส์หอยนางรมสกุล *Crassostrea* ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (Banks et al., 1993) นอกจากนี้ยังใช้บอกความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรของประชากรหอยนางรมโปรตุเกส (*C. angulata*) และหอยนางรมแถบแปซิฟิก (*C. gigas*) (Boudry et al., 1998) เป็นต้น

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ใช้แยกชนิดของหอยนางรมในสกุล *Crassostrea* และสกุล *Saccostrea* ในประเทศไทยจำนวน 5 ชนิดคือ *C. belcheri* (Sowerby, 1871) *C. iredalei* (Faustino, 1932) *S. cucullata* (Born, 1778) *S. forskalli* (Gmelin, 1791) และ *S. mytiloides* (Toriego, 1981 ชื่อวิทยาศาสตร์เดิมคือ *Saccostrea echinata*) และศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ของหอยนางรมในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR และ PCR-RFLP ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้เมื่อนำมารวมกับผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาจะนำไปสู่ความรู้และความเข้าใจในความหลากหลายและอนุกรมวิธานของหอยนางรมในประเทศไทย ความรู้พื้นฐานที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในสปีชีส์ที่ต้องการ ตรวจสอบชนิดของลูกหอยนางรมที่ซื้อขายเชิงพาณิชย์และการทำ restocking ของพ่อแม่พันธุ์หอยนางรมในประเทศไทย

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างหอยนางรม

ทำการเก็บตัวอย่างหอยนางรมจากแหล่งเดียวกับการศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือกหอย โดยเลือกแหล่งที่ศึกษา 3 แหล่งใหญ่ ๆ ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ที่มีการกระจายอยู่ของหอยนางรมทั้งจากแหล่งที่เลี้ยง และแหล่งที่พบในธรรมชาติ คือแหล่งที่ 1 จากอ่าวไทยภาคตะวันออก ครอบคลุมบริเวณ จ. ตราด ถึง จ. สมุทรสาคร แหล่งที่ 2 จากอ่าวไทยภาคใต้ คือตั้งแต่ บริเวณ จ. ประจวบคีรีขันธ์ ถึง จ. สงขลา และแหล่งที่ 3 จากฝั่งอันดามัน ตั้งแต่ จ. ระนอง ถึง จ. สตูล (ตาราง 2.1, รูป 2.1) โดยมีชนิดของหอยนางรมคือ *C. belcheri*, *C. iredalei*, *S. cucullata*, *S. forskali*, *S. mytiloides*, และกลุ่มหอยนางรมที่ไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ ประกอบด้วย *Crassostrea sp.*, *Saccostrea sp.* group 1, *Saccostrea sp.* group 2, และ *Saccostrea sp.* group 3 โดยมีหอยนางรมจำนวน 6 individuals (Oys30, Oys39, Oys95, Oys104, Oys121 และ Oys122) ซึ่งทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ได้ โดยอาจจะเกิดจาก hybridization ระหว่างชนิดของหอยนางรม

นอกจากนี้ได้เก็บตัวอย่าง *S. commercialis* จากประเทศ ออสเตรเลีย จำนวน 12 ตัวอย่าง มาใช้เป็น ingroup เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับหอยนางรมสกุล *Saccostrea* ในประเทศไทย ส่วนหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) นั้นได้นำมาใช้เป็น outgroup สำหรับการวิเคราะห์ผลทาง phylogenetics โดยจำนวนตัวอย่างทั้งหมดจะเก็บรักษาไว้ที่ $-80\ ^{0}C$ จนกว่าจะนำมาสกัด DNA

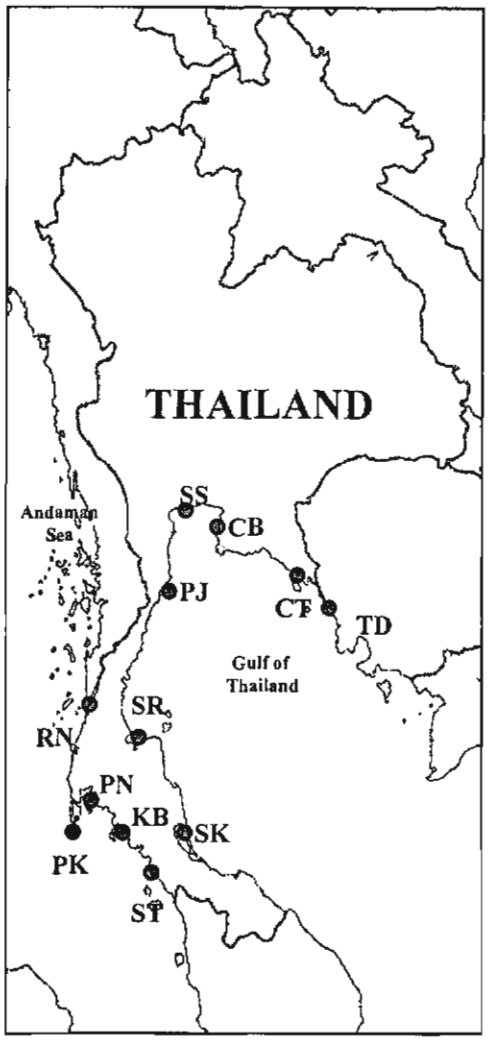
ตาราง 2.1 แสดงสถานที่เก็บ และจำนวนตัวอย่างของหอยนางรมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ตัวอย่าง	คำย่อ	จำนวนตัวอย่างสำหรับRAPD (จำนวนตัวอย่างสำหรับPCR-RFLP)
Local oyster : *C. belcheri*		
จ. สุราษฎร์ธานี (east of PT)	CbSR(E)	10 (8)
จ. สงขลา (east of PT)	CbSK(E)	4 (3)
จ. ระนอง (west of PT)	CbRN(W)	3 (3)
จ. กระบี่ (west of PT)	CbKB(W)	3 (3)
Local oyster : *C. iredalei*		
จ. ชลบุรี (Gulf of Thailand, east)	CiCB(E)	6 (6)
จ. ประจวบคีรีขันธ์ (east of PT)	CiPJ(E)	4 (4)
จ.สงขลา (east of PT)	CiSK(E)	6 (6)
จ. พังงา (west of PT)	CiPN(W)	4 (4)
จ. ระนอง (West of PT)	CiRN(W)	- (2)

ตาราง 2.1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	คำย่อ	จำนวนตัวอย่างสำหรับRAPD (จำนวนตัวอย่างสำหรับPCR-RFLP)
Local oyster : *S. cucullata*		
จ. ตราด (Gulf of Thailand, east)	ScTD(E)	5 (5)
จ. จันทบุรี (Gulf of Thailand, east)	ScCT(E)	8 (6)
จ. ระนอง (west of PT)	ScRN(W)	7 (6)
จ. ภูเก็ต (west of PT)	ScPK(W)	6 (6)
Local oyster : *S. forskali*		
จ. จันทบุรี (Gulf of Thailand, east)	SfCT(E)	20 (12)
จ. ชลบุรี ต. อ่างศิลา (Gulf of Thailand, east)	SfCBA(E)	4 (4)
จ. ชลบุรี เกาะสีชัง (Gulf of Thailand, east)	SfCBS(E)	11 (10)
จ. ประจวบคีรีขันธ์ (east of PT)	SfPJ(E)	3 (3)
จ. สุราษฎร์ธานี (east of PT)	SfSR(E)	3 (3)
จ. สงขลา (east of PT)	SfSK(E)	5 (5)
จ. ระนอง (west of PT)	SfRN(W)	6 (5)
จ. สตูล (west of PT)	SfST(W)	6 (4)
Local oyster : *S. mytiloides*		
จ. จันทบุรี (Gulf of Thailand, east)	SmCT(E)	- (2)
จ. ภูเก็ต (west of PT)	SmPK(W)	4 (3)
จ. ระนอง (west of PT)	SmRN(W)	9 (6)
จ. สมุทรสาคร (Gulf of Thailand, east)	SmSS(E)	8 (6)
Unidentified local species: *Crassostrea* sp.		
จ. กระบี่ (west of PT)	CsKB(W)	9 (9)
Unidentified local species: *Saccostrea*. sp. group 1		
จ. สุราษฎร์ธานี (east of PT)	S1SR (E)	9 (8)
Unidentified local species: *Saccostrea*. sp. group 2		
จ. ระนอง (west of PT)	S2RN (W)	9 (9)
Unidentified local species: *Saccostrea*. sp. group 3		
จ. สมุทรสาคร (Gulf of Thailand, east)	S3SS (E)	5 (5)
An ingroup reference : *S. commercialis*	Scom	12 (6)
An outgroup reference : *P. viridis* จ. ชลบุรี	Pevi	12 (5)
Total (*N*)		203 (166)

คำย่อ ; PT = peninsular Thailand



รูป 2.1 แสดงแหล่งตัวอย่างของหอยนางรมในประเทศไทยที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วยตัวอย่างจาก จ. ตราด (TD) จ. จันทบุรี (CT) จ. ชลบุรี (CB) จ. สมุทรสาคร (SS) จ. ประจวบคีรีขันธ์ (PJ) จ. สุราษฎร์ธานี (SR) จ. สงขลา (SK) จ. ระนอง (RN) จ. พังงา (PN) จ. ภูเก็ต (PK) จ. กระบี่ (KB) จ. สตูล (ST) โดยทำการเก็บหอยนางรมอย่างน้อย 1 ชนิดในแต่ละพื้นที่

2. การสกัด Genomic DNA จากหอยนางรม

นำส่วนกล้ามเนื้อยึดฝาเปลือก (adductor muscles) มาบดให้ละเอียดใน 600 µl ของ extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 100 mM NaCl, 200 mM Sucrose, 50 mM EDTA, pH 8.0) ทำให้เซลล์แตกด้วย SDS โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น1.0% (w/v) และบ่มที่ 65 ^{0}C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 15 µl ของ Proteinase K (20 mg/ml) กับ 10 µl ของ RNase A (10 mg/ml) และบ่มที่ 65 ^{0}C นาน 3 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอน แยกส่วนใสด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนใสมาสกัดแยกโปรตีนออกด้วยวิธี Phenol-chloroform ตกตะกอน DNA ด้วย absolute ethanol และ ละลาย DNA ที่ได้ใน 200 µl ของ TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 และ 1 mM EDTA) เก็บรักษา DNA ไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะใช้วิเคราะห์ปริมาณ และคุณภาพของ DNA ด้วยเทคนิค spectrophotometry และ agarose gel electrophoresis โดยการเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย RAPD-PCR

3.1 RAPD analysis

นำ DNA ของหอยนางรมมาทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ความหลากหลายของหอยนางรมแต่ละชนิดด้วยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ PCR conditions ตามวิธีของ Tassanakajon et al. (1997) โดยทำปฏิกริยา PCRในปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 100 µM ของ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP, 50 ng ของ genomic DNA, 0.2 µM ของ primer และ 1 unit ของ *Taq* DNA polymerase ทำการเพิ่มขยายปริมาณ DNA โดยทำ PCR ตามวิธีของ Okamura et al. (1993) โดยมี PCR profiles คือ Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 10 วินาที Annealing ที่ 36 °C เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 90 วินาที จำนวนทั้งหมด 45 รอบ และ Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

3.2 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

รูปแบบ RAPD ที่ได้จะนำมาแปลงเป็น binary code ที่แสดงค่า 0/1 โดย 0 = ไม่มีชิ้นDNA ที่ตำแหน่งที่ตรวจสอบ และ 1 = มีชิ้น DNA ในตำแหน่งที่ตรวจสอบ จากนั้นจึงนำ matrix ดังกล่าวมาคำนวณค่าทางพันธุศาสตร์ต่าง ๆ

ทำการวิเคราะห์ค่า similarity index ระหว่างหอยนางรมแต่ละตัวที่ทำการทดลองด้วยสูตร

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

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

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

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

ค่า similarity index ภายในกลุ่มประชากรหอยนางรม คำนวณโดยการหาค่าเฉลี่ย similarity index ระหว่างหอยนางรมแต่ละตัว ภายในกลุ่มประชากรนั้น ค่า similarity index ระหว่างกลุ่มประชากร (S_{ij}) คำนวณโดยการหาค่า similarity index ระหว่างหอยนางรมแต่ละคู่ จากกลุ่มประชากร i กับ j โดยใช้สูตรเหมือนข้างบนที่กล่าวมาแล้ว และนำค่า similarity index ที่ได้มาเปลี่ยนกลับเพื่อหาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยใช้สูตร $\overline{D}_{ij} = 1 - \overline{S}_{ij}$ (Lynch, 1990)

นำค่า genetic distance ที่ได้มาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) โดยใช้โปรแกรม NEIGHBOR ใน Phylip (Felsenstein, 1993)

3.3 การโคลน RAPD fragments ที่จำเพาะต่อ *C. belcheri*

ทำการโคลนเครื่องหมาย RAPD 3 ชิ้น ประกอบด้วยชิ้น RAPD ขนาด 600 bp และขนาด 835 bp ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB08 และ ขนาด 650 bp ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB01 มาโคลนโดยวิธี *Bam*HI-sticky end adaptor method (Vincent et al., 1993) และวิธี T-A cloning (Hoelzel และ Green, 1992)

หลังจากที่นำ RAPD-PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB08 มาทำ electrophoresis แล้วจะตัด band ขนาด600 bp และ 835 bp ออกจากเจล และ elute DNA ดังกล่าวโดยใช้ Qiaquick gel extraction kit (Qiagen Ltd.) จากนั้นนำ DNA ที่ได้มา reamplify โดยไพรเมอร์ OPB08 ที่ได้ต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีจุดจำเพาะต่อ *Bam*HI เพิ่มเข้าที่ปลาย 5′ (CGGGATCCCGGTCCACACGG) โดย reamplify fragment แต่ละชิ้น และนำมาสกัดด้วย proteinase K/phenol/chloroform extraction method จากนั้นนำมาตัดด้วย *Bam*HI และ purify อีกครั้งโดยวิธี phenol-chloroform extraction นำ DNA fragment ที่ได้มา ligation กับ pUC18 ที่ตัดด้วย *Bam*HI ส่วนแถบ DNA ขนาด 650 bp ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB01 จะ elute DNA ออกจากเจลโดยใช้ Qiaquick gel extraction kit และทำ DNA ให้บริสุทธิ์โดยใช้ proteinase K / phenol / chloroform extraction method จากนั้นนำ 650 bp fragment มาทำ ligation กับ pGEM^{R}- T easy vector

นำแต่ละ ligation product มา transformation เข้า *E. coli* XL 1- Blue โดยวิธี electrotransformation และนำ recombinant clones ที่ได้มาตรวจสอบหาชิ้น insert โดยการย่อยด้วย *Bam*HI สำหรับ 600 bp และ 835 bp inserts และย่อยด้วย *Eco*RI สำหรับ 650 bp insert และวิเคราะห์ชิ้น insert ใน 1.0% agarose gel electrophoresis แล้วนำ recombinant clones คือ โคลนpPACB1 ที่มี

650 bp insert โคลน pPACB2 ที่มี 835 bp insert และโคลน pPACB3 ที่มี 600 bp insert ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ทิศทาง โดยใช้ automatic sequencer (ABI-PRISM, Model 377) ที่สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

3.4 การออกแบบไพรเมอร์ การทดสอบ sensitivity และความจำเพาะของไพรเมอร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละ insert มาออกแบบไพรเมอร์ทั้ง forward และ reverse โดยใช้โปรแกรม Oligo 4.0 นำไพรเมอร์ที่ได้มาทำ PCR เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม และทดสอบ sensitivity ของแต่ละคู่ของไพรเมอร์โดยการตรวจสอบกับ DNA template ของ *C. belcheri* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 25 ng ถึง 16.25 pg โดยสภาวะของปฏิกิริยาPCRเหมือนกับที่ทำใน RAPD analysis แต่ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ คือ 0.4 μM ของ forward and reverse primers

ทำการเพิ่มขยายปริมาณ DNA โดยมี PCR profiles คือ Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 45 วินาที Annealing ที่ 62 °C เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 25 รอบ และ Final extension 72 °C 5 นาที จำนวน 1 รอบ และทำการวิเคราะห์ PCR products ใน 1.4% agarose gel electrophoresis

จากนั้นได้นำคู่ของไพรเมอร์ pPACB1-F/R มาใช้ตรวจสอบความจำเพาะต่อ *C. belcheri* กับตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 203 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย หอยนางรมในประเทศไทยทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ หอยนางรม *S. commercialis* จากประเทศออสเตรเลีย และหอยแมลงภู่ *P. viridis* โดยใช้ PCR conditions เหมือนกับการทำ sensitivity test

4. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

4.1 คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมหอยนางรมชนิดต่างๆ

นำดีเอ็นเอของหอยนางรมมาทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ 12S rDNA, 16S rDNA, COI และ NADH subunit 5 ซึ่งเป็นยีนใน mitochondrial genome และ 18S rDNA ใน nuclear genome โดยทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 50 μl ที่ประกอบด้วย 1X PCR buffer , 2 mM $MgCl_2$, 100μM ของ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP , 0.5 μM ของ DNA primers และ 1 unit ของ *Taq* DNA polymerase การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจะทำตามวิธีของ Boudry et al. (1998) หลังจากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis พบว่า primers สำหรับ 16S rDNA, 18S rDNA และ COI สามารถขยายชิ้น DNA ดังกล่าวได้ในทุกสปีชีส์ของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้ สำหรับ PCR product ของ COI นั้นจะมีมากกว่า 1 band แต่

ขนาดของ product ที่คาดหมายมีขนาด 710 bp ดังนั้นจึงทำการตัด band ดังกล่าวและ recover DNA ขนาด 710 bp ก่อนนำไปย่อยด้วย restriction endonucleases

4.2 คัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ให้ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ในหอยนางรมชนิดต่างๆ

ทำการตัด PCR products ของ 16S rDNA, 18S rDNA และ COI ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆที่ทำการคัดเลือกไว้ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบสประกอบด้วย *Alu* I, *Mbo* I *Rsa* I และ *Taq* I, 5 คู่เบสประกอบด้วย *Dde*I และ *Hinf*I, 6 คู่เบส ประกอบด้วย *Acs* I และ*Dra* I (ตาราง 2.3) โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 15 µl ซึ่งประกอบด้วย 1X restriction enzyme buffer, 0.1 µg/ml BSA, 4 mM Spermidine trihydrochloride และ 1 - 4 unit ของเอนไซม์ ตรวจสอบผลด้วย 2.5% metaphor agarose gel electrophoresis จากนั้นคัดเลือกเอนไซม์ที่ตัดดีเอ็นเอเป้าหมายและให้ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ในหอยนางรมชนิดต่างๆมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยนางรมทั้ง 5 ชนิด

ตาราง 2.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
ND5	F:5'-ATA GAG CGT TGC ATT GAA GC-3' R: 5'-TCA AGG AGC ATT AGA GTG AG-3'	Designed from conserved sequences of several marine species retrieved from GenBank
12S rDNA	F: 5'-AAA CTA GGA TTA TAT ACC CTA TTA-3' R: 5'-AAG AGG GAC GGG CGA TTT GT-3'	Palumbi et al. (1991)
16S rDNA	F:5'-CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT-3' R: 5'-GGT CTG AAC TCA GAT CAG ATC ACG T-3'	Palumbi et al. (1991); Small and Chapman (1997)
CO1-COII	F:5'-TTG ATT TTT TGG TCA TCC AGA AGT-3' R: 5'-CCA CAA ATT TCT GAA CAT TGA CC-3'	Sihanunthavong et al. (1999)
18S rDNA	F:5'-TGG ATC CGG GCA AGT CTG GTG CC-3' R: 5'-TGA AGT CAA GGG CAT CAC AGA CC-3'	Aoki, T (personal communication)

4. วิเคราะห์ข้อมูล

ทำการคำนวณหาค่า genetic distance (*d*) ระหว่าง haplotypes โดยใช้โปรแกรม REAP version 4.0 (McElroy et al., 1991) นำค่า genetic distance ที่ได้มาทำการสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี Neighbor - joining (Saitou and Nei, 1987) ด้วย Phylip version 3.56 (Felsenstein, 1993)

ตาราง 2.3 Restriction enzymes ที่ใช้ในการทดลองนี้

ยีน	เอนไซม์	ตำแหน่งจดจำ
16S rDNA		
	Acs I	(Aor G)AATT(T or C)
	Alu I	AGCT
	Dde I	CTNAG
	Dra I	TTTAAA
	Taq I	TCGA
	Rsa I	GTAC
18S rDNA		
	Hin fI	GANTC
COI		
	Acs I	(Aor G)AATT(T or C)
	Dde I	CTNAG
	Mbo I	GATC

ผลการทดลอง

RAPD-PCR

การสกัด genomic DNA ของหอยนางรม

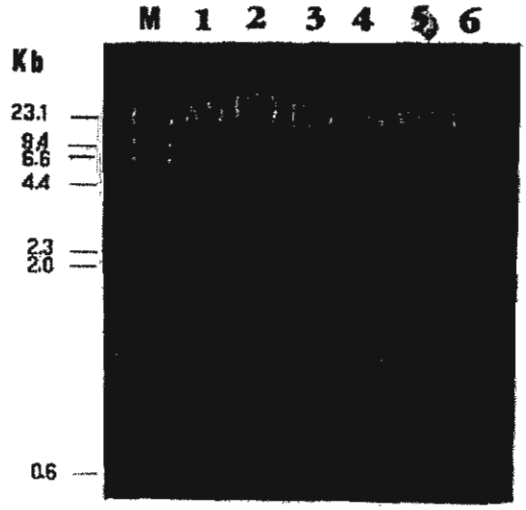
จากการสกัด genomic DNA ของหอยนางรมโดยวิธี proteinase K / phenol / chloroform พบว่าได้ high molecular weight DNA ที่มีขนาดมากกว่า 23.1 Kb (รูปที่ 3.1) ความบริสุทธิ์ของ DNA ที่ได้มีอัตราส่วนของ OD_{260} / OD_{280} อยู่ระหว่าง 2.0-2.5 ส่วนปริมาณของ DNA ที่ได้ อยู่ในช่วง 50 μg - 100 μg จาก 100 mg ของ adductor muscle

จากการคัดเลือกไพรเมอร์ซึ่งมีขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวนทั้งหมด 103 ไพรเมอร์ โดยใช้ตัวแทน genera *Crassostrea* และ *Saccostrea* คือ *C. belcheri* และ *S. forskali* ชนิดละ 1 ตัวอย่าง พบว่ามี 83 ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบ DNA อย่างชัดเจนระหว่าง *C. belcheri* และ *S. forskali* โดยมี 11 ไพรเมอร์ ซึ่งให้แถบ DNA ที่ตรวจนับได้ง่าย จาก 11 ไพรเมอร์นี้ได้ทำการเพิ่มจำนวนตัวอย่าง และจำนวนสปีชีส์ของหอยนางรมที่ใช้ศึกษา จึงทำการเลือก 5 ไพรเมอร์ ประกอบด้วย OPA09, OPB01, OPB08, UBC210 และ UBC220 ที่สามารถให้แถบ DNA ที่ตรวจนับได้ง่าย และให้รูปแบบของ RAPD เหมือนเดิมเมื่อทำซ้ำ (scorable และ reproducible bands) ในหอยนางรมทั้ง 5 ชนิด มาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลาย และค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อสปีชีส์กับหอยนางรมทั้ง 5 ชนิดในประเทศไทย

การวิเคราะห์ความหลากหลายของหอยนางรมในประเทศไทยด้วยเทคนิค RAPD

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของหอยนางรมในประเทศไทยด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ 5 ไพรเมอร์ (OPA09, OPB01, OPB08, UBC210 และ UBC220) พบว่า หอยนางรมในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และโดยพบแถบ DNA จำนวนทั้งหมด 254 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 200-2500 bp (ตาราง 3.1) โดยแต่ละไพรเมอร์จะให้แถบ DNA จำนวน 55, 42, 62, 44 และ 51 แถบ ที่ได้จากไพรเมอร์ OPA09 OPB01 OPB08 UBC210 และ UBC220 ตามลำดับ โดยแต่ละแถบ DNA ให้เปอร์เซนต์ความหลากหลาย (polymorphic bands) เป็น 100%

ส่วนเปอร์เซนต์ polymorphism ของชิ้น RAPD ของหอยนางรมในแต่ละสปีชีส์ (พบน้อยกว่า 95% ของหอยนางรมในแต่ละสปีชีส์) ใน *C. belcheri, C. iredalei, S. cucullata, S. forskali, S. mytiloides, Crassostrea* sp., *Saccostrea* sp. group 1, *Saccostrea* sp. group 2, *Saccostrea* sp. group 3 และ *S. commercialis* มีค่าเท่ากับ 53.23% 74.67% 97.69% 99.40% 98.50% 85.92% 90.11% 77.63% 89.55% และ 86.20% ตามลำดับ จากผลแสดงให้เห็นว่าหอยนางรมสกุล *Saccostrea* ทุกชนิดมีเปอร์เซนต์ความหลากหลายสูงกว่า *C. belcheri* และ *C. iredalei* (ตาราง 3.2)



รูป 3.1 Total DNA ที่สกัดจากส่วนของ adductor muscle ของหอยนางรมซึ่งนำมาแยกผ่านกระแสไฟฟ้าบน 0.8% agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide

Lane M = λ / *Hin*dIII

Lanes 1-6 = Total DNA ของหอยนางรมแต่ละตัว

จำนวน RAPD genotypes ที่พบจากการใช้ไพรเมอร์ OPA09 OPB01 OPB08 UBC210 และ UBC220 เท่ากับ 193, 192, 174, 192 และ 181 genotypes ตามลำดับ เมื่อหาค่าเฉลี่ยของ genotypes ต่อไพรเมอร์ใน *C. belcheri* มีค่า 11.6 และใน *C. iredalei, S. cucullata, S. forskali* และ *S. mytiloides* มีค่า 18.0, 25.4, 53.0 และ 23.0 ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่างจำนวนของ genotypes ต่อไพรเมอร์และต่อจำนวนตัวอย่าง (a ratio between the number of genotypes per primer and the number of investigated specimens in a particular species)ใน *C. belcheri, C. iredalei, S. cucullata,S. forskali* และ *S. mytiloides* มีค่า 0.58 0.90 0.98 1.00 และ 1.00 ตามลำดับ รูปแบบของ RAPD amplification patterns ของแต่ละไพรเมอร์ แสดงได้ในรูปที่ 3.2-3.19

ตาราง 3.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ RAPD primers ขนาดและจำนวนของ RAPD bands และเปอร์เซนต์ polymorphic bands ของหอยนางรมในประเทศไทยที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย RAPD-PCR

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด (bp)	จำนวนของ RAPD bands	Polymorphic bands (%)
OPA09	GGGTAACGCC	200-1750	55	100
OPB01	GTTTCGCTCC	375-2100	42	100
OPB08	GTCCACACGG	275-2500	62	100
UBC210	GCACCGAGAG	235-2000	44	100
UBC220	GTCGATGTCG	280-2300	51	100
Overall			254	100

ตาราง 3.2 แสดงจำนวน bands ทั้งหมด และเปอร์เซนต์ของ polymorphic และ monomorphic bands ภายในหอยนางรมแต่ละชนิด และหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA09, OPB01, OPB08, UBC210 and UBC220

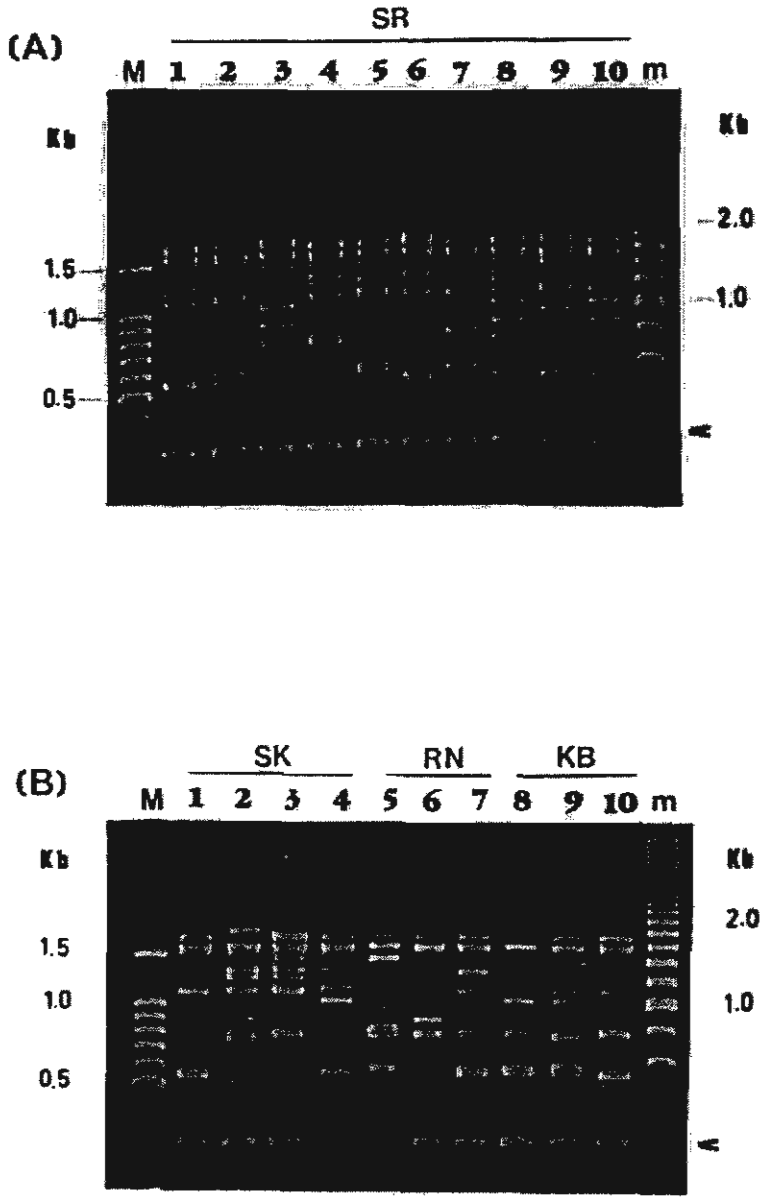
Primer No.	*C. belcheri* (*N* = 20)			*C. iredalei* (*N* = 20)			*S. cucullata* (*N* = 26)		
	No. of bands	No. of polymorphic bands	No. of monomorphic bands	No. of bands	No. of polymorphic bands	No. of monomorphic bands	No. of bands	No. of polymorphic bands	No. of monomorphic bands
OPA09	18	14	4	15	13	2	32	31	1
OPB01	11	5	6	17	14	3	28	28	0
OPB08	5	0	5	12	9	3	19	18	1
UBC210	14	10	4	17	12	5	25	25	0
UBC220	14	4	8	14	8	6	26	25	1
Total	62	33 (53.23%)	27 (43.55%)	75	56 (74.67%)	19 (25.33%)	130	127 (97.69%)	3 (2.31%)

Primer No.	*S. forskali* (*N* = 58)			*S. mytiloides* (*N* = 23)			*Crassostrea* sp. (*N* = 9)		
	No. of bands	No. of polymorphic bands	No. of monomorphic bands	No. of bands	No. of polymorphic bands	No. of monomorphic bands	No. of bands	No. of polymorphic bands	No. of monomorphic bands
OPA09	28	28	0	26	26	0	18	16	2
OPB01	31	31	0	27	27	0	17	17	0
OPB08	38	38	0	24	24	0	10	10	0
UBC210	29	29	0	24	22	2	8	2	6
UBC220	40	40	1	32	32	0	18	16	2
Total	166	165 (99.40%)	1 (0.60%)	133	131 (98.50%)	2 (1.50%)	71	61 (85.92%)	10 (14.08%)

ตาราง 3.2 (ต่อ)

Primer No.	*Saccostrea* sp. group 1 (*N* = 9)			*Saccostrea* sp. group 2 (*N* = 9)			*Saccostrea* sp. group 3 (*N* = 5)		
	No. of bands	No. of polymorphic bands	No. of monomorphic bands	No. of bands	No. of polymorphic bands	No. of monomorphic bands	No. of bands	No. of polymorphic bands	No. of monomorphic bands
OPA09	16	12	4	12	10	2	14	12	2
OPB01	14	13	1	14	14	0	15	15	0
OPB08	17	15	2	17	13	4	12	11	1
UBC210	20	19	1	13	11	2	13	10	3
UBC220	24	23	1	20	11	9	13	12	1
Total	91	82 (90.11%)	9 (9.89%)	76	59 (77.63%)	17 (22.37%)	67	60 (89.55%)	7 (10.45%)

Primer No.	*S. commercialis* (*N* = 12)			*P. viridis* (*N* = 12)		
	No. of bands	No. of polymorphic bands	No. of monomorphic bands	No. of bands	No. of polymorphic bands	No. of monomorphic bands
OPA09	22	19	3	8	3	5
OPB01	20	18	2	12	6	6
OPB08	12	11	1	12	7	5
UBC210	16	13	3	10	7	3
UBC220	17	14	3	10	2	8
Total	87	75 (86.20%)	12 (13.79%)	52	25 (48.08%)	27 (51.92%)



รูป 3.2 RAPD patterns ของ *C. belcheri* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPA09

A: lanes 1-10 = *C. belcheri* จาก จ. สุราษฎร์ธานี

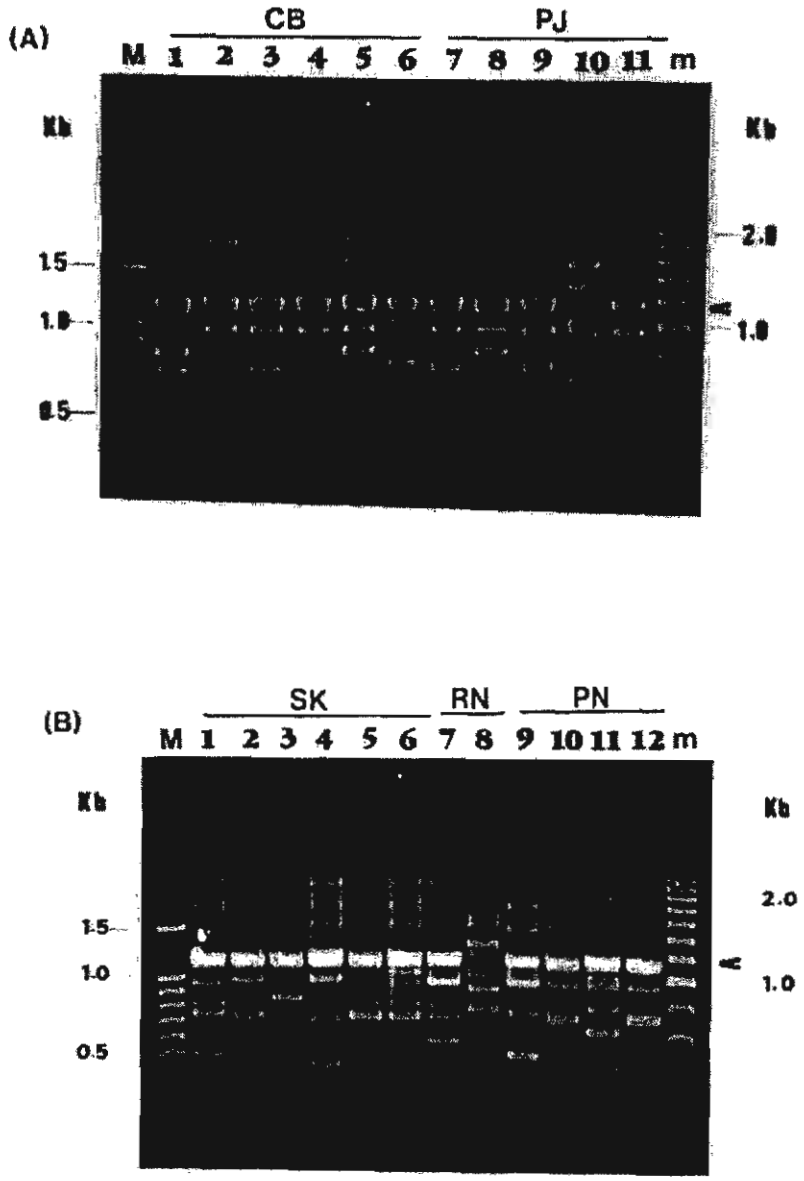
B: lanes 1-4 = *C. belcheri* จาก จ. สงขลา

lanes 5-7 = *C. belcheri* จาก จ. ระนอง

lanes 8-10 = *C. belcheri* จาก จ. กระบี่

Lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladders

< แสดง species-specific marker (250 bp) ที่พบใน *C. belcheri*



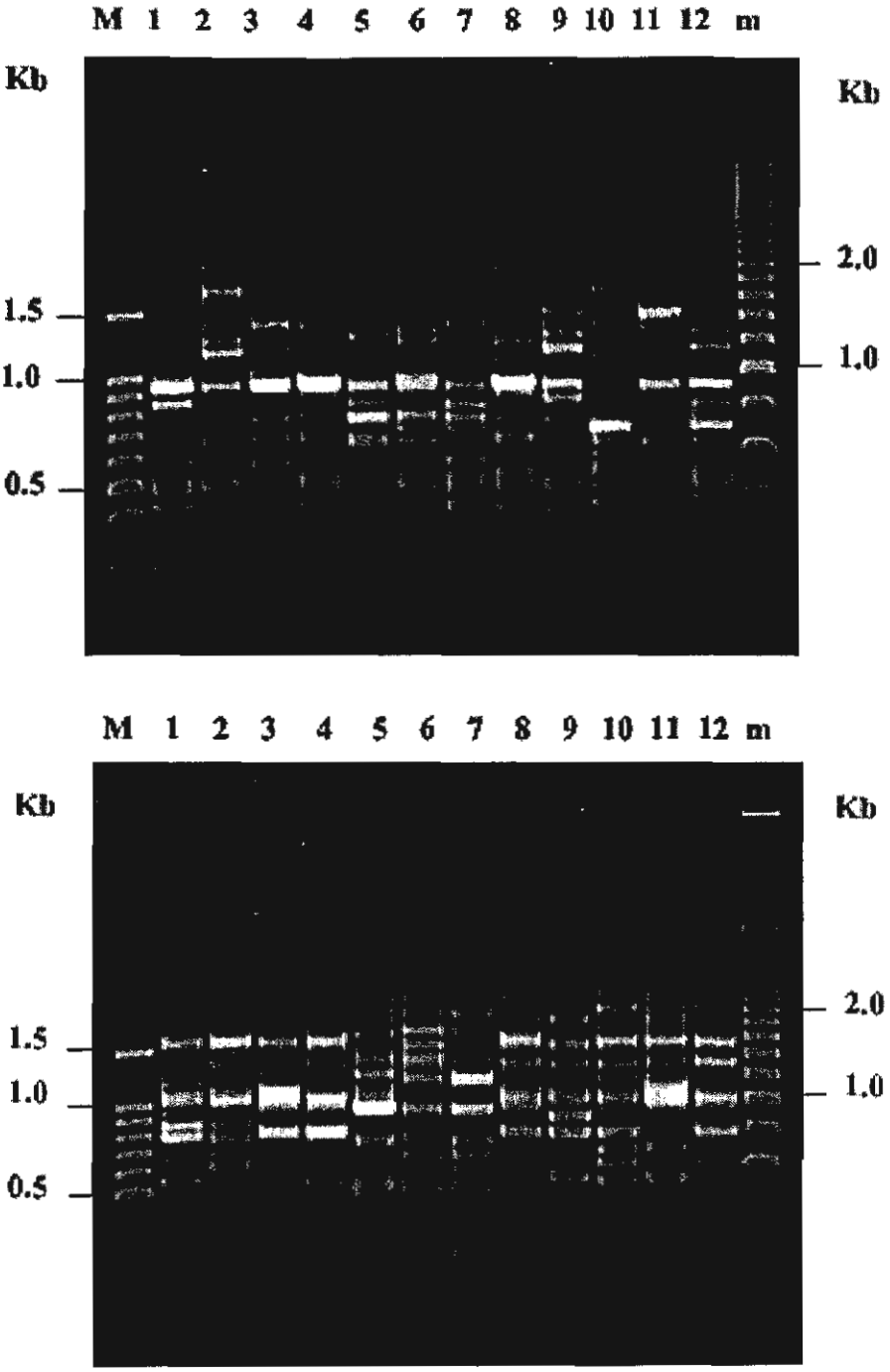
รูป 3.3 RAPD patterns ของ *C. iredalei* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPA09

A: Lanes 1-6 = *C. iredalei* จาก จ. ชลบุรี Lanes 7-9 และ 11 = *C. iredalei* จาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ Lane 10 = *S. forskali*–like oyster จาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ (Oys30)

B: Lanes 1-6 = *C. iredalei* จาก จ. สงขลา Lane 7 = *C. iredalei* จาก จ. ระนอง lanes 9-12 = *C. iredalei* จาก จ. พังงา Lane 8 = *C. iredalei*–like oyster จาก จ. ระนอง (Oys39) Lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladders

< แสดง species-specific marker (1150 bp) ที่พบใน *C. iredalei*

Oys30 มี mtDNA จีโนไทป์เป็น *S. forskali* (DEDCBABCDF) ในขณะที่ Oys39 มี mtDNA จีโนไทป์เป็น *C. iredalei* (BBBBAAAABC)



รูป 3.4 RAPD patterns ของ *S. cucullata* และ *S. forskali* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPA09

A: Lanes 1-6 = *S. cucullata* จาก จ. ตราด

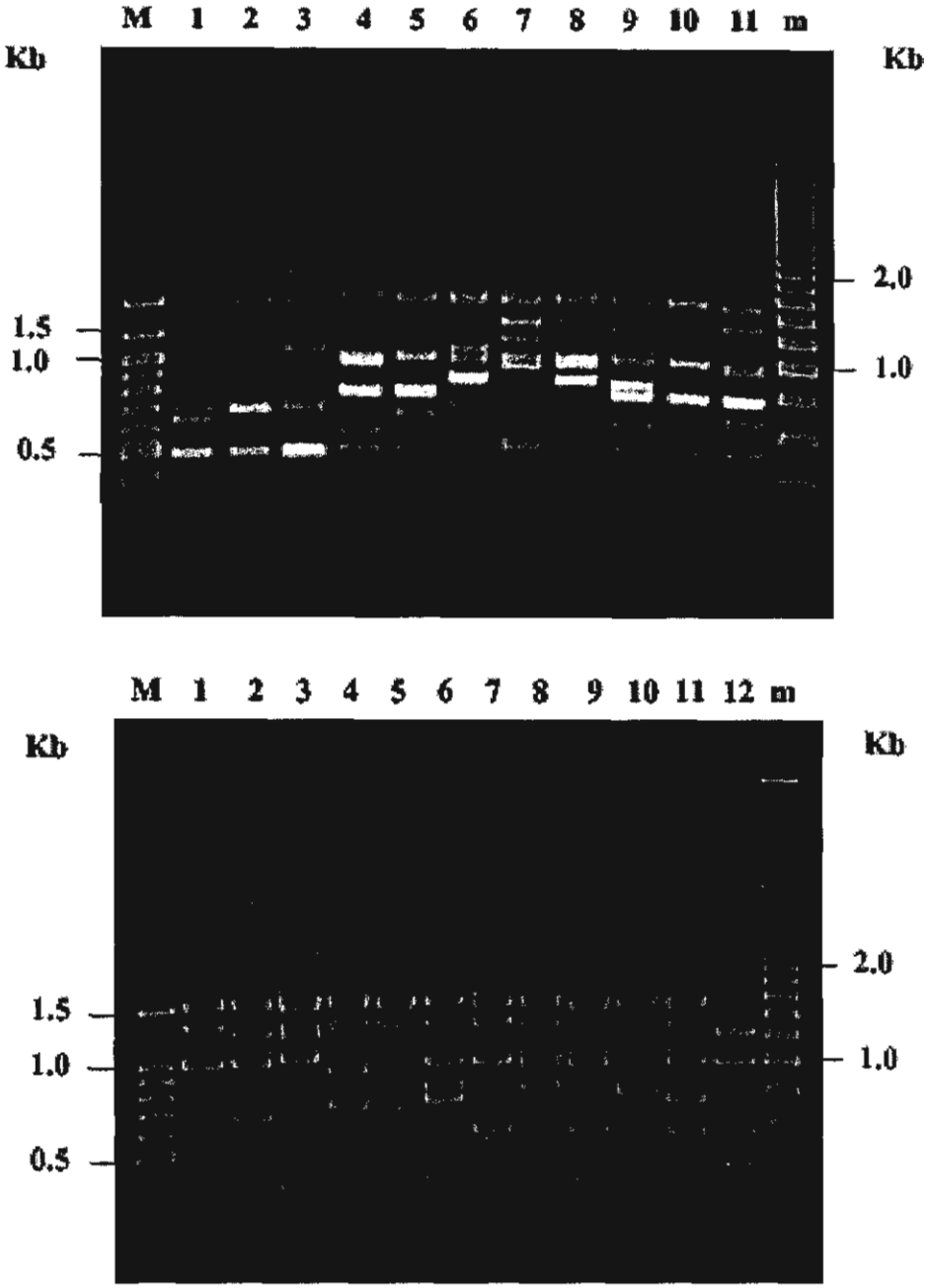
Lanes 7-12 = *S. cucullata* จาก จ. ระนอง

B: Lanes 1-4 = *S. forskali* จาก ต. อ่างศิลา จ. ชลบุรี

Lanes 5-7 = *S. cucullata* จาก จ. จันทบุรี

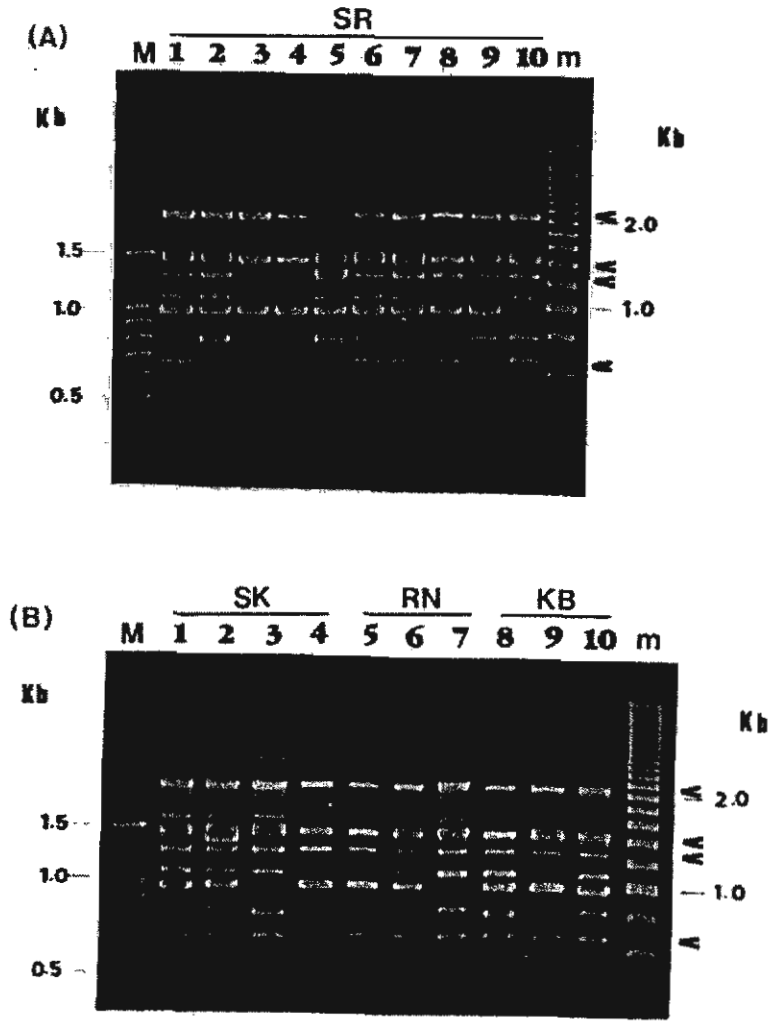
Lanes 8-12 = *S. forskali* จาก จ. จันทบุรี

Lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladder



รูป 3.5 RAPD patterns ที่ได้จากไพรเมอร์ OPA09

A:	Lanes 1-3	= *S. mytiloides* จาก จ. ระนอง
	Lanes 4-6	= *S. mytiloides* จาก จ. สมุทรสาคร
	Lanes 7-11	= *Saccostrea* sp. group 3 จาก จ. สมุทรสาคร
B:	Lanes 2-4	= *S. forskali* จากเกาะปราบ จ. สุราษฎร์ธานี
	Lanes 1 และ 5-12	= *Saccostrea* sp. group 1 จากเกาะปราบ จ. สุราษฎร์ธานี
	Lanes M และ m	= 100 bp ladder และ 200 bp ladder



รูป 3.6 RAPD patterns ของ *C. belcheri* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB01

A: Lanes 1-10 = *C. belcheri* จาก จ. สุราษฎร์ธานี

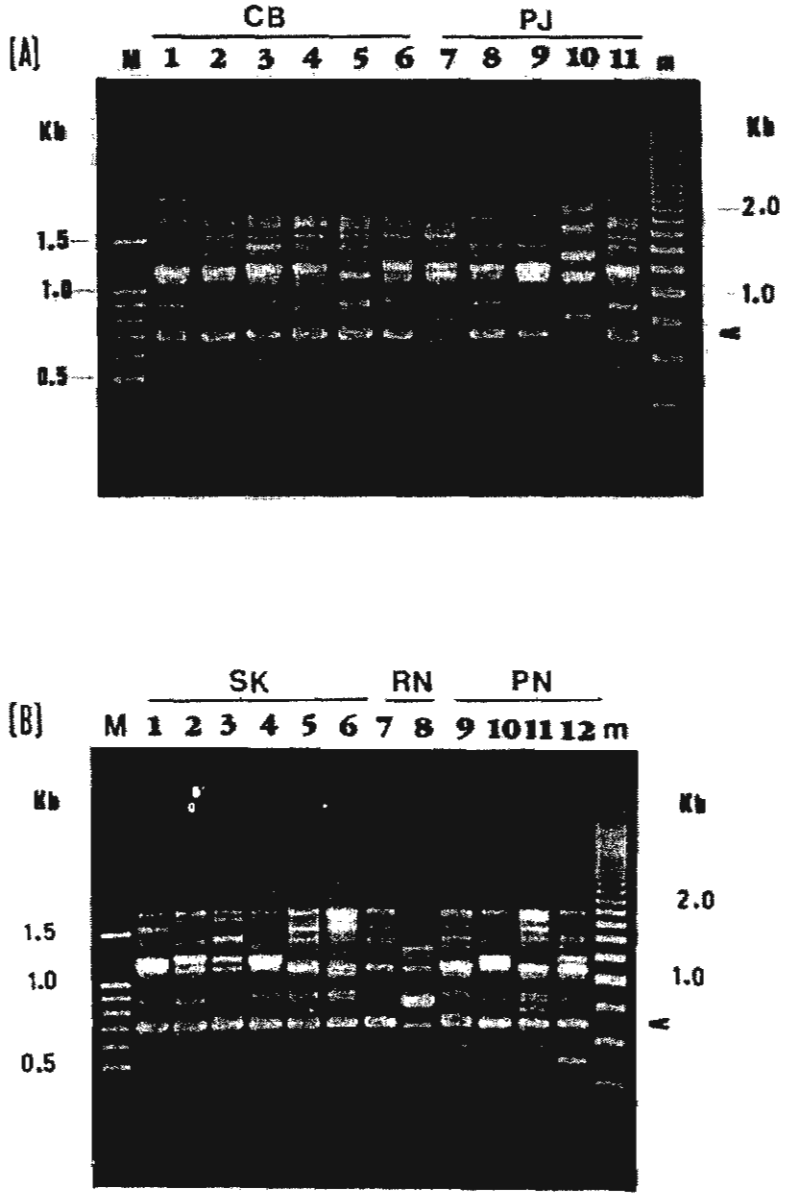
B: Lanes 1-4 = *C. belcheri* จาก จ. สงขลา

Lanes 5-7 = *C. belcheri* จาก จ. ระนอง

Lanes 8-10 = *C. belcheri* จาก จ. กระบี่

Lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladder

< แสดง species-specific markers (2100 bp, 1400 bp, 1250 bp และ 650 bp) ที่พบใน *C. belcheri*



รูป 3.7 RAPD patterns ของ *C. iredalei* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB01

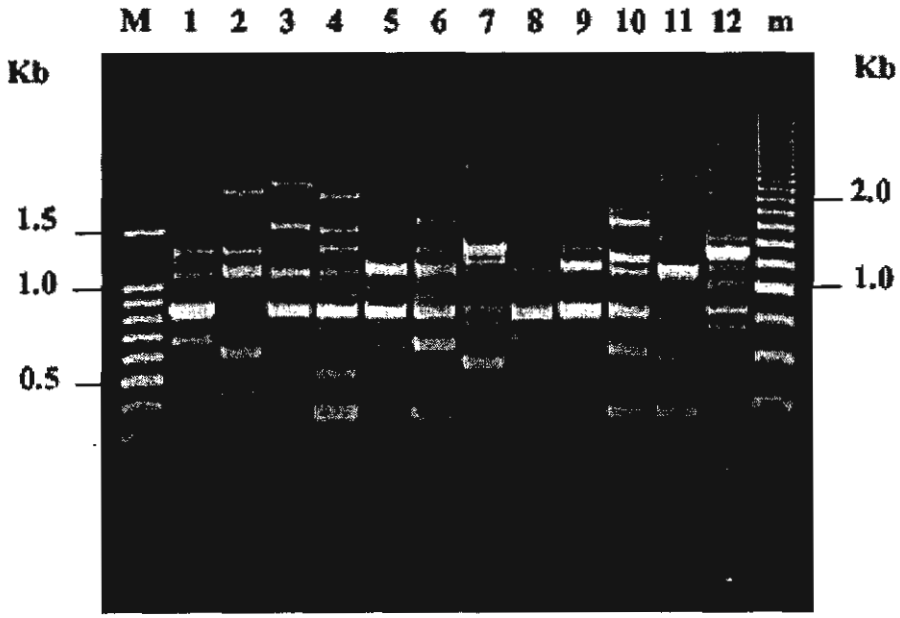
A: Lanes 1-6 = *C. iredalei* จาก จ. ชลบุรี Lanes 7-9 และ 11 = *C. iredalei* จาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ Lane 10 = *S. forskali*–like oyster จาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ (Oys30)

B: Lanes 1-6 = *C. iredalei* จาก จ. สงขลา Lane 7 = *C. iredalei* จาก จ. ระนอง

lanes 9-12 = *C. iredalei* จาก จ. พังงา Lane 8 = *C. iredalei* – like oyster จาก จ. ระนอง (Oys39) Lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladder

< แสดง species-specific marker (700 bp) ที่พบใน *C. iredalei*

Oys30 มี mtDNA จีโนไทป์เป็น *S. forskali* (DEDCBABCDF) ในขณะที่ Oys39 มี mtDNA จีโนไทป์เป็น *C. iredalei* (BBBBAAAABC)

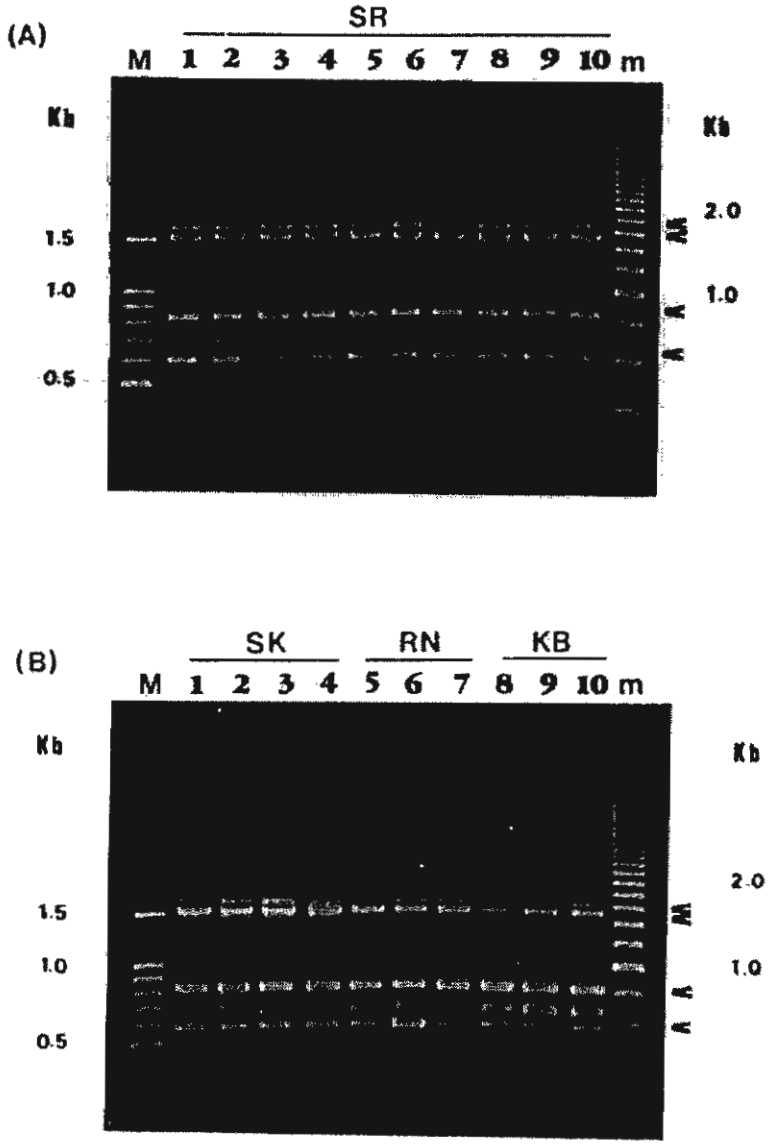


รูป 3.8 RAPD patterns ของ *S. forskali* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB01

Lanes 1-6 = *S. forskali* จาก จ. สตูล

Lanes 7-12 = *S. forskali* จาก จ. ระนอง

Lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladder



รูป 3.9 RAPD patterns ของ *C. belcheri* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB01

A: Lanes 1-10 = *C. belcheri* จาก จ. สุราษฎร์ธานี

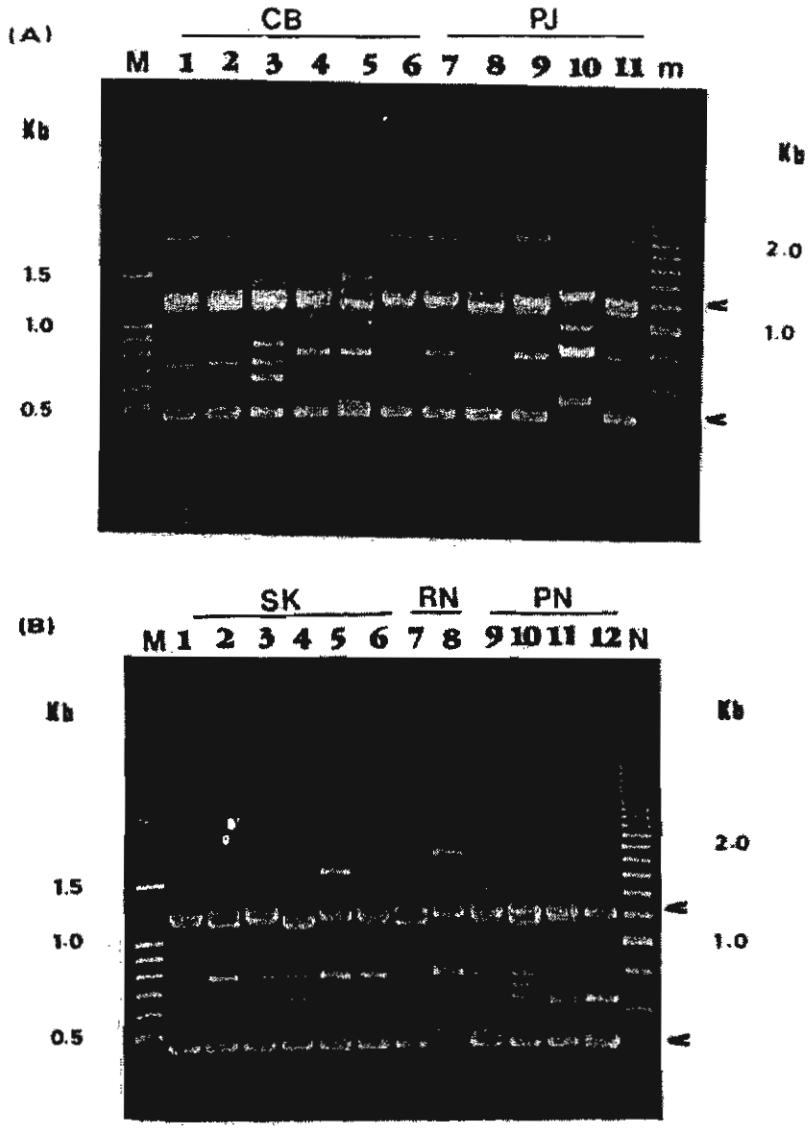
B: Lanes 1-4 = *C. belcheri* จาก จ. สงขลา

Lanes 5-7 = *C. belcheri* จาก จ. ระนอง

Lanes 8-10 = *C. belcheri* จาก จ. กระบี่

Lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladder

< แสดง species-specific markers (1650 bp, 1550 bp, 835 bp และ 600 bp) ที่พบใน *C. belcheri*



รูป 3.10 RAPD patterns ของ *C. iredalei* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB08

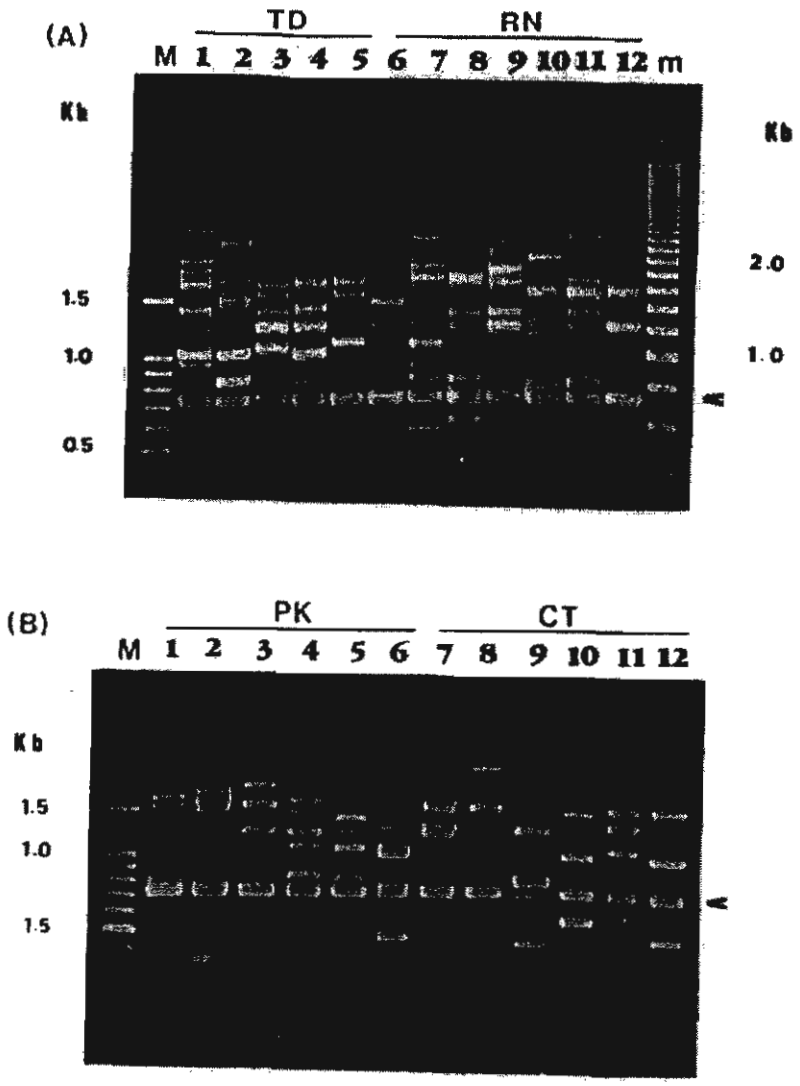
A: Lanes 1-6 = *C. iredalei* จาก จ. ชลบุรี Lanes 7-9 และ 11 = *C. iredalei* จาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ Lane 10 = *S. forskali*-like oyster จาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ (Oys30)

B: Lanes 1-6 = *C. iredalei* จาก จ. สงขลา Lane 7 = *C. iredalei* จาก จ. ระนอง

lanes 9-12 = *C. iredalei* จาก จ. พังงา Lane 8 = *C. iredalei*–like oyster จาก จ. ระนอง (Oys39) Lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladders

< แสดง species-specific markers (1250 bp และ 450 bp) ที่พบใน *C. iredalei*

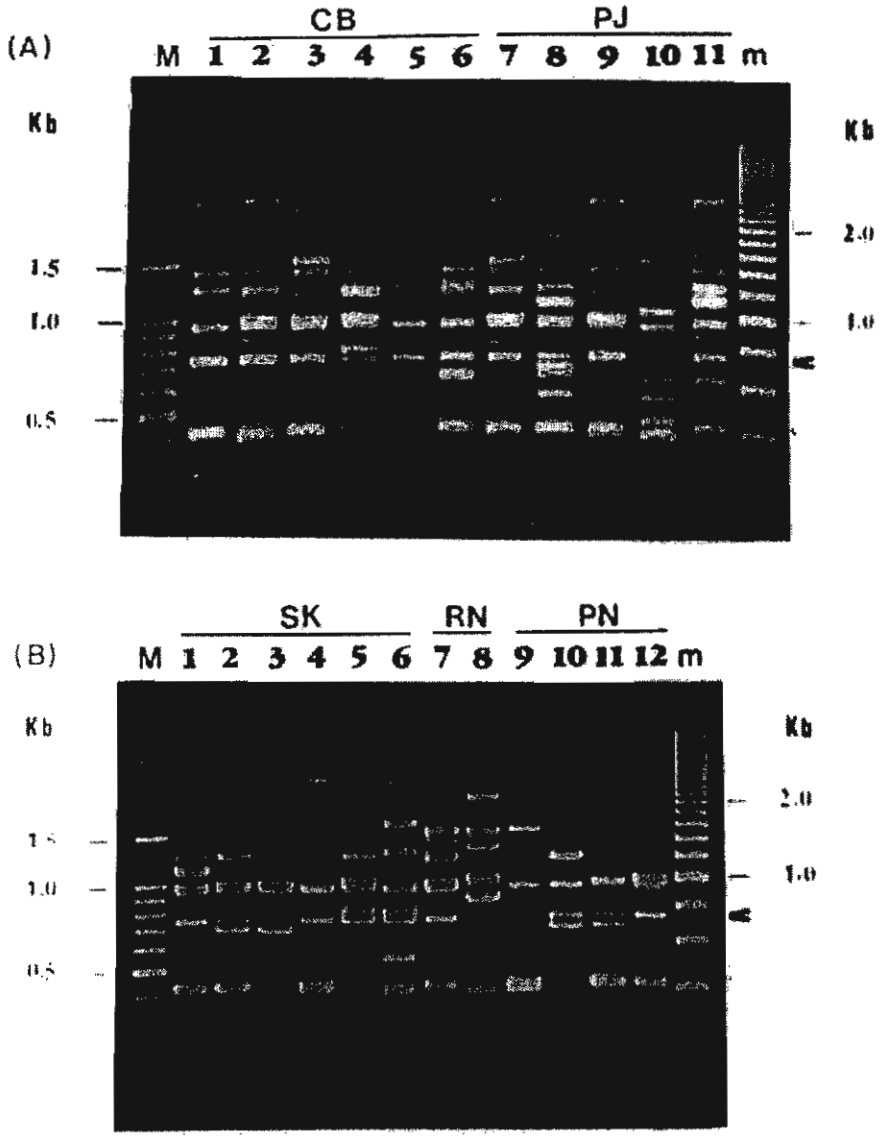
Oys30 มี mtDNA จีโนไทป์เป็น *S. forskali* (DEDCBABCDF) ในขณะที่ Oys39 มี mtDNA จีโนไทป์เป็น *C. iredalei* (BBBBAAAABC)



รูป 3.11 RAPD patterns ของ *S. cucullata* ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB08

A:	Lanes 1- 5	= *S. cucullata* จาก จ. ตราด
	Lanes 6-12	= *S. cucullata* จาก จ. ระนอง
B:	Lanes 1-6	= *S. cucullata* จาก จ. ภูเก็ต
	Lanes 7-8 และ 10-12	= *S. cucullata* จาก จ. จันทบุรี
	Lane 9	= *S. forskali* จาก จ. จันทบุรี
	Lanes M และ m	= 100 bp ladder และ 200 bp ladder

< แสดง species-specific marker (750 bp) ที่พบใน *S. cucullata*



รูป 3.12 RAPD patterns ของ *C.iredalei* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC210

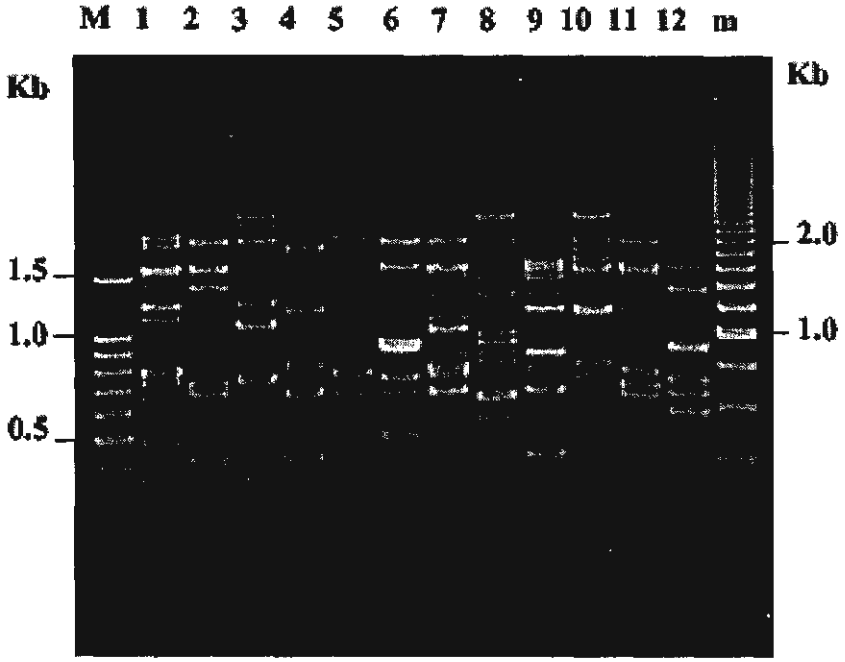
A: Lanes 1-6 = *C. iredalei* จาก จ. ชลบุรี Lanes 7-9 และ 11 = *C. iredalei* จาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ Lane 10 = *S. forskali*–like oyster จาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ (Oys30)

B: Lanes 1-6 = *C. iredalei* จาก จ. สงขลา Lane 7 = *C. iredalei* จาก จ. ระนอง

lanes 9-12 = *C. iredalei* จาก จ. พังงา Lane 8 = *C. iredalei*–like oyster จาก จ. ระนอง (Oys39) Lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladder

< แสดง species-specific marker (745 bp) ที่พบใน *C. iredalei*

Oys30 มี mtDNA จีโนไทป์เป็น *S. forskali* (DEDCBABCDF) ในขณะที่ Oys39 มี mtDNA จีโนไทป์เป็น *C. iredalei* (BBBBAAAABC)

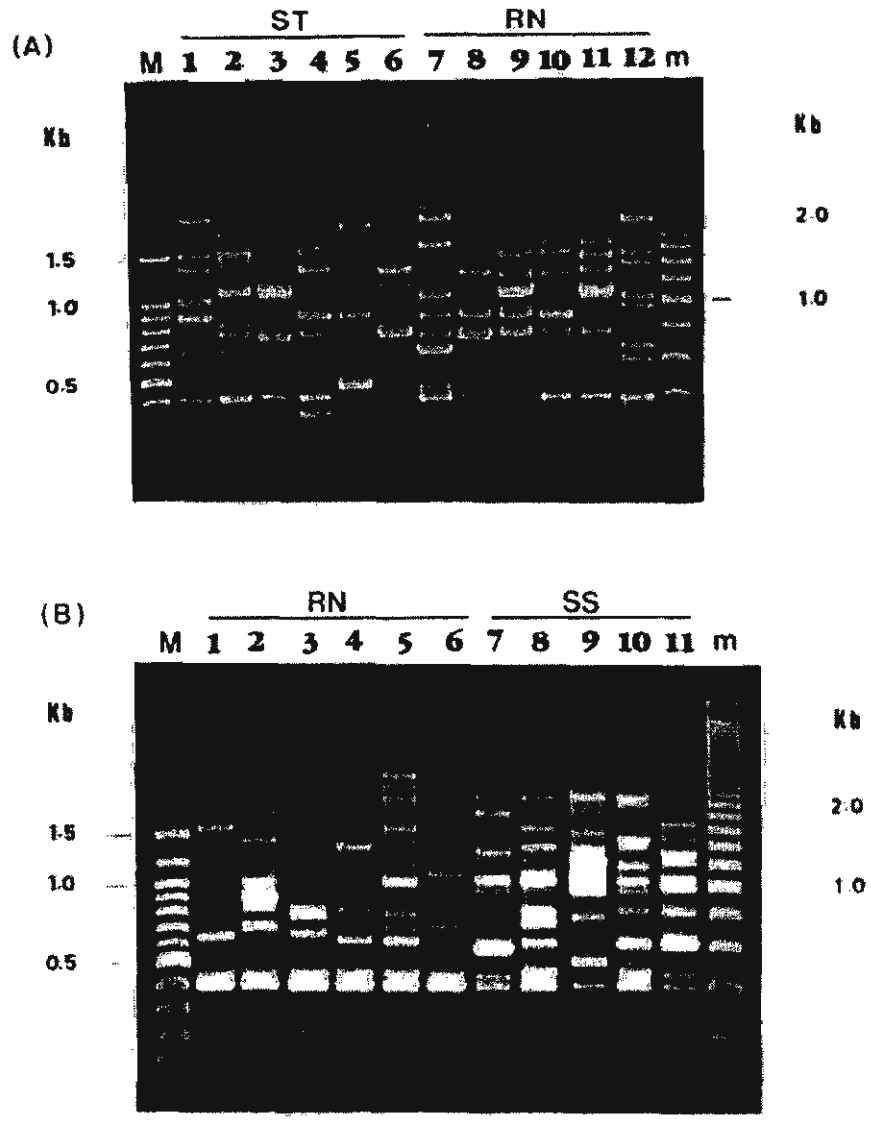


รูป 3.13 RAPD patterns ของ *S. cucullata* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC210

Lanes 1-5 = *S. cucullata* จาก จ. ตราด

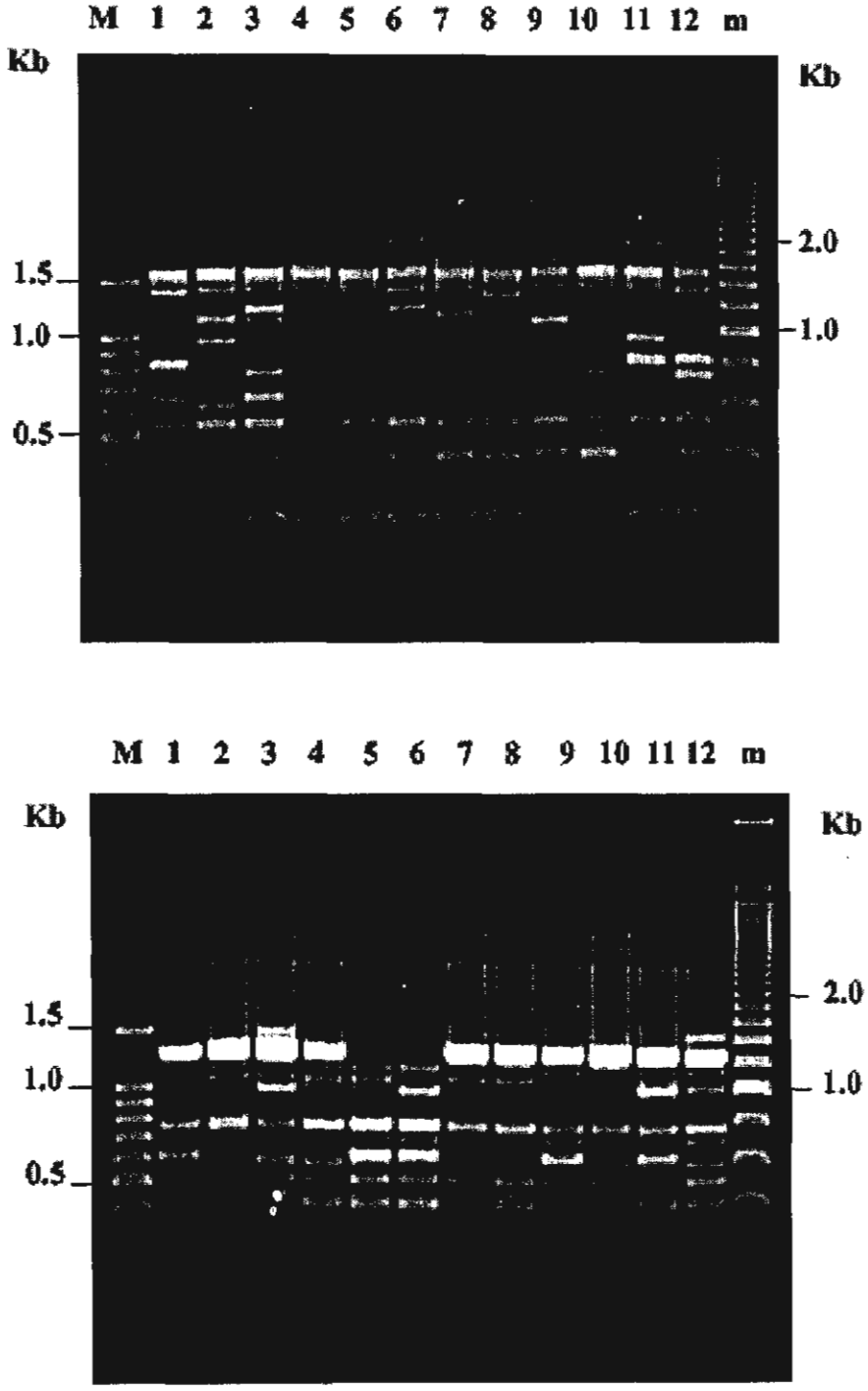
Lanes 6-12 = *S. cucullata* จาก จ. ระนอง

Lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladder



รูป 3.14 RAPD patterns ของ *S. forskali* และ *S. mytiloides* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC210

A:	Lanes 1-6	= *S. forskali* จาก จ. สตูล
	Lanes 7-12	= *S. forskali* จาก จ. ระนอง
B:	Lanes 1-6	= *S. mytiloides* จาก จ. ระนอง
	Lanes 7-12	= *S. mytiloides* จาก จ. สมุทรสาคร
	Lanes M และ m	= 100 bp ladder และ 200 bp ladder

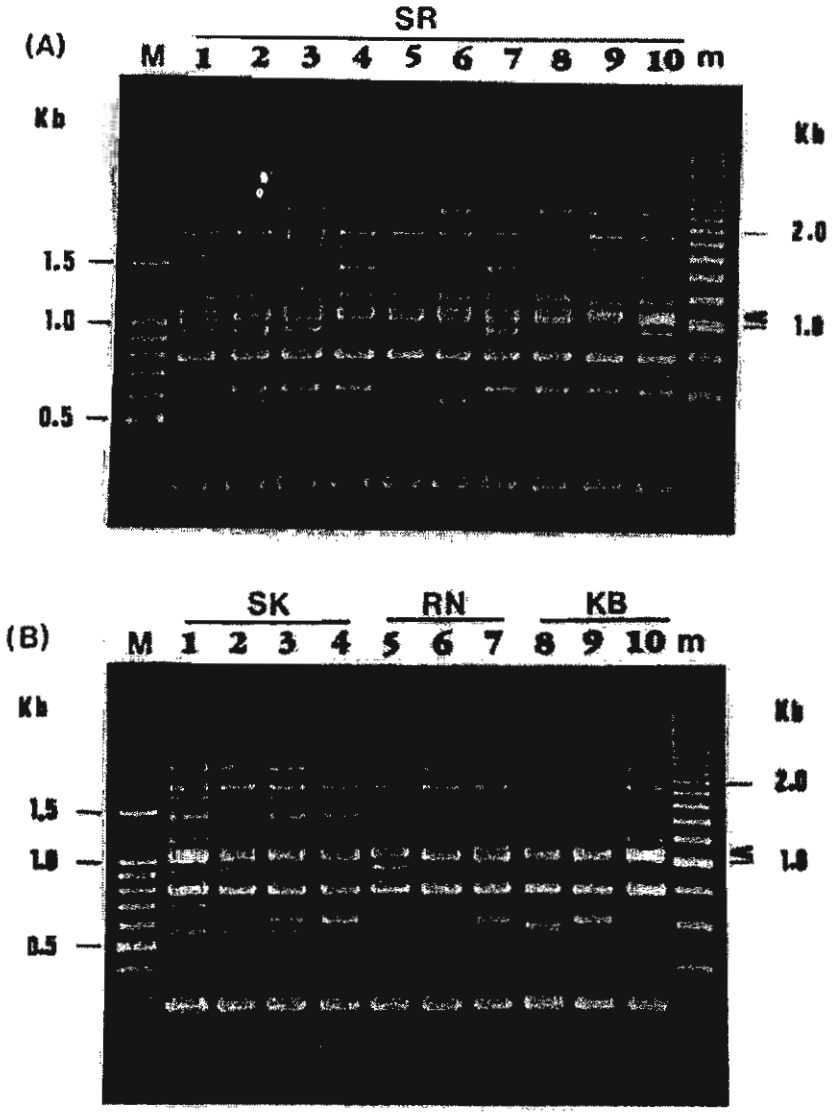


รูป 3.15 RAPD patterns ของ *S. commercialis* และ *P. viridis* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC210

A: Lanes 1-12 = *S. commercialis* จาก Brisbane ประเทศออสเตรเลีย

B: Lanes 1-12 = *P. viridis* จาก จ. ชลบุรี

Lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladder



รูป 3.16 RAPD patterns ของ *C. belcheri* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC220

A: Lanes 1-10 = *C. belcheri* จาก จ. สุราษฎร์ธานี

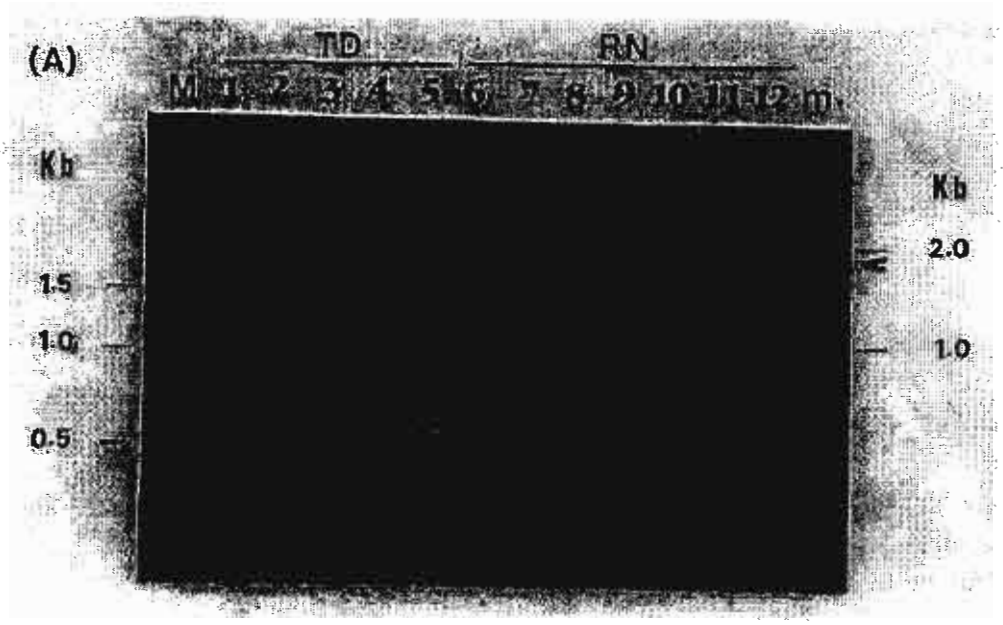
B: Lanes 1-4 = *C. belcheri* จาก จ. สงขลา

Lanes 5-7 = *C. belcheri* จาก จ. ระนอง

Lanes 8-10 = *C. belcheri* จาก จ. กระบี่

Lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladder

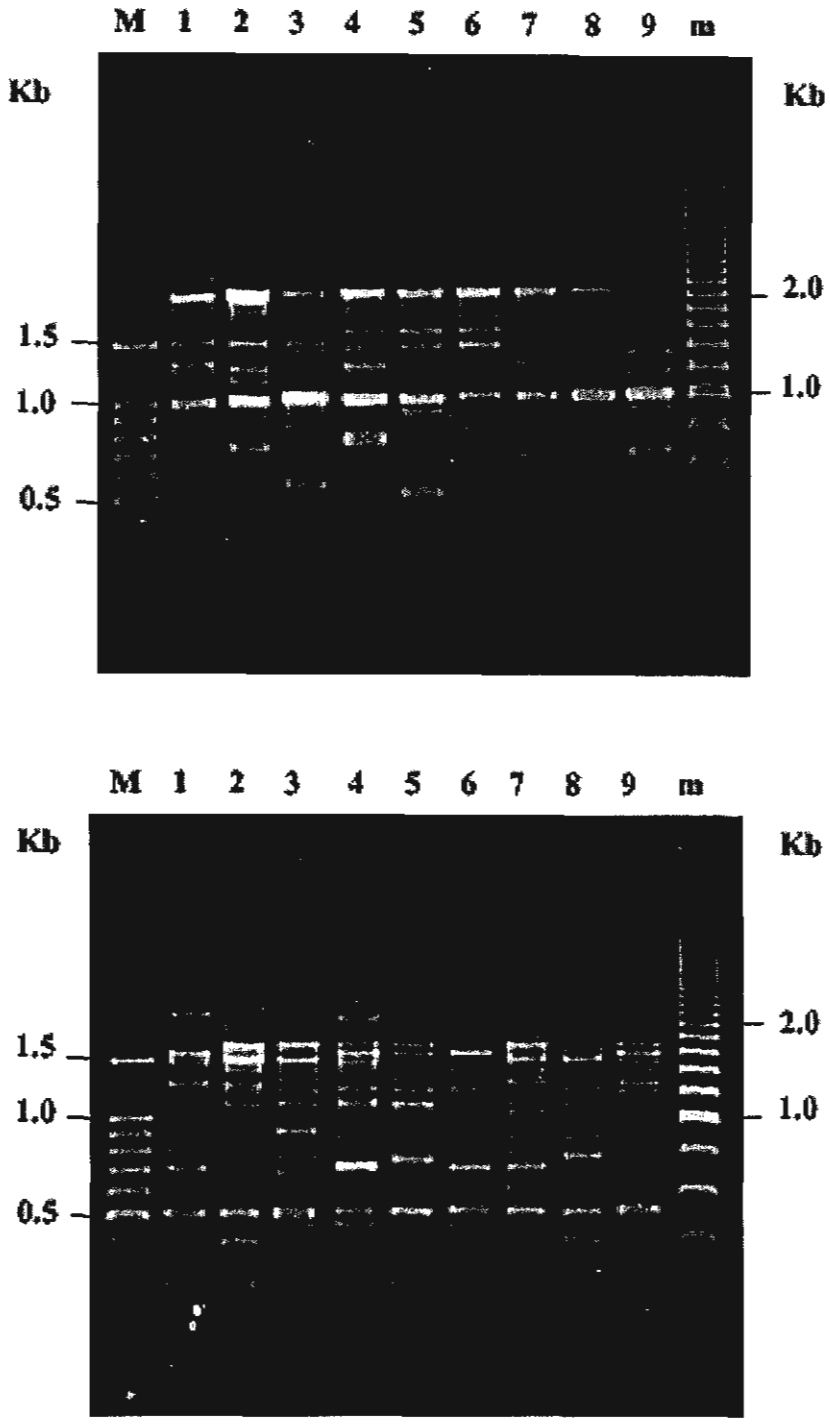
< แสดง species-specific marker (1050 bp) ที่พบใน *C. belcheri*



รูป 3.17 RAPD patterns ของ *S. cucullata* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC220

A:	Lanes 1-5	= *S. cucullata* จาก จ. ตราด
	Lanes 6-12	= *S. cucullata* จาก จ. ระนอง
B:	Lanes 1-6	= *S. cucullata* จาก จ. ภูเก็ต
	Lanes 7-8 และ 10-12	= *S. cucullata* จาก จ. จันทบุรี
	Lane 9	= *S. forskali* จาก จ. จันทบุรี
	Lanes M และ m	= 100 bp ladder และ 200 bp ladder

< แสดง species-specific marker (1800 bp) ที่พบใน *S. cucullata*

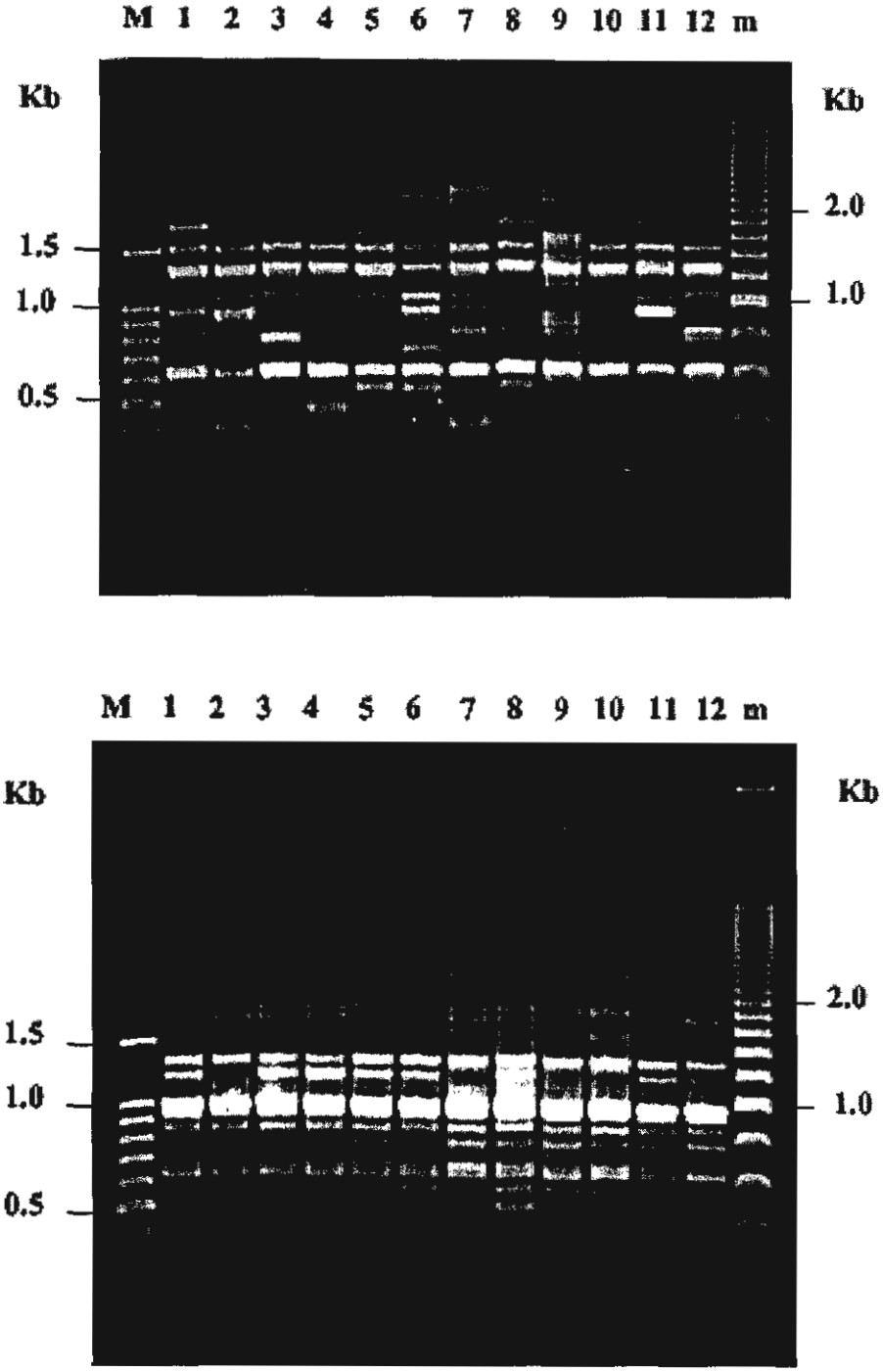


รูป 3.18 RAPD patterns ของ *Crassostrea* sp. และ *Saccostrea* sp. group 2 ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC220

A: Lanes 1-19 = *Crassostrea sp.* จาก จ. กระบี่

B: Lanes 1-129 = *Saccostrea sp.* group 2 จากเกาะหนุ่ย จ. ระนอง

Lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladder



รูป 3.19 RAPD patterns ของ *S. commercialis* และ *P. viridis* ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC220

A: Lanes 1-12 = *S. commercialis* จาก Brisbane ประเทศออสเตรเลีย

B: Lanes 1-12 = *P. viridis* จาก จ. ชลบุรี

lanes M และ m = 100 bp ladder และ 200 bp ladder

ดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity index) ของหอยนางรมในประเทศไทย

ตัวอย่างที่เก็บจากแต่ละแหล่งตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้นับเป็น operational taxonomic unit (OTU) แต่เรียกเพื่อความเข้าใจว่า geographic samples ค่า similarity index ระหว่างกลุ่มและภายในแต่ละกลุ่มตัวอย่างที่วิเคราะห์โดยใช้ 5 ไพรเมอร์แสดงใน ตาราง 3.3 ค่าเฉลี่ย similarity index ของทุกกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากไพรเมอร์ OPA09, OPB01, OPB08, UBC210 และ UBC220 คือ 0.759, 0.716, 0.792, 0.790 และ 0.790 ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ย similarity index ภายในแต่ละ geographic sample ซึ่งเฉลี่ยจากทุกไพรเมอร์มีค่าตั้งแต่ 0.487 (SfCT) ถึง 0.925 (CbRN) โดยค่า similarity index ภายในหอยนางรมสกุล *Crassostrea* มีความเหมือนทางพันธุกรรมมากกว่าภายในหอยนางรมสกุล *Saccostrea* โดยค่าเฉลี่ย similarity index ภายในกลุ่มตัวอย่างของแต่ละสปีชีส์ใน *Crassostrea* มีค่า 0.779-0.925 ในขณะที่ภายใน *Saccostrea* มีค่าเท่ากับ 0.487-0.688 และใน unidentified species (ประกอบด้วย CsKB, S1SR, S2RN และ S3SS) มีค่าระหว่าง 0.604-0.693 ค่าเฉลี่ย genetic distance ระหว่าง geographic samples ภายในสปีชีส์ในทุกไพรเมอร์ของ *C. belcheri* เท่ากับ 0.1262 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าใน *C. iredalei* (0.2657), *S. cucullata* (0.4460), *S. forskali* (0.5475) และ *S. mytiloides* (0.6069) (ตาราง 3.4)

จากการสร้าง Neighbor-joining tree โดยใช้ค่าเฉลี่ย genetic distance ระหว่างคู่ของ geographic samples พบว่าสามารถแยกหอยนางรมสกุล *Crassostrea* และ *Saccostrea* ออกจากกันอย่างชัดเจน (รูป 3.20) และพบว่า หอยนางรมทุกสปีชีส์ที่ใช้ศึกษา ยกเว้น *S. forskali* (SfSR และ SfCBS) มีลักษณะเป็น monophyletic relationships ของภายในแต่ละสปีชีส์

ที่ระดับภายในสปีชีส์ *C. belcheri* สามารถแยกตามแต่ละ coastal areas ได้ คือ ทางฝั่งอ่าวไทย (ตะวันออก) และทางฝั่ง อันดามัน (ตะวันตก) ส่วนใน *S. forskali* สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ *S. forskali* ที่มาจาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ (SfPJ) จ. สงขลา (SfSK) จ. ชลบุรี ที่ ต. อ่างศิลา (SfCBA) จ. จันทบุรี (SfCT) จ. ระนอง(SfRN) และ จ. สตูล (SfST) กลุ่มนี้แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันภายในสปีชีส์ กลุ่มที่สอง คือ *S. forskali* ที่มาจาก เกาะปราบ (จ. สุราษฎร์ธานี) และ เกาะสีชัง (จ. ชลบุรี) ซึ่งกลุ่มนี้ cluster กับ *S. mytiloides* (SmPK SmRN และ SmSS)

unknown *Saccostrea sp.* group 1 ที่มาจาก เกาะปราบ (S1SR) จ. สุราษฎร์ธานีแสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันกับ *S. forskali* (SfSR) ที่มาจากเกาะปราบเหมือนกัน

unknown *Saccostrea sp.* group 2 ที่มาจาก เกาะหนุ่ย (จ. ระนอง) นั้นแยกออกมาเป็นกิ่งใหม่ซึ่งอาจเป็น unidentified new species

ตาราง 3.3 แสดงค่า similarity indices (S) ภายในแต่ละกลุ่มของประชากรของหอยนางรม และหอยแมลงภู่ *P. viridis* โดยใช้ RAPD-PCR

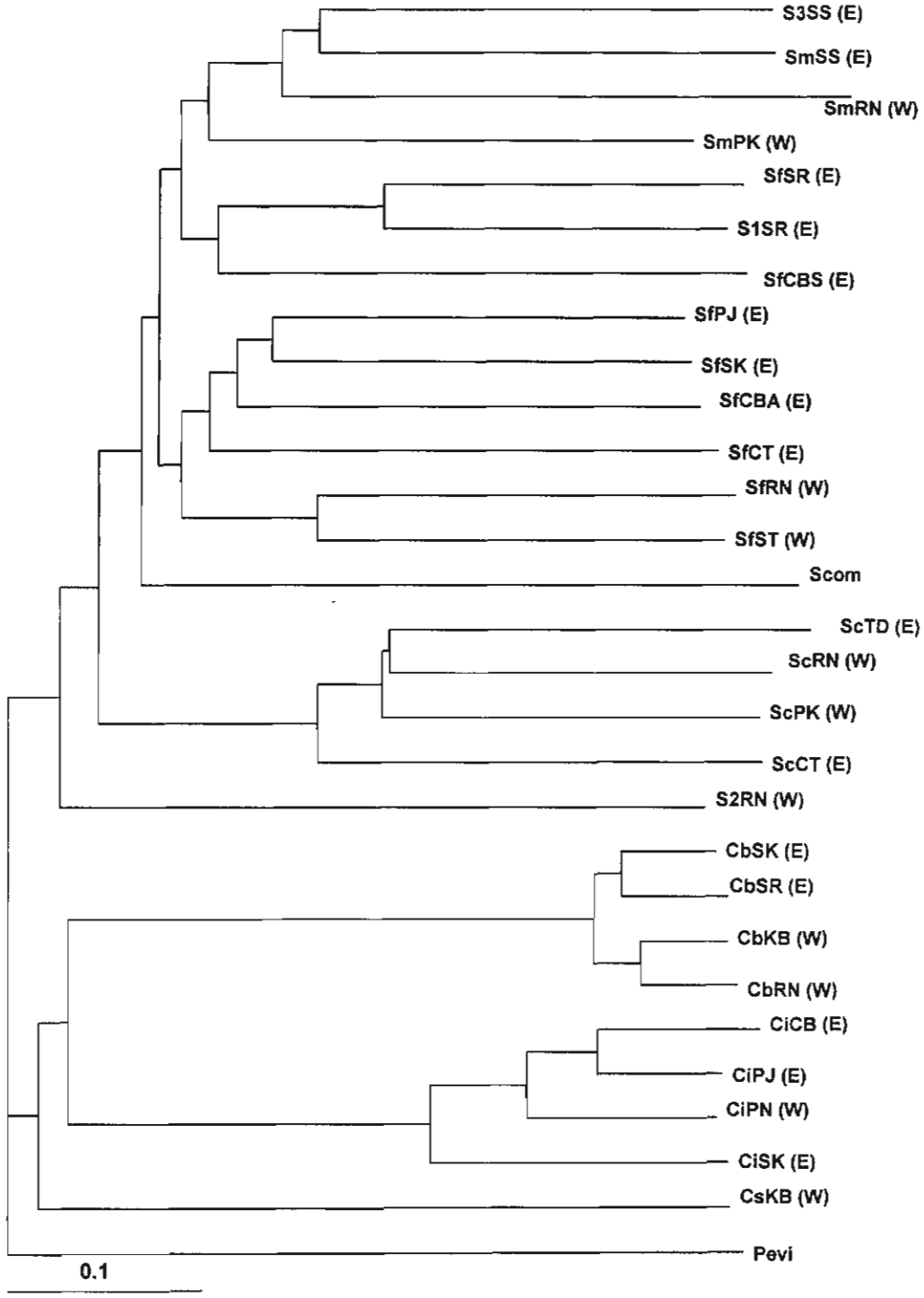
Sample	**Primer**					**Average similarity within a sample across all primers**
	OPA09	**OPB01**	**OPB08**	**UBC210**	**UBC220**	
CbSR	0.850	0.896	1.000	0.807	0.927	0.896
CbSK	0.857	0.900	1.000	0.817	0.920	0.899
CbRN	0.819	0.896	1.000	0.968	0.939	0.925
CbKB	0.698	0.932	1.000	0.891	0.944	0.893
CiCB	0.849	0.835	0.818	0.856	0.882	0.848
CiPJ	0.761	0.811	0.872	0.806	0.863	0.823
CiSK	0.667	0.833	0.871	0.784	0.885	0.808
CiPN	0.700	0.746	0.817	0.758	0.875	0.779
ScTD	0.695	0.466	0.605	0.510	0.636	0.582
ScRN	0.598	0.523	0.739	0.582	0.760	0.640
ScPK	0.682	0.377	0.803	0.696	0.825	0.676
ScCT	0.475	0.492	0.639	0.585	0.512	0.541
SfCT	0.606	0.431	0.417	0.541	0.442	0.487
SfSR	0.657	0.729	0.721	0.673	0.662	0.688
SfCBA	0.592	0.447	0.570	0.671	0.555	0.567
SfPJ	0.641	0.496	0.491	0.659	0.612	0.580
SfSK	0.617	0.428	0.571	0.676	0.643	0.587
SfST	0.560	0.573	0.716	0.600	0.542	0.598
SfRN	0.430	0.554	0.629	0.601	0.513	0.546
SfCBS	0.621	0.535	0.593	0.514	0.548	0.562
SmPK	0.592	0.536	0.452	0.676	0.536	0.558
SmRN	0.751	0.711	0.500	0.716	0.684	0.672
SmSS	0.647	0.472	0.519	0.592	0.568	0.560
CsKB	0.590	0.635	0.641	0.950	0.652	0.693
S1SR	0.736	0.623	0.668	0.629	0.558	0.643
S2RN	0.760	0.703	0.764	0.759	0.833	0.764
S3SS	0.632	0.492	0.623	0.729	0.541	0.604
Scom	0.682	0.683	0.705	0.700	0.731	0.700
Pevi	0.960	0.851	0.858	0.792	0.946	0.882
Average similarity of each primer across all samples	0.759	0.716	0.792	0.790	0.790	

ตาราง 3.4 แสดงค่า genetic distances (ข้างใต้เส้นทแยงมุม) และค่า similarity indices (S_{ij}, เหนือเส้นทแยงมุม) ระหว่างและภายในกลุ่มประชากรของหอยนางรมในประเทศไทย และหอยนางรม *S. commercialis* จากประเทศออสเตรเลีย และหอยแมลงภู่ (*P. viridis*)

	CbSR	CbSK	CbRN	CbKB	CiCB	CiPJ	CiSK	CiPN	CsKB	ScTD	ScRN	ScPK	ScCT	SfCT	SfSR
CbSR	-	0.8950	0.8720	0.8449	0.3226	0.3011	0.2997	0.3270	0.2860	0.2204	0.2303	0.2161	0.2340	0.2450	0.2310
CbSK	0.1050	-	0.8764	0.8497	0.2950	0.3054	0.3100	0.3245	0.2817	0.2291	0.2348	0.2221	0.2360	0.2614	0.2519
CbRN	0.1280	0.1236	-	0.9046	0.3012	0.3136	0.3012	0.3197	0.3161	0.2199	0.2085	0.1981	0.2243	0.2457	0.2420
CbKB	0.1551	0.1503	0.0954	-	0.3303	0.3379	0.3229	0.3430	0.3075	0.2062	0.2102	0.1890	0.2157	0.2545	0.2624
CiCB	0.6774	0.7050	0.6988	0.6697	-	0.8507	0.3950	0.7953	0.2674	0.2244	0.2468	0.2227	0.2167	0.2618	0.2629
CiPJ	0.6989	0.6946	0.6861	0.6621	0.1493	-	0.7987	0.7837	0.2768	0.2247	0.2439	0.2074	0.2192	0.2670	0.2611
CiSK	0.7003	0.6900	0.6988	0.6771	0.6050	0.2013	-	0.7825	0.2645	0.2405	0.2625	0.2330	0.2173	0.2596	0.2559
CiPN	0.6730	0.6755	0.6803	0.6570	0.2047	0.2163	0.2175	-	0.2735	0.2332	0.2535	0.2293	0.2299	0.2595	0.2784
CsKB	0.7140	0.7183	0.6839	0.6925	0.7326	0.7232	0.7355	0.7265	-	0.2686	0.2254	0.2202	0.2028	0.2658	0.2186
ScTD	0.7796	0.7709	0.7801	0.7938	0.7756	0.7753	0.7595	0.7668	0.7314	-	0.5820	0.5850	0.4939	0.2898	0.3067
ScRN	0.7697	0.7652	0.7915	0.7898	0.7532	0.7561	0.7375	0.7465	0.7746	0.4180	-	0.5962	0.5050	0.3057	0.3249
ScPK	0.7839	0.7779	0.8019	0.8110	0.7773	0.7926	0.7670	0.7707	0.7798	0.4150	0.4038	-	0.5620	0.3122	0.3174
ScCT	0.7660	0.7640	0.7757	0.7843	0.7833	0.7808	0.7827	0.7701	0.7972	0.5061	0.4950	0.4380	-	0.3180	0.2980
SfCT	0.7550	0.7386	0.7543	0.7455	0.7382	0.7330	0.7404	0.7405	0.7342	0.7102	0.6943	0.6878	0.6820	-	0.4540
SfSR	0.7690	0.7481	0.7580	0.7376	0.7371	0.7389	0.7441	0.7216	0.7814	0.6933	0.6751	0.6826	0.7020	0.5460	-
SfCBA	0.7520	0.7360	0.7490	0.7388	0.7756	0.7675	0.7816	0.7757	0.7609	0.7344	0.6870	0.6903	0.6647	0.5172	0.5399
SfPJ	0.7843	0.7645	0.7919	0.7784	0.7463	0.7385	0.7430	0.7527	0.7717	0.6970	0.6390	0.6385	0.6454	0.5136	0.5619
SfSK	0.7654	0.7546	0.7671	0.7520	0.7597	0.7351	0.7486	0.7436	0.7744	0.7034	0.6441	0.6731	0.6597	0.5261	0.6031
SfST	0.7646	0.7564	0.7783	0.7694	0.7665	0.7576	0.7024	0.7562	0.7619	0.6858	0.6761	0.6259	0.6320	0.5837	0.6158
SfRN	0.7560	0.7523	0.7692	0.7601	0.7655	0.7634	0.7592	0.7581	0.7571	0.6999	0.6793	0.6387	0.6408	0.5774	0.6289
SfCBS	0.7413	0.7420	0.7675	0.7568	0.7597	0.7659	0.7821	0.7525	0.7477	0.7188	0.6726	0.6660	0.6712	0.5948	0.5548
SmPK	0.7285	0.7160	0.7250	0.7280	0.7474	0.7363	0.7556	0.7294	0.7030	0.6961	0.6721	0.6662	0.6655	0.5353	0.5338
SmRN	0.7567	0.7467	0.7718	0.7623	0.7870	0.7931	0.8085	0.7821	0.7708	0.5647	0.7568	0.7331	0.7028	0.7102	0.6786
SmSS	0.7555	0.7454	0.7646	0.7570	0.7548	0.7493	0.7516	0.7472	0.7179	0.5657	0.7156	0.7006	0.6850	0.6913	0.5924
S1SR	0.7551	0.7512	0.7779	0.7584	0.7454	0.7528	0.7517	0.7218	0.7919	0.5337	0.7058	0.7028	0.6868	0.7028	0.5614
S2RN	0.6967	0.6996	0.6931	0.7200	0.7248	0.7098	0.7305	0.7477	0.7451	0.6628	0.6934	0.6875	0.7455	0.7036	0.6758
S3SS	0.7748	0.7648	0.7873	0.7701	0.7487	0.7588	0.7656	0.7516	0.7673	0.5733	0.7086	0.6633	0.6683	0.6763	0.6010
Scom	0.7642	0.7499	0.7665	0.7477	0.7738	0.7533	0.7068	0.7633	0.7447	0.6513	0.7398	0.7312	0.7135	0.7095	0.6505
Pevi	0.7496	0.7535	0.7645	0.7791	0.7412	0.7500	0.7456	0.7431	0.7597	0.7518	0.7757	0.7627	0.7467	0.7482	0.7750

ตาราง 3.4 (ต่อ)

	SfCBA	SfPJ	SfSK	SfST	SfRN	SfCBS	SmPK	SmRN	SmSS	S1SR	S2RN	S3SS	Scom	Pevi
CbSR	0.2480	0.2157	0.2346	0.2354	0.2440	0.2587	0.2715	0.2433	0.2445	0.2449	0.3033	0.2252	0.2358	0.2504
CbSK	0.2640	0.2355	0.2454	0.2436	0.2477	0.2580	0.2840	0.2533	0.2546	0.2488	0.3004	0.2352	0.2501	0.2465
CbRN	0.2510	0.2081	0.2329	0.2217	0.2308	0.2325	0.2750	0.2282	0.2354	0.2221	0.3069	0.2127	0.2335	0.2355
CbKB	0.2612	0.2216	0.2480	0.2306	0.2399	0.2432	0.2720	0.2377	0.2430	0.2416	0.2800	0.2299	0.2523	0.2209
CiCB	0.2244	0.2537	0.2403	0.2335	0.2345	0.2403	0.2526	0.2130	0.2452	0.2546	0.2752	0.2513	0.2262	0.2588
CiPJ	0.2325	0.2615	0.2649	0.2424	0.2366	0.2341	0.2637	0.2069	0.2507	0.2472	0.2902	0.2412	0.2467	0.2500
CiSK	0.2184	0.2570	0.2514	0.2976	0.2408	0.2179	0.2444	0.1915	0.2484	0.2483	0.2695	0.2344	0.2932	0.2544
CiPN	0.2243	0.2473	0.2564	0.2438	0.2419	0.2475	0.2706	0.2179	0.2528	0.2782	0.2523	0.2484	0.2367	0.2569
CsKB	0.2391	0.2283	0.2256	0.2381	0.2429	0.2523	0.2970	0.2292	0.2821	0.2081	0.2549	0.2327	0.2553	0.2403
ScTD	0.2656	0.3030	0.2966	0.3142	0.3001	0.2812	0.3039	0.4353	0.4343	0.4663	0.3372	0.4267	0.3487	0.2482
ScRN	0.3130	0.3610	0.3559	0.3239	0.3207	0.3274	0.3279	0.2432	0.2844	0.2942	0.3066	0.2914	0.2602	0.2243
ScPK	0.3097	0.3615	0.3269	0.3741	0.3613	0.3340	0.3338	0.2669	0.2994	0.2972	0.3125	0.3367	0.2688	0.2373
ScCT	0.3353	0.3546	0.3403	0.3680	0.3592	0.3288	0.3345	0.2972	0.3150	0.3132	0.2545	0.3317	0.2865	0.2533
SfCT	0.4828	0.4864	0.4739	0.4163	0.4226	0.4052	0.4647	0.2898	0.3087	0.2972	0.2964	0.3237	0.2905	0.2518
SfSR	0.4601	0.4381	0.3969	0.3842	0.3711	0.4452	0.4662	0.3214	0.4076	0.4386	0.3242	0.3990	0.3495	0.2250
SfCBA	-	0.5216	0.5244	0.4462	0.4658	0.4144	0.4498	0.3306	0.3442	0.6331	0.3271	0.3566	0.3102	0.2676
SfPJ	0.4784	-	0.5663	0.4795	0.4728	0.3984	0.4694	0.3370	0.3988	0.4351	0.3405	0.3034	0.3631	0.2514
SfSK	0.4756	0.4337	-	0.4700	0.4555	0.4426	0.4621	0.3700	0.4234	0.4156	0.3261	0.4330	0.3603	0.2203
SfST	0.5538	0.5205	0.5300	-	0.5692	0.3962	0.3965	0.3446	0.4270	0.4060	0.3228	0.4250	0.3645	0.2296
SfRN	0.5342	0.5272	0.5445	0.4308	-	0.4109	0.3911	0.3291	0.3743	0.4268	0.3134	0.4125	0.3522	0.2325
SfCBS	0.5856	0.6016	0.5574	0.6038	0.5891	-	0.4398	0.3139	0.3612	0.4090	0.2965	0.3882	0.3718	0.2143
SmPK	0.5502	0.5306	0.5379	0.6035	0.6089	0.5602	-	0.3519	0.3804	0.4641	0.2975	0.4127	0.3462	0.2641
SmRN	0.6694	0.6630	0.6300	0.6554	0.6709	0.6861	0.6481	-	0.4469	0.3672	0.2630	0.4137	0.3549	0.2488
SmSS	0.6558	0.6012	0.5766	0.5730	0.6257	0.6388	0.6196	0.5531	-	0.3797	0.2161	0.2982	0.2760	0.2488
S1SR	0.3669	0.5649	0.5844	0.5940	0.5732	0.5910	0.5359	0.6328	0.6203	-	0.3088	0.4480	0.3192	0.2158
S2RN	0.6729	0.6595	0.6739	0.6772	0.6866	0.7035	0.7025	0.7370	0.7239	0.6912	-	0.5269	0.3536	0.2433
S3SS	0.6434	0.6966	0.5670	0.5750	0.5875	0.6118	0.5873	0.5863	0.7018	0.5520	0.4731	-	0.3517	0.2716
Scom	0.6898	0.6369	0.6397	0.6355	0.6478	0.6282	0.6538	0.6451	0.7240	0.6808	0.6464	0.6483	-	0.1954
Pevi	0.7324	0.7486	0.7797	0.7704	0.7675	0.7853	0.7359	0.7512	0.7512	0.7842	0.7567	0.7284	0.8046	-



รูป 3.20 แผนภูมิ Neighbor-joining tree สร้างจากค่าเฉลี่ยของ genetic distance ระหว่างกลุ่มประชากรในแต่ละสปีชีส์ ที่ได้จาก 5 ไพรเมอร์ คือ OPA09 OPB01 OPB08 UBC210 และ UBC220 คำย่อและรายละเอียดของตัวอย่างแสดงในตาราง 2.1

ส่วนใน *Saccostrea sp.* group 3 ซึ่งจากผลได้แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันกับ *S. mytiloides* (SmSS) ที่มาจากที่เดียวกันดังนั้น *Saccostrea* sp. group 3 น่าจะเป็น *S. mytiloides*

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ 5 ไพรเมอร์ OPA09 OPB01 OPB08 UBC210 และ UBC220 สามารถจำแนก *C. belcheri*, *C. iredalei* และ *S. cucullata* โดยใช้ species-specific markers แต่ใน *S. forskali* และ *S. mytiloides* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก และไม่พบ species-specific marker ใน 2 สปีชีส์นี้ จึงไม่สามารถแยก 2 สปีชีส์ นี้ได้

เครื่องหมายทางพันธุกรรม RAPD ที่จำเพาะต่อสปีชีส์ของหอยนางรมในประเทศไทย

ไพรเมอร์ OPA09, OPB01, OPB08, UBC210 และ UBC220 สามารถให้ RAPD fragments ที่ fixed frequency ในอย่างน้อย 1 สปีชีส์ (ตาราง 3.5 รูปที่ 3.2-3.19) ไพรเมอร์ OPB08ให้ species-specific markers ในหอยนางรมที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ของไทยทั้ง 3 สปีชีส์ คือ ใน *C. belcheri* ให้ RAPD markers ขนาด 1650 bp 1550 bp 835 bp และ 600 bp ใน *C. iredalei* ให้ RAPD markers ขนาด 1250 bp และ 450 bp และใน *S. cucullata* ให้ RAPD markers ขนาด 750 bp ไพรเมอร์ OPA09 และ OPB01 ให้ RAPD markers ที่จำเพาะใน *C. belcheri* (250 bp จากไพรเมอร์ OPA09 และ 2100 bp, 1400 bp, 1250 bp และ 650 bp จากไพรเมอร์ OPB01 ตามลำดับ) และใน *C. iredalei* (1150 bp และ 700 bp จากไพรเมอร์ OPA09 และ OPB01 ตามลำดับ)ไพรเมอร์ UBC210 ให้ RAPD marker ที่จำเพาะใน *C. iredalei* ที่มีขนาด 745 bp ไพรเมอร์ UBC220 ให้ RAPD markers ที่จำเพาะใน *C. belcheri* ขนาด 1050 bp และ *S. cucullata* ขนาด 1800 bp ส่วนใน *S. forskali* และ *S. mytiloides* ไม่พบ species-specific markers ในทั้ง 2 สปีชีส์ และไม่พบ population-specific markers ในหอยนางรมสปีชีส์ใดๆ

การ Clone ชิ้น RAPD markers ที่จำเพาะต่อ *C. belcheri*

ผลจากการโคลน RAPD markers ที่จำเพาะใน *C. belcheri* ด้วยวิธี *Bam*HI-sticky end adaptor method หรือ T-A cloning และทำการตรวจหา insert ใน recombinant clones โดยการ digestion ด้วย *Bam*HI สำหรับ 600 bp และ 835 bp inserts และการdigestionด้วย *Eco*RI สำหรับ 650 bp insert และวิเคราะห์ใน 1.0% agarose gel electrophoresis (รูปที่ 3.21) โดย recombinant clones ที่มีชิ้น insert ขนาด 650 bp 835 bp และ 600 bp โดยให้ชื่อว่า pPACB1, pPACB2 และ pPACB3 ตามลำดับ

และเมื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ recombinant clones ทั้ง 2 directions ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้แสดงในรูป 3.22 โดยขนาดของชิ้น insert ใน pPACB1, pPACB2 และ pPACB3 เท่ากับ 637 bp, 811 bp และ 563 bp ตามลำดับ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเทียบความเหมือนใน GenBank ไม่พบว่ามีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในสิ่งมีชีวิตที่เคยมีรายงานใน GenBank

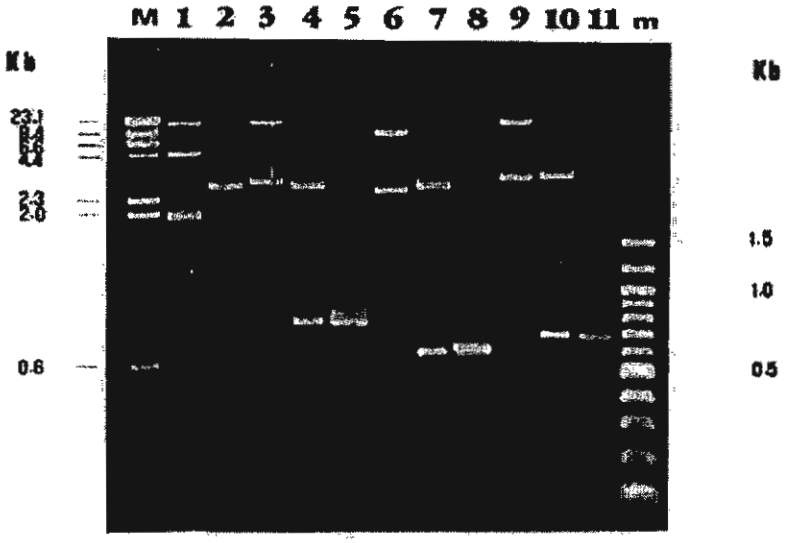
เมื่อออกแบบแต่ละคู่ของไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละ insert และนำมาทำ PCR โดยใช้ DNA ของ *C. belcheri* (ตาราง 3.6) ขนาดของ PCR product ที่ได้ให้ผลเหมือนกับที่คาดไว้ คือ มีขนาดประมาณ 536 bp 600 bp และ 506 bp ตามลำดับ และพบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 3 markers นี้แสดงลักษณะที่เป็น homozygote ในทุกตัวอย่างของ *C. belcheri* ที่ได้ศึกษา

ผลของการทดสอบ sensitivity ของแต่ละคู่ของไพรเมอร์ โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น DNA template ของ *C. belcheri* (25 ng 12.5 ng 6.25 ng 3.125 ng 1 ng 500 pg 250 pg 100 pg 65 pg 32.5 pg และ 16.25 pg ตามลำดับ) พบว่าทั้ง 3 คู่ของไพรเมอร์ สามารถตรวจ DNA ได้ถึงประมาณ 30 pg (รูป 3.23)

และผลจากการนำคู่ของไพรเมอร์ pPACB1 F/R มาใช้ตรวจความจำเพาะกับ *C. belcheri* พบว่า ไพรเมอร์คู่นี้สามารถให้ PCR product ขนาด 536 bp ได้เฉพาะใน *C. belcheri* ทุกตัวที่ใช้ศึกษาเท่านั้น และไม่พบในหอยชนิดอื่นๆ ที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ (รูป 3.24)

ตาราง 3.5 เครื่องหมายทางพันธุกรรม RAPD ที่จำเพาะต่อสปีชีส์ของหอยนางรมที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ของไทย ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD-PCR

Species	Primer	RAPD marker
C. belcheri	OPA09	250 bp
	OPB01	2100 bp, 1400 bp, 1250 bp and 650 bp
	OPB08	1650 bp, 1550 bp, 835 bp and 600 bp
	UBC220	1050 bp
C. iredalei	OPA09	1150 bp
	OPB01	700 bp
	OPB08	1250 bp and 450 bp
	UBC210	745 bp
S. cucullata	OPB08	750 bp
	UBC220	1800 bp



รูป3.21 แสดงการตรวจสอบชิ้น DNA inserts ของ 3 recombinant clones (pPACB1, pPACB2 และ pPACB3) บน 1.0% agarose gel electrophoresis

Lane M = λ / *Hin*dIII
Lane 1 = undigested pUC18 vector
Lane 2 = pUC18 ที่ตัดด้วย *Bam*HI
Lane 3 = undigested pPACB2
Lane 4 = pPACB2 ที่ตัดด้วย *Bam*HI
Lane 5 = a 835 bp eluted fragment
Lane 6 = undigested pPACB3
Lane 7 = pPACB3 ที่ตัดด้วย *Bam*HI
Lane 8 = a 600 bp eluted fragment
Lane 9 = undigested pPACB1
Lane 10 = pPACB1 ที่ตัดด้วย *Eco*RI
Lane 11 = a 650 bp eluted fragment
Lane m = a 100 bp DNA ladder

(A) pPACB1

```
ATGTAATTTC AACACGACAA AATCAGTGTT GATTTAAAAT ATATTGTTTT 50
                          pPACB1-F
TTACGGCGTT GCGCTAATGC TTGGCAGCCT TCTAGCAATC GTCTGCATTG 100

CAAATCGTCC AAAAATTCAT GCTCTGCACC GCCTTCTAAC TGTGCATAAG 150

AAACGAGTTC CATAAATTAT TAAAAATATT TCAAGATTTT TATTCCATTT 200

ATTCAACTTA ATTGTGTACA AAAAATCCAA CTTTGTCTCC CTGATTATTA 250

ACAACTCATT GCATAAGAAT AAATTTGCTT AATCAAGAAA TGGCGGATGA 300

ATACGATAAT GTGTAAAAAA ATTCACCAAA TATTATTTTC GTTTATCGCC 350

TATATTTTAT TTGGAGACCA TGCCCGACGG AAATAAAATT TAACACTTAA 400

ATTCAATTGT TATTGGGCAC GGTCTCCAAA ATAAATGTAA GCGATAAACG 450

TATCTAGTGT TTTTGTTGCA ATAGGTAAAC ATGATATAGA TACGGCAGAT 500

CAATTCATGC ACGTAGTGTG GATTCATACC ATGACTATTA GTATAGAAAT 550

TCAAATTAAT GATATCTATA TAAAAGAAAA TGTCTTGTTA ACGCTGTAAA 600
  pPACB1-R
ACTTTGATGC ATTGTGTATG TGAATATCAT ACCGAGA               637
```

(B) pPACB2

```
GATAGCAAAA GTTGACCAAG TGTGATACTC GGATACACTT GGATCCCATT 50

ATAAAATTGT TAAAGAGATT TAAAATACTC TGCATTGGAA GCAATTTGCA 100

GGATTTACGT ACATCAAAAA ATTACATCCA ACAGAATTTA GATTGACACA 150
pPACB2-F
CTCGCACACA ACCGTTCCTT GAAAACGTCA TGAATTATTG CTCGCATATT 200

AAGACAGAAA TATTTAACTT AATTGCACAA CACAAATTAA AAGGATGGCC 250

TACTTTATTA TTTCATACCT GGTTTAGAAG TATCGTTCAC CCTGGGCTCA 300

GATACACAGA GTACATGTGG ACACAGCAAG AAGAGAAGAA ATATCGATAA 350

TCGTCCATAA TAATCATAGG CTGGGGCCAT GTCAGGCGAT ATGAGAAGTT 400

GACTTTCAGA CGTTAAATCC AAGAACTCTA GTCATCACTT AAGCACAAGA 450

CACACACCAT AACCATTCTG TAGGTTACAA AATCAAACAC GGGAATATTG 500

ATGGCCGGTG TGTAAAAATG ATCGGACAGT TATATTTCCT CGTCGAATAA 550

TGACCAGTAG TGTTGGCATA TAGTTAGCAT GCGTGTTAAG TTTTGAGTAA 600

CCAAAAGGCA AAGTCGCGTG AAATAGCGTT ATATACAGAA TTTACCTGGA 650

GGCTACAGTA GTCGCCGTGT TACGCTTGGT TGCAAGTAGG TACGGCCAAT 700
                          pPACB2-R
ACAGTTATAC AGATCTTTTC ACCTGAGGAT TCGCTGTTTT TCACTTTTAA 750

TCAGATGATA TCATTTATAT CGGATCTGAC ACAGGTAAAC TGGTTTCGCC 800

AAGTCACCAG G                                           81
```

รูป 3.22 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA insert ของ pPACB1 (A) pPACB2 (B) และ pPACB3 (C) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้และทำตัวหนาแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์

pPACB1-F, pPACB2-F และ pPACB3-F = *C. belcheri*-specific forward primers

pPACB1-R, pPACB2-R และ pPACB3-R = *C. belcheri*-specific reverse primers

(C) pPACB3

```
                  pPACB3-F
AAATATTCAC ATTATGCTAA ATGAAAACTC CGCAAAGCAT TTCCAGATTG 50

CAGATAACTG AATAAAAAAG ACTATTCAAA ATAGAATAGC ATGTAAAATA 100

AATAATTTAA TTGAAAACCT TACCGCCGAC ATCATTTTCT GTTACCAAAT 150

CCGTTTTTGT TTTGTTTTGT GAATATACAG AACTCTGAGA ACTGAGAGCA 200

TAAATAATTC CTGTGATTTG TAAATGATCA AGTGTCATAT TGAGTGATCA 250

AAACGTCCCT GTGTCCTGTC AGAATCAATT TAGGACGATG GGTCGGGACG 300

AACACCCATA ACAATCAGGG CCCCGCGTGC ACACCCCCGG GGTGACATTA 350

ATTGTATAAT ATATGATGGG CCTGCTGACT GTAATTCTTT CTTGTGGGTC 400

AATTCAAGGG ACATAATTGT AGCAGGGGAT TAGGGACAAC AGAGCACAAA 450

ATAGAATAAA ATTACAGACA TGAAAAGACA TAAAGATGTT TTTTTATCTG 500
                  pPACB3-R
TTATGTGTTA AGAAGCGTTG TTAAATTACG TGAATTACAA TGGAATTGAT 550

TTAAAAGTTA AAG                                         563
```

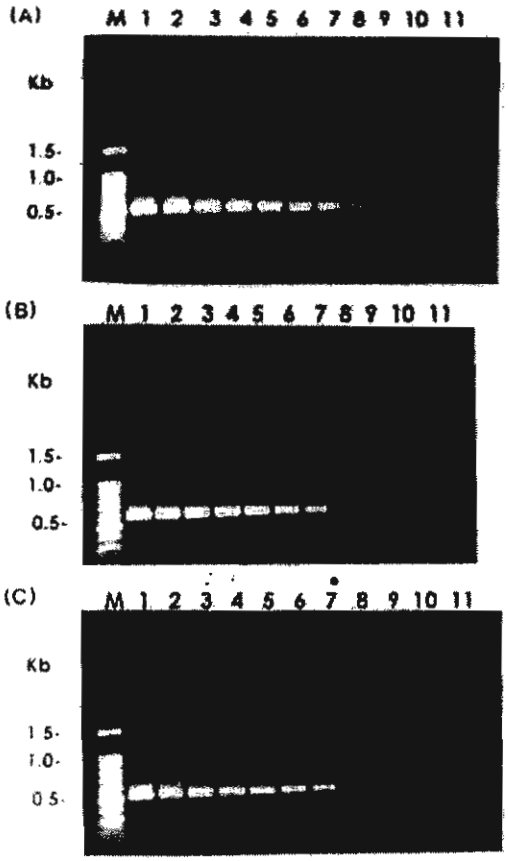
รูป 3.22 (ต่อ) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA insert ของ pPACB1 (A) pPACB2 (B) และ pPACB3 (C) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้และทำตัวหนาแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์

pPACB1-F, pPACB2-F และ pPACB3-F = *C. belcheri*-specific forward primers

pPACB1-R, pPACB2-R และ pPACB3-R = *C. belcheri*-specific reverse primers

ตาราง 3.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. belcheri*-specific primers ที่ออกแบบมาจากแต่ละ recombinant clone

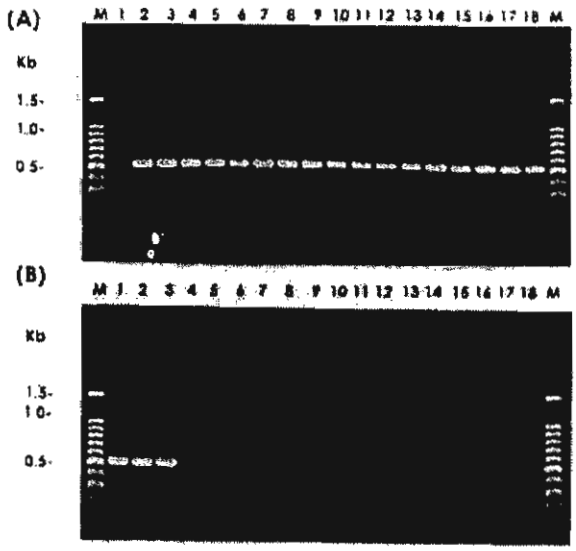
โคลน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์
pPACB1	Forward primer : 5′- **CAG CCT TCT AGC AAT CGT CT** -3′
(650 bp insert)	Reverse primer : 5′- **GCA TCA AAG TTT TAC AGC GTT** -3′
pPACB2	Forward primer : 5′- **CAC TCG CAC ACA ACC GTT CC** -3′
(835 bp insert)	Reverse primer : 5′- **AAA GTG AAA AAC AGC GAA TCC**-3′
pPACB3	Forward primer : 5′- **CTA AAT GAA AAC TCC GCA AA**-3′
(600 bp insert)	Reverse primer : 5′- **AAC AAC GCT TCT TAA CAC ATA**-3′



รูป 3.23 แสดงการทดสอบ sensitivity ของไพรเมอร์ pPACB1-F/R (A), pPACB2-F/R (B) และ pPACB3-F/R (C) โดยการแปรเปลี่ยนความเข้มข้น DNA ของ *C. belcheri*

Lanes 1-11 = PCR product ที่ได้จากความเข้มข้น DNA ของ *C. belcheri* ตั้งแต่ 25 ng, 12.5 ng, 6.25 ng, 3.125 ng, 1 ng, 500 pg, 250 pg, 100 pg, 65 pg, 32.5 pg และ 16.25 pg ตามลำดับ

Lane M = 100 bp ladder



รูป 3.24 แสดงการตรวจความจำเพาะแต่ละคู่ของไพรเมอร์ pPACB1-F/R ต่อ *C. belcheri* ที่มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 536 bp

A: Lane 1 = negative control (ไม่มี DNA ของ *C. belcheri*) Lanes 2-18 = *C. belcheri*

B: Lanes 1-3 = *C. belcheri* Lanes 4-6 = *C. iredalei*

Lanes 7-9 = *S. cucullata* Lanes 10-12 = *S. mytiloides*

Lanes 13-14 = *S. foskali* Lanes 15-16 = *S. commercialis*

Lanes 17-18 =*P. viridis*

Lanes M = 100 bp ladder

Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

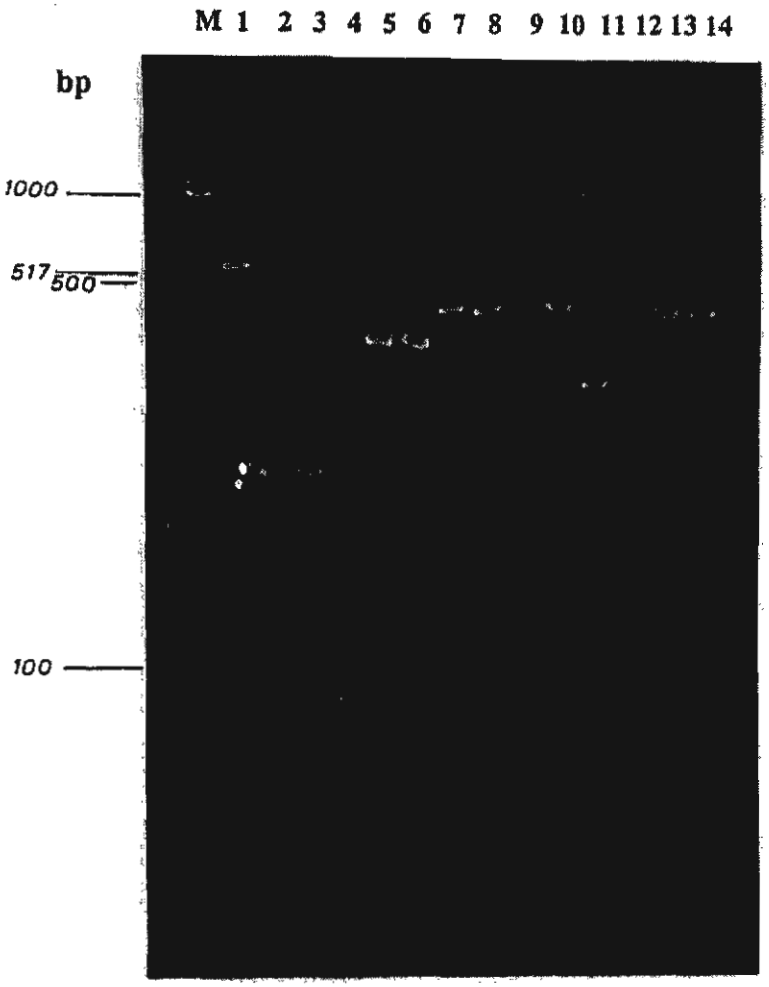
จากการทำ restriction analysis ของ 16S rDNA, 18S rDNA และ COI ด้วย restriction enzymes ชนิดต่างๆ (ตาราง 3.7 และรูป 3.25-3.34) พบ restriction patterns จำนวนทั้งสิ้น 90 แบบ (single haplotypes) ซึ่ง 46 haplotypes มาจาก ยีน 16S DNAที่ย่อยด้วย *Acs* I, *Alu* I, *Dde* I, *Dra* I, *Rsa* I และ *Taq* I จำนวน 12, 12, 9, 6, 4 และ 3 haplotypes ตามลำดับ เมื่อทำการย่อย ยีนCOI ด้วย *Acs* I,, *Dde* I และ *Mbo* I พบจำนวน restriction patternsจำนวน 6, 13 และ 22 haplotypes ตามลำดับ

เมื่อทำการย่อย 18S rDNA ด้วย *Hin* fI จะพบ restriction patterns จำนวน 3 แบบ (haplotypes) โดยรูปแบบ A พบในหอยนางรมสกุล *Crassostrea* ส่วน B พบในหอยนางรมสกุล *Saccostrea* ที่เหลือทั้งหมด โดย haplotype C พบในหอยแมลงภู่ ดังนั้นจึงสามารถใช้เครื่องหมายพันธุกรรมนี้ตรวจสกุลของวัยอ่อนหอยนางรมซึ่งยังไม่พัฒนา chromata ได้ (ตาราง 3.8) จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถสร้าง molecular taxonomic key ของ *C. belcheri*, *C. iredalei* และ *S. cucullata* ได้ (ตาราง 3.9)

เมื่อนำ single haplotypes (restriction patterns) ที่ได้มาสร้าง commposite haplotypes พบจำนวน composite haplotypes ทั้งหมด 54 แบบ (ไม่รวม composite haplotypes LV, LVI และ LVII ซึ่งจะพบในหอยนางรมที่มีปัญหาทางอนุกรมวิธาน) (ตารางที่ 3.10) โดยcomposite haplotypes I (AAAAAAAAAA), II (AAAAAAAAAB) และ III (AABAAAAAAA) พบเฉพาะใน *C. belcheri* ในขณะที่ composite haplotypes IV (BBBBACAABC), V (BBBBAAAABC) และ VI (BBBBAAAABU) พบใน *C. iredalei* เท่านั้น และพบ composite haplotypes VII (CDCCBBBBCD), VIII (CCCCBBBBCE), IX (CCCCBBBBCD), X (CDCCBBBBCE) และ XI (DDCCBBBBCE) เฉพาะใน *S. cucullata* เครื่องหมายพันธุกรรมเหล่านี้สามารถใช้ในการจำแนกหอยนางรมทั้ง 3 ชนิดนี้ได้อย่างแม่นยำ โดยความถี่ของ composite haplotypes ที่พบในการทดลองนี้แสดงในตาราง 3.11

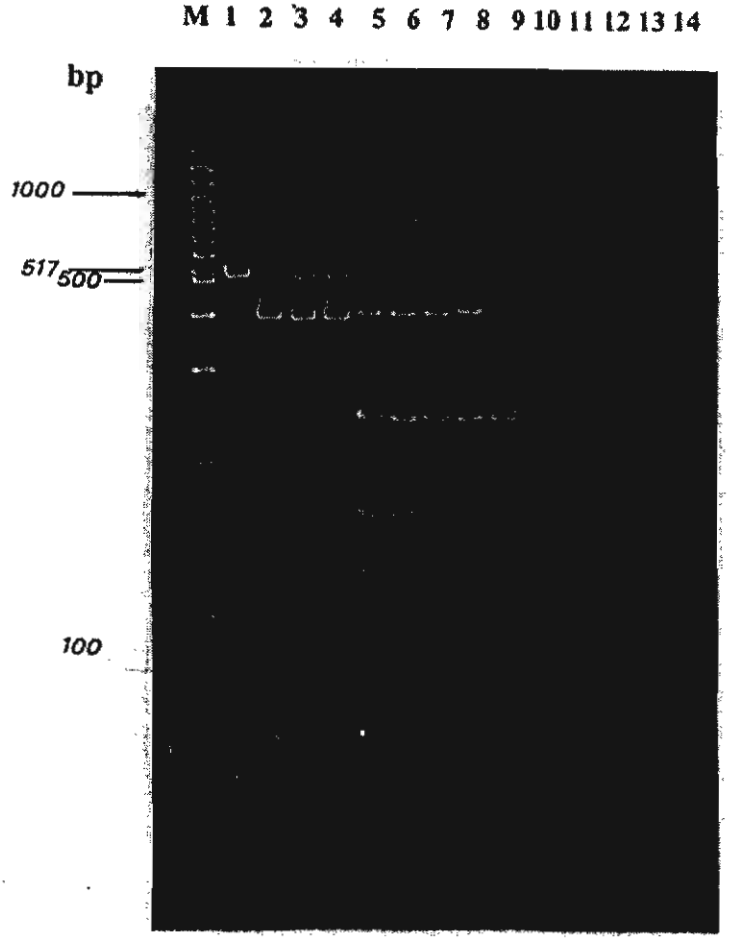
จำนวน composite haplotypes ที่พบใน *S. forskali* และ *S. mytiloides* เท่ากับ 22 และ 8 แบบตามลำดับ โดยหอยนางรม 2 ชนิดนี้มี shared composite haplotypes จำนวน 2 แบบ คือ XIII (DEDCBABCDF) และ XIV (DEDABABCDF)

สำหรับ *Crassostrea* sp. ที่ทำการศึกษานั้นแสดง composite haplotypes XLII (DIHABCAAFK) และ XLIII (CIHABCAAFL) ซึ่งไม่พบในหอยนางรมชนิดอื่นๆ ในขณะที่พบ composite haplotypes จำนวน 3 แบบใน *Saccoctrea* sp. group2 ประกอบด้วย XLIV



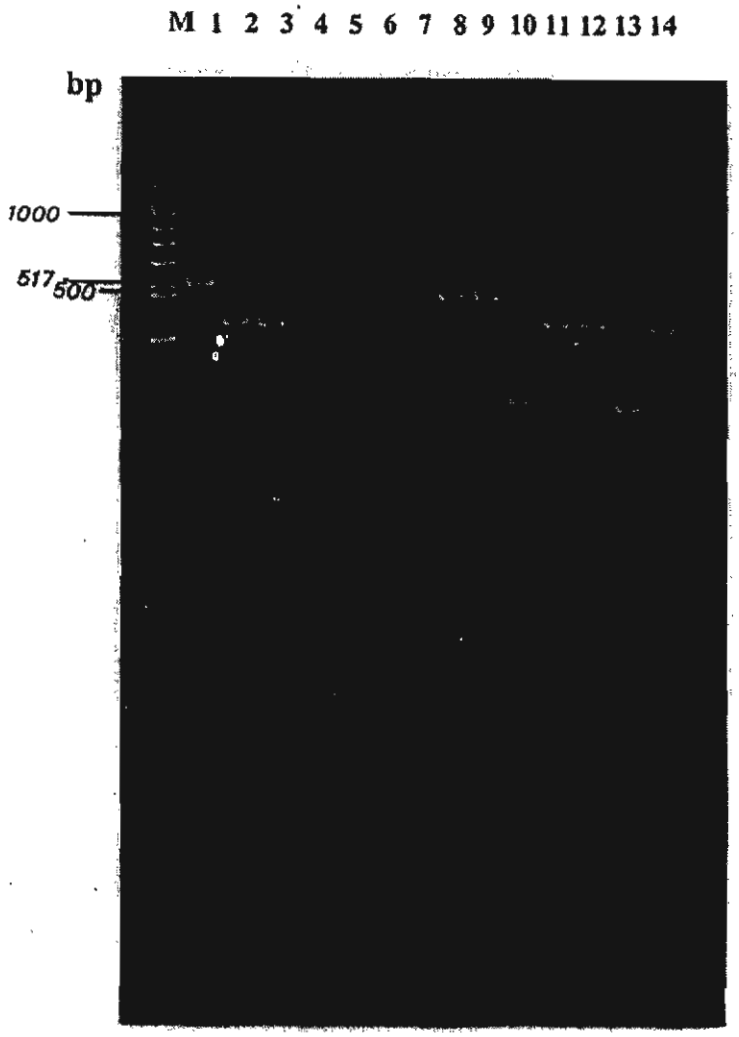
รูปที่ 3.25 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 16S rDNA ของ *C. belcheri* (lanes 2-4, pattern A) *C. iredalei* (lanes 5-6. Pattern B), *Crassostrea* sp. (lanes 7-8, pattern D), *S. cucullata* (lane 9, pattern C), *S. forskali* (lane 10, pattern D), *Saccostrea* sp. group 2 (lanes 11-12, pattern J) และ *S. mytiloides* (lanes 13-14, pattern D) ด้วย *Acs* I

Lane M = 100 bp ladder, lane 1 = undigested 16S rDNA



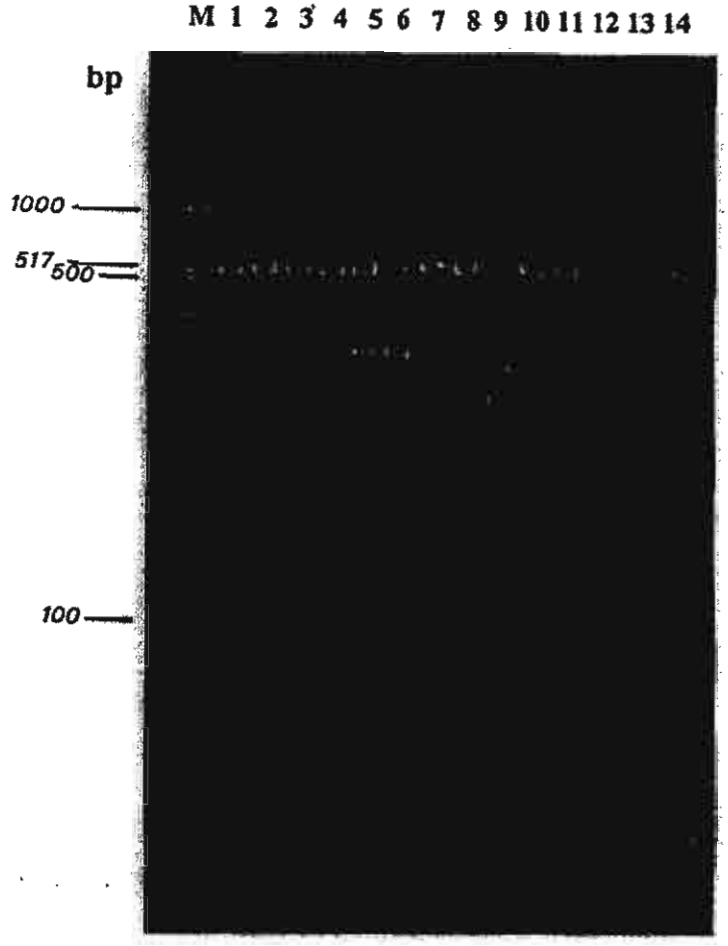
รูปที่ 3.26 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 16S rDNA ของ *C. belcheri* (lanes 2-4, pattern A) *C. iredalei* (lanes 5-7. Pattern B), *S. cucullata* (lanes 8-9, pattern C), *S. forskali* (lane 10-13, pattern E) และ *S. mytiloides* (lane 14, pattern E) ด้วย *Alu* I

Lane M = 100 bp ladder, lane 1 = undigested 16S rDNA



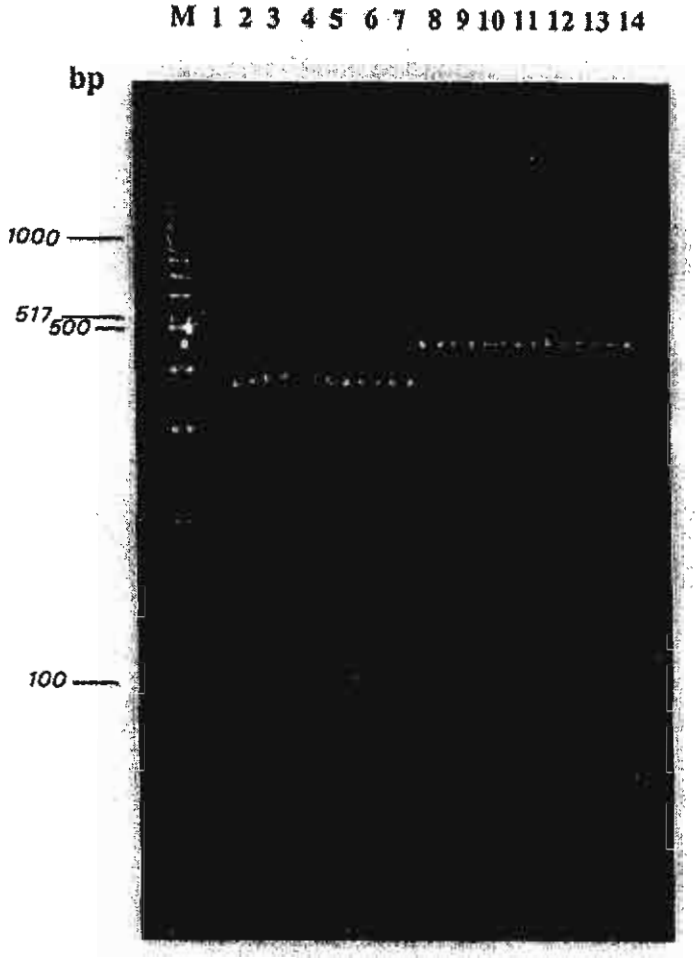
รูปที่ 3.27 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 16S rDNA ของ *C. belcheri* (lanes 2-3, pattern A) *C. iredalei* (lanes 4-5. pattern B), *Crassostrea* sp. (lanes 6-7, pattern H), *S. cucullata* (lane 8-9, pattern C), *S. forskali* (lane 10, pattern D), *Saccostrea* sp. group 2 (lanes 11-12, pattern F) และ *S. mytiloides* (lanes 13-14, pattern D and F ตามลำดับ) ด้วย *Dde* I

Lane M = 100 bp ladder, lane 1 = undigested 16S rDNA



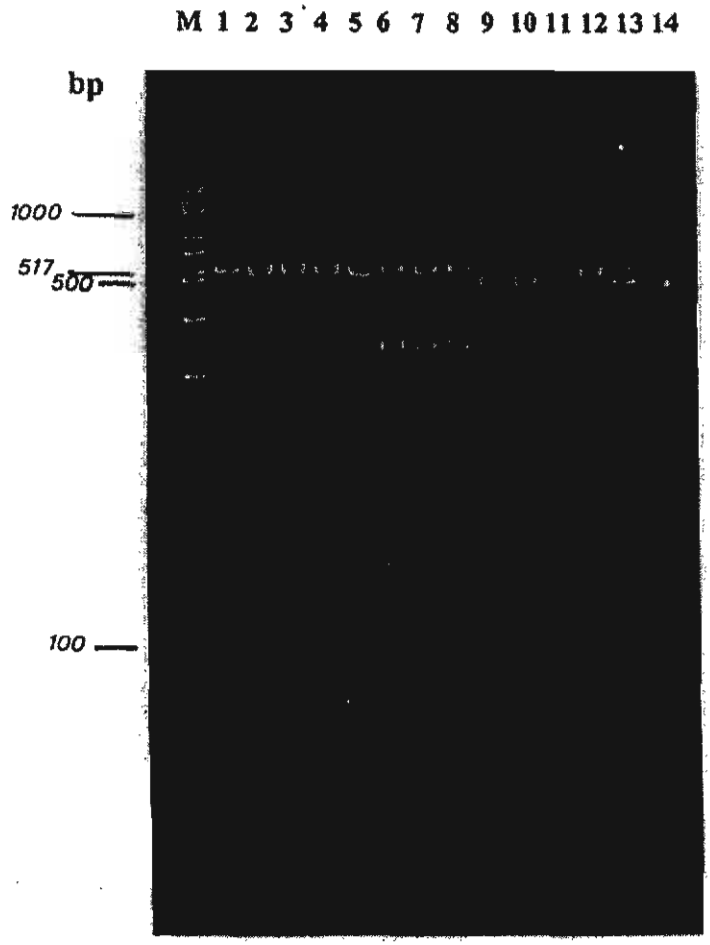
รูปที่ 3.28 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 16S rDNA ของ *C. belcheri* (lanes 2-3, pattern A) *C. iredalei* (lanes 4-6. pattern B), *Crassostrea* sp. (lanes 7-8, pattern A), *S. cucullata* (lane 9, pattern C), *S. forskali* (lane 10-11, pattern C), *Saccostrea* sp. group 2 (lanes 12, pattern C) และ *S. mytiloides* (lanes 13-14, pattern C) ด้วย *Dra* I

Lane M = 100 bp ladder, lane 1 = undigested 16S rDNA



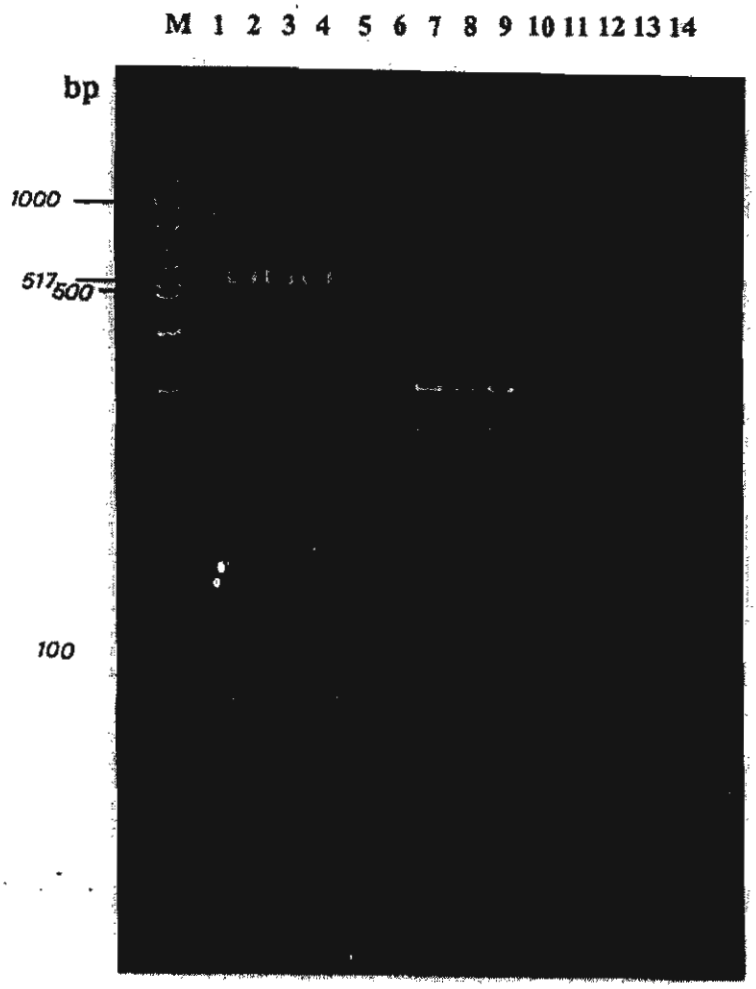
รูปที่ 3.29 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 16S rDNA ของ *C. belcheri* (lanes 2-4, pattern A) *C. iredalei* (lanes 5-7. pattern A), *Crassostrea* sp. (lanes 8, pattern B), *S. forskali* (lane 9-12, pattern B) และ *S. mytiloides* (lanes 13-14, pattern B) ด้วย *Taq* I

Lane M = 100 bp ladder, lane 1 = undigested 16S rDNA



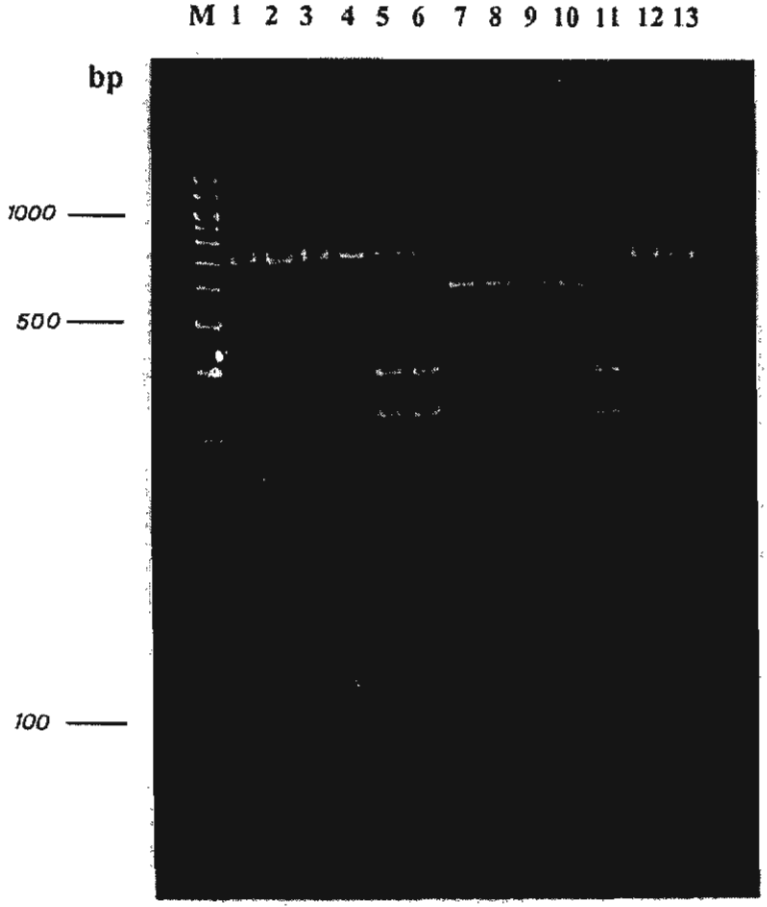
รูปที่ 3.30 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 16S rDNA ของ *C. belcheri* (lanes 2-3, pattern A) *C. iredalei* (lanes 4-5. pattern A), *Crassostrea* sp. (lanes 6-8, pattern C), *S. cucullata* (lane 9, pattern B), *Saccostrea* sp. group 2 (lanes 10-11, pattern B), *S. forskali* (lane 12, pattern A) และ *S. mytiloides* (lanes 13-14, pattern B) ด้วย *Rsa* I

Lane M = 100 bp ladder, lane 1 = undigested 16S rDNA



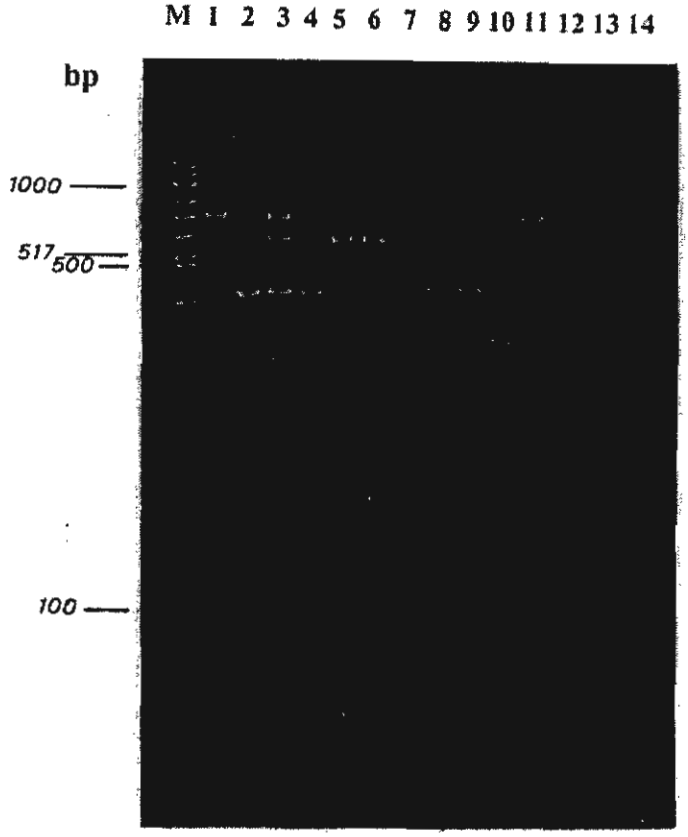
รูปที่ 3.31 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย 18S rDNA ของ *C. belcheri* (lanes 2-3, pattern A) *C. iredalei* (lanes 4-5. pattern A), *Crassostrea* sp. (lanes 6, pattern A), *S. cucullata* (lane 7-9, pattern B), *S. forskali* (lane 10-12, pattern B) และ *S. mytiloides* (lanes 13-14, pattern B) ด้วย *Hin* fI

Lane M = 100 bp ladder, lane 1 = undigested 18S rDNA



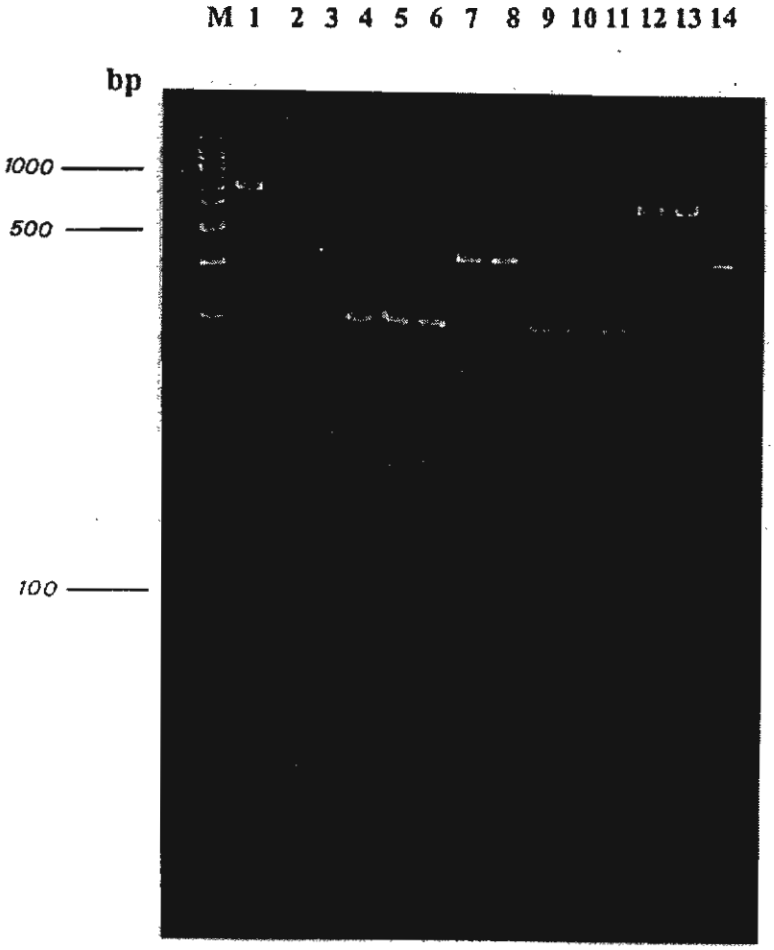
รูปที่ 3.32 แสดง restriction pattern ที่ได้ จากการย่อย COI ของ *C. belcheri* (lanes 2, pattern A) *C. iredalei* (lanes 3. pattern A), *Crassostrea* sp. (lanes 4, pattern A), *S. cucullata* (lane 5-6, pattern B), *S. forskali* (lane 7-10, pattern C), *Saccostrea* sp. group 2 (lanes 11, pattern B) และ *Saccostrea* sp. group 1 (lanes 13-14, pattern A) ด้วย *Acs* I

Lane M = 100 bp ladder, lane 1 = undigested COI



รูปที่ 3.33 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย COI ของ *C. belcheri* (lanes 2-4, pattern A) *C. iredalei* (lanes 5-7. pattern B), *Crassostrea* sp. (lanes 8-9, pattern G), *S. cucullata* (lane 10, pattern C), *S. forskali* (lane 11, pattern D), *Saccostrea* sp. group 2 (lanes 12, pattern H) และ *Saccostrea* sp. group 1 (lanes 13-14, pattern J) ด้วย *Dde* I

Lane M = 100 bp ladder, lane 1 = undigested COI



รูปที่ 3.34 แสดง restriction patterns ที่ได้ จากการย่อย COI ของ *C. belcheri* (lanes 2-3, pattern A) *C. iredalei* (lanes 4-6. pattern C), *Crassostrea* sp. (lanes 7, pattern K), *S. cucullata* (lane 8, pattern D), *S. forskali* (lane 9-11, pattern F), *Saccostrea* sp. group 2 (lanes 12-13, pattern M) และ *Saccostrea* sp. group 1 (lanes 14, pattern G) ด้วย *Mbo* I

Lane M = 100 bp ladder, lane 1 = undigested COI

(JJFCBBBBGM), XLV (JJFCBBBBGS) และ XLVI (JJFCBBBGV) และพบcomposite haplotypes จำนวน 5 แบบใน *Saccostrea* sp. group 1 ส่วน *Saccostrea* sp. group 3 แสดง composite haplotypes XIII และ XIV ซึ่งพบใน *S. forskali* และ *S. mytiloides* สำหรับ *S. commercialis* และ *P. viridis* พบ composite haplotypes ชนิดละ 2 และ 1 แบบ ตามลำดับคือ LII (LFCCBBBELN), LIII (LFCEBBBELN) และ LIV (KLIFCDCFMT) ตามลำดับ

สำหรับหอยนางรมที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่ไม่ชัดเจนนั้น Oys039 และ Oys104 แสดง composite haplotype V (BBBBAAAABC) และ Oys095 แสดง haplotype LV (BBBBBAAABC) ที่ related กับ *C. iredalei* โดยมีความแตกต่างเพียง 1 point mutation จาก composite haplotype V ในขณะที่ Oys030 แสดง composite haplotype ที่พบใน *S. forskali* และ *S. mytiloides* (DEDCBABCDF) ส่วน Oys121 Oys122 แสดง unique genotypes LVI (DFGABBBAHP) และ LVII (DFGABBBAIO) ซึ่งไม่พบใน specimens อื่นๆที่ทำการศึกษา

ค่า genetic distances ที่คำนวณได้จากการทำ restriction fragment length polymorphism (RFLP) แสดงได้ดังภาคผนวก 2 โดยค่า genetic distances ของแต่ละกลุ่มตัวอย่างภายในแต่ละสปีชีส์ (genetic distance between geographic samples within a particular species) มีค่าต่ำกว่า genetic distances ระหว่างกลุ่มตัวอย่างจากต่างสปีชีส์ (genetic distances between pairs of geographic samples from different species) นอกจากนี้ยังพบว่า genetic distances ระหว่างกลุ่มตัวอย่างหอยนางรมภายในสกุล *Crassostrea* มีค่าต่ำกว่า ระหว่างกลุ่มตัวอย่างหอยนางรมภายในสกุล *Saccostrea*

Phylogenetic tree ที่สร้างจากค่า genetic distances ระหว่างคู่ของcomposite haplotypes (รูป 3.35) แสดงการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจนระหว่างหอยนางรมต่างสกุล ภายในสกุล *Crassostrea* นั้น *C. belcheri*, *C. iredalei* และ *Crassostrea* sp. แสดงความแตกต่างระหว่างสปีชีส์อย่างชัดเจน ดังนั้น *Crassostrea* sp. ควรจัดเป็น unidentified new species

สำหรับภายในสกุล *Saccostrea* นั้น *S. cucullata* แสดง monophyletic relationships ภายในสปีชีส์ ทั้งนี้ *S. cucullata* มีความสัมพันธุ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ unidentified *Saccostrea* sp. group 2 (เกาะหนุ่ย จังหวัดระนอง) มากกว่าหอยนางรมสกุล *Saccoctrea* ชนิดอื่นๆ สำหรับ *S. forskali* และ *S. mytiloides* นั้นสามารถแบ่งเป็น 4 phylogenetic groups คือกลุ่มที่มี *S. forskali* ทั้งหมด กลุ่มที่มี *S. mytiloides* ทั้งหมด กลุ่มที่มีทั้ง *S. forskali* และ *S. mytiloides* ปะปนกัน และกลุ่มที่มีทั้ง *S. forskali* และ *S. commercialis* โดยตัวอย่าง *S. forskali* จากเกาะสีชังจะถูกจัดอยู่ทั้งกลุ่มแรกและกลุ่มที่ 3

ค่า haplotype และ nucleotide diversity ของหอยนางรมแต่ละชนิดในการทดลองมีค่าตั้งแต่ 0.1857 (*C. iredalei*) - 0.9044 (*S. mytiloides*) และ 0.0912% (*C. iredalei*) - 3.2388% (*S. mytiloides*)

โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยนางรมสกุล *Saccostrea* มีค่าสูงกว่าสกุล *Crassostrea* อย่างชัดเจน (ตาราง 3.12) ค่า nucleotide divergence ระหว่างสปีชีส์ (รวม *S. commercialis* และ *P. viridis*) มีค่าระหว่าง 0.431% - 13.052% แสดงถึง genetic diversity ที่สูงของหอยนางรมในประเทศไทย

Phylogenetic tree ที่สร้างจากค่า nucleotide divergence ระหว่างสปีชีส์ สามารถ differentiate *C. belcheri*, *C. iredalei* และ *Crassostrea* sp. ออกจากกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 3.36) และสามารถแบ่งหอยนางรมพันธุ์เล็กเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มแรก ประกอบด้วย *S. forskali*, *S. mytiloides* และ *Saccostrea* sp. group *3* และ กลุ่มที่สอง ประกอบด้วย *S. cucullata*, *S. commercialis*, *Saccostrea* sp. group 1 และ *Saccostrea* sp. group 2

ตาราง 3.7 แสดงขนาดของชิ้น DNA ที่ได้จากการย่อยด้วย restriction enzymes ชนิดต่างๆ

Restriction analysis	**จีโนไทป์**					
16S rDNA – *Acs* I	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
	220	380	240	430	560	280
	160	120	200	120		150
	120	60	120			80
	60					(50)
	G	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**
	320	230	280	300	400	260
	150	150	150	150	140	150
	80	120	120	120		120
		(50)				(20)

Restriction analysis	**จีโนไทป์**					
16S rDNA – *Alu* I	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
	420	250	250	250	170	250
	80	170	180	180	165	170
	60	80	70	130	85	130
		60	60		80	
					60	
	G	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**
	250	250	210	250	250	250
	170	90	170	180	140	170
	70	80	100	60	130	115
	(60)	70	80	50		
		(60)				

ตาราง 3.7 (ต่อ)

Restriction analysis	จีโนไทป์					
16S rDNA – *Dde* I	A	B	C	D	E	F
	430	230	500	300	300	430
	105	220	50	135	190	70
		105		70	70	(50)
				(50)		

G	H	I
430	210	430
65	105	60
(50)	95	50
	80	
	75	

Restriction analysis	จีโนไทป์					
16S rDNA – *Dra* I	A	B	C	D	E	F
	560	330	295	250	250	320
		220	250	210	240	205
				80		

Restriction analysis	จีโนไทป์			
16S rDNA – *Rsa* I	A	B	C	D
	560	500	350	210
		(60)	200	160
				80