

ตาราง 3.7 (ต่อ)

Restriction analysis	จีโนมไทป์		
16S rDNA – <i>Dra</i> I	A	B	C
	360	430	425
	85	70	70
	70	(60)	60
	(60)		

Restriction analysis	จีโนมไทป์		
18S rDNA – <i>Hin</i> fl	A	B	C
	530	300	530
	130	250	130
	120	130	90
		120	

Restriction analysis	จีโนมไทป์					
COI – <i>Acs</i> I	A	B	C	D	E	F
	710	400	600	400	390	520
		330	130	200	320	80
				130		70

ตาราง 3.7 (ต่อ)

Restriction analysis	จีโนมไทป์				
COI - <i>Dde</i> I	A	B	C	D	E
	420	600	330	710	300
	170	130	270		250
	120		130		200
	F	G	H	I	J
	430	300	300	305	405
	230	255	270	270	195
	60	130	120	130	130
	K	L	M		
	400	300	450		
	150	295	190		
	120	120	70		

ตาราง 3.7 (ต่อ)

Restriction analysis	จีโนมไทป์					
COI - <i>Mbo</i> I	A	B	C	D	E	F
	180	290	290	420	495	290
	150	150	160	78	75	160
	120	80	140	75	60	140
	80	70	60	60		100
	70	55	(40)			
	55					
	G	H	I	J	K	L
	420	290	290	295	420	420
	80	140	210	195	250	190
	60	120	100	140		60
		75	(85)	(60)		
		55				
	M	N	O	P	Q	R
	600	520	420	420	420	420
	70	75	80	80	75	75
		60	60	75	60	55
		55		60		55
	S	T	U	V		
	495	600	420	600		
	130	60	160	95		
	70		60			

ตัวเลขในวงเล็บแสดงผลรวมของ missing band ที่ infer จากวิธี a minimal number of mutation steps

ตาราง 3.8 ความถี่ของ single haplotypes ที่พบจาก restriction analysis ของ 16S and 18S rDNAs และ COI ของหอยนางรมในประเทศไทย the Australian oyster (*S. commercialis*) และหอยแมลงภู่ (*P. viridis*)

Haplotype	Frequency									
	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Pevi
16S-Acs I:										
A	17(1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	21(1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-
		Oys039								
		Oys095								
		Oys104								
C	-	-	22(0.96)	-	-	2(0.22)	-	-	-	-
D	-	-	1(0.04)	37(0.82)	10(0.59)	7(0.78)	9(1.0)	-	5(1.0)	-
			Oys030							
			Oys121							
			Oys122							
E	-	-	-	1(0.02)	-	-	-	-	-	-

ตาราง 3.8 (ต่อ)

Haplotype	Frequency										
	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
16S-Acs I:											
F	-	-	-	3(0.07)	-	-	-	-	-	-	-
F(D+F)*	-	-	-	1(0.02)	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	2(0.04)	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	1(0.06)	-	-	-	-	-	-
I	-	-	-	1(0.02)	1(0.06)	-	-	-	-	-	-
I(D+I)*	-	-	-	-	1(0.06)	-	-	-	-	-	-
J	-	-	-	-	-	-	-	9(1.0)	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5(1.0)
L(L+I)*	-	-	-	-	3(0.17)	-	-	-	-	6(1.0)	-
L(D+L)*	-	-	-	-	1(0.06)	-	-	-	-	-	-

* specimens showing mixed patterns of digestion implying their hybrid status. Only the dominant pattern of a particular specimen was inferred and used for further analysis

ตาราง 3.8 (ต่อ)

Haplotype	Frequency										
	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
16S- <i>Alu</i> I:											
A	17(1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	21(1.0)	-	-	2(0.118)	-	-	-	-	-	-
		Oys039									
		Oys095									
		Oys104									
C	-	-	8(0.35)	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	15(0.65)	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	27(0.60)	6(0.353)	-	-	-	5(1.0)	-	-
				Oys030							
F	-	-	-	15(0.33)	1(0.059)	-	7(0.78)	-	-	6(1.0)	-
				Oys121							
				Oys122							

ตาราง 3.8 (ต่อ)

Haplotype	Frequency										
	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
16S- <i>Alu</i> I:											
G	-	-	-	-	1(0.059)	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	7(0.411)	-	-	-	-	-	-
I	-	-	-	-	-	9(1.0)	-	-	-	-	-
J	-	-	-	-	-	-	-	9(1.0)	-	-	-
K	-	-	-	3(0.07)	-	-	2(0.22)	-	-	-	-
L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5(1.0)

ตาราง 3.8 (ต่อ)

Haplotype	Frequency										
	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
16S- <i>Dde</i> I:											
A	16(0.94)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1(0.06)	21(1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Oys039									
		Oys095									
		Oys104									
C	-	-	23(1.0)	-	-	-	-	-	-	6(1.0)	-
D	-	-	-	28(0.62)	8(0.47)	-	-	-	5(1.0)	-	-
				Oys030							
E	-	-	-	1(0.02)	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	12(0.27)	9(0.53)	-	6(0.67)	9(1.0)	-	-	-

ตาราง 3.8 (ต่อ)

Haplotype	Frequency										
	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
16S- <i>Dde</i> I:											
G	-	-	-	4(0.09)	-	-	3(0.33)	-	-	-	-
				Oys121							
				Oys122							
H	-	-	-	-	-	9(1.0)	-	-	-	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5(1.0)

ตาราง 3.8 (ต่อ)

Haplotype	Frequency										
	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
16S-Dra I:											
A	17(1.0)	-	-	15(0.33)	2(0.12)	9(1.0)	1(0.11)	-	1(0.20)	-	-
				Oys121							
				Oys122							
B	-	21(1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Oys039									
		Oys095									
		Oys104									
C	-	-	23(1.0)	30(0.67)	6(0.35)	-	8(0.89)	9(1.0)	4(0.80)	5(0.83)	-
				Oys030							
D	-	-	-	-	9(0.53)	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(0.17)	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6(1.0)

ตาราง 3.8 (ต่อ)

Haplotype	Frequency										
	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
16S-Taq I:											
A	17(1.0)	21(1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Oys039									
		Oys104									
B	-	Oys095	23(1.0)	45(1.0)	17(1.0)	9(1.0)	9(1.0)	9(1.0)	5(1.0)	6(1.0)	-
				Oys030							
				Oys121							
				Oys122							
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5(1.0)

ตาราง 3.8 (ต่อ)

Haplotype	Frequency										
	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
16S-Rsa I:											
A	17(1.0)	20(0.95)	-	35(0.78)	8(0.47)	-	1(0.11)	-	5(1.0)	-	-
		Oys039		Oys030							
		Oys095									
		Oys104									
B	-	-	23(1.0)	10(0.22)	9(0.53)	-	8(0.89)	9(1.0)	-	6(1.0)	-
				Oys121							
				Oys122							
C	-	1(0.05)	-	-	-	9(1.0)	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5(1.0)

ตาราง 3.8 (ต่อ)

Haplotype	Frequency										
	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
COL-Dde I:											
A	17(1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	21(1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Oys039									
		Oys095									
		Oys104									
C	-	-	23(1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	28(0.62)	8(0.47)	-	-	-	5(1.0)	-	-
				Oys030							
E	-	-	-	1(0.02)	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	9(1.0)	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	9(1.0)	-	-	-

ตาราง 3.8 (ต่อ)

Haplotype	Frequency										
	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
COI- <i>Mbo</i> I:											
A	16(0.94)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1(0.06)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	20(0.95)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Oys039									
		Oys095									
		Oys104									
D	-	-	19(0.83)	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	4(0.17)	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	38(0.84)	7(0.41)	-	-	-	5(1.0)	-	-
				Oys030							
G	-	-	-	-	-	-	4(0.44)	-	-	-	-
H	-	-	-	1(0.02)	-	-	-	-	-	-	-

ตาราง 3.8 (ต่อ)

Haplotype	Frequency										
	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
COI-Mbo I:											
I	-	-	-	-	1(0.06)	-	-	-	-	-	-
J	-	-	-	-	9(0.53)	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	7(0.78)	-	-	-	-	-
L	-	-	-	-	-	2(0.22)	-	-	-	-	-
M	-	-	-	-	-	-	-	7(0.78)	-	-	-
N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6(1.0)	-
O	-	-	-	Oys122	-	-	2(0.22)	-	-	-	-
P	-	-	-	1(0.02)	-	-	2(0.22)	-	-	-	-
				Oys121							
Q	-	-	-	-	-	-	1(0.11)	-	-	-	-

ตาราง 3.8 (ต่อ)

Haplotype	Frequency										
	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
COI- <i>Mbo</i> I:											
R	-	-	-	5(0.11)	-	-	-	-	-	-	-
S	-	-	-	-	-	-	-	1(0.11)	-	-	-
T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5(1.0)
U	-	1(0.05)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	-	-	-	-	-	-	-	1(0.11)	-	-	-

Abbreviation: Cb = *Crassostrea belcheri*, Ci = *C. iredalei*, Sc = *Saccostrea cucullata*, Sf = *S. forskali*, Sm = *Striostrea (Paratriostrea) mytiloides*, Csp = *Crassostrea* sp., Ssp 1 = *Saccostrea* sp. group 1 from Suratthani, Ssp 2 = *Saccostrea* sp. group 2 from Ranong, Ssp 3 = *Saccostrea* sp. group 3 from Samutsakhon, Scom = *S. commercialis* and Pevi = *Perna viridis*

ตาราง 3.9 Molecular taxonomic key สำหรับหอยนางรมที่มีความสำคัญเชิงพาณิชย์ในประเทศไทย

DNA marker	Species
1. 18S rDNA-<i>Hinf</i> I	
Pattern A (530,130,120)	<i>Crassostrea</i>
Pattern B (300,250,130,120)	<i>Saccostrea</i>
Pattern C (530,130,90)	<i>P. viridis</i>
2. COI-<i>Dde</i> I	
Pattern A (420,170,120)	<i>C. belcheri</i>
Pattern B (600,130)	<i>C. iredalei</i>
Pattern C (330,270,130)	<i>S. cucullata</i>
3. COI-<i>Mbo</i> I	
Patterns A (180,150,120,80,70,55) and B (290,150,80,70,55)	<i>C. belcheri</i>
Pattern C (290,160,140,60(40))	<i>C. iredalei</i>
Patterns D (420,82,84,60) และ E (495,82,60)	<i>S. cucullata</i>
4. ไม่แสดง patterns ข้างต้น	<i>S. forskali</i> or <i>S. mytiloides</i>

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

	Genotype	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi	Total(N)
I	AAAAA AAAA	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
II	AAAAA AAAAB	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
III	AABAAAAA	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
IV	BBBACAABC	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
V	BBBAAAAABC	-	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21
Oys039													
Oys104													
VI	BBBAAAAABU	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
VII	CDCCBBBBCD	-	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	13
VIII	CCCCBBBBCE	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
IX	CCCCBBBBCD	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	6
X	CDCCBBBBCE	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
XI	DDCCBBBBCE	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1

ตารางที่ 3.10 (ต่อ)

Genotype	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi	Total(N)
XII EEDCBABCDF	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XIII DEDCBABCDF	-	-	-	16	4	-	-	-	4	-	-	25
				Oys030								
XIV DEDABABCDF	-	-	-	7	1	-	-	-	1	-	-	9
XV GFGCBABCJF	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XVI GFGCBABAJF	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XVII FFFCBBBAJF	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3
XVIII DFFABBBAIR	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XIX FFFABBBAJF	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XX IFFCBBBCEH	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XXI DEECBABCDF	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XXII DEDABABDDF	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XXIII DFGABABAHP	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	2
XXIV DFGABBBAIR	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1

ตารางที่ 3.10 (ต่อ)

Genotype	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi	Total(N)
XXV DFDABABADF	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XXVI DFDABABCDF	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XXVII DFFCBBBAHR	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XXVIII DKFABBBBAHR	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XXIX DKFCBABAHR	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XXX DEDCBABAHF	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XXXI DFFCBABCHF	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XXXII DFFCBABAHF	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XXXIII DKFCBBBAHF	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
XXXIV DEDCBABCDI	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
XXXV DFFDBBBAKJ	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
XXXVI HHFDBBBAKJ	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
XXXVII IHFDBBBAKJ	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2

ตารางที่ 10 (ต่อ)

	Genotype	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi	Total(N)
XXXVIII	DGFDDBBBAKJ	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
XXXIX	LHFDDBBBAKJ	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	4
XL	DBDCBABCDF	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
XLI	DBDABABCDF	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
XLII	DIHABCAAFK	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	7
XLIII	CIHABCAAFL	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	2
XLIV	JJFCBBBGM	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	7
XLV	JJFCBBBGS	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
XLVI	JJFCBBBGV	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
XLVII	DFGCBBBAHQ	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
XLVIII	DKGCBBBAHP	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
XLIX	DFFCBBBAIG	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3
L	DKFCBBBAIG	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1

ตารางที่ 10 (ต่อ)

	Genotype	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi	Total(N)
LI	DFFCBBBAIO	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
LII	LFCCBBBELN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	5
LIII	LFCEBBBELN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
LIV	KLIFCDCFMT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5
LV	BBBBBAAABC	-	Oys095	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
LVI	DFGABBBAHP	-	-	-	Oys121	-	-	-	-	-	-	-	1
LVII	DFGABBBBAIO	-	-	-	Oys122	-	-	-	-	-	-	-	1

Composite haplotypes were constructed from each single haplotypes (restriction patterns) arranged from that of 16S rDNA-*Acs* I, *Alu* I, *Dde* I, *Dra* I, *Taq* I and *Rsa* I, 18S rDNA-*Hinf* I and COI-*Acs* I, *Dde* I and *Mbo* I, respectively.

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

	Genotype	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
I	AAAAA AAAA	0.882	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	AAAAA AAAAB	0.059	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	AABAAAA AAAA	0.059	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	BBBACAABC	-	0.048	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	BBBAAAAABC	-	0.904	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Oys039											
	Oys104											
VI	BBBAAAAABU	-	0.048	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VII	CDCCBBBBCD	-	-	0.565	-	-	-	-	-	-	-	-
VIII	CCCCBBBBCE	-	-	0.087	-	-	-	-	-	-	-	-
IX	CCCCBBBBBCD	-	-	0.261	-	-	-	-	-	-	-	-
X	CDCCBBBBCE	-	-	0.0435	-	-	-	-	-	-	-	-
XI	DDCCBBBBCE	-	-	0.0435	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3.11 (ต่อ)

	Genotype	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
XII	EEDCBABCDF	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XIII	DEDCBABCDF	-	-	-	0.3555	0.2353	-	-	-	0.80	-	-
					Oys030							
XIV	DEDABABCDF	-	-	-	0.1555	0.0588	-	-	-	0.20	-	-
XV	GFGCBABCJF	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XVI	GFGCBABAJF	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XVII	FFFCBBBAJF	-	-	-	0.0667	-	-	-	-	-	-	-
XVIII	DFFABBBAIR	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XIX	FFFABBBAJF	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XX	IFFCBBBCEH	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XXI	DEECBABCDF	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XXII	DEDABABDDF	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XXIII	DFGABABAHP	-	-	-	0.0222	-	-	0.1111	-	-	-	-
XXIV	DFGABBBAIR	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3.11 (ต่อ)

	Genotype	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
XXV	DFDABABADF	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XXVI	DFDABABCDF	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XXVII	DFFCBBBAHR	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XXVIII	DKFABBBBAHR	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XXIX	DKFCBABAHR	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XXX	DEDCBABAHF	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XXXI	DFFCBABCHF	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XXXII	DFFCBABAHF	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XXXIII	DKFCBBBAHF	-	-	-	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
XXXIV	DEDCBABC DI	-	-	-	-	0.0588	-	-	-	-	-	-
XXXV	DFFD BBB AKJ	-	-	-	-	0.0588	-	-	-	-	-	-
XXXVI	HHFD BBB AKJ	-	-	-	-	0.0588	-	-	-	-	-	-
XXXVII	IHFD BBB AKJ	-	-	-	-	0.1176	-	-	-	-	-	-

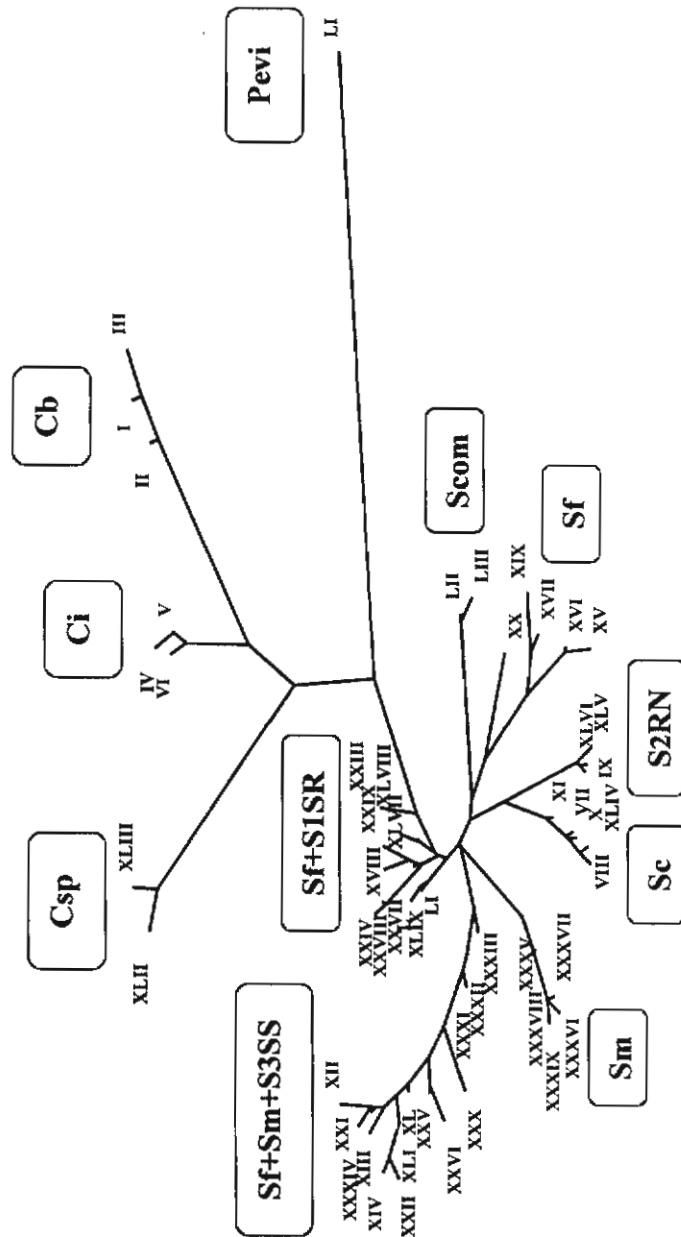
ตารางที่ 3.11 (ต่อ)

Genotype	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
XXXVIII DGFDBBBAKJ	-	-	-	-	0.0588	-	-	-	-	-	-
XXXIX LHFDBBBAKJ	-	-	-	-	0.2353	-	-	-	-	-	-
XL DBDCBABCDF	-	-	-	-	0.0588	-	-	-	-	-	-
XLI DBDABABCDF	-	-	-	-	0.0588	-	-	-	-	-	-
XLII DIHABCAAFK	-	-	-	-	-	0.7778	-	-	-	-	-
XLIII CIHABCAAFK	-	-	-	-	-	0.2222	-	-	-	-	-
XLIV JJFCBBBGM	-	-	-	-	-	-	-	0.7778	-	-	-
XLV JJFCBBBGS	-	-	-	-	-	-	-	0.1111	-	-	-
XLVI JJFCBBBGV	-	-	-	-	-	-	-	0.1111	-	-	-
XLVII DFGCBBBAHQ	-	-	-	-	-	-	0.1111	-	-	-	-
XLVIII DKGCBBAHP	-	-	-	-	-	-	0.1111	-	-	-	-
XLIX DFFCBBBAIG	-	-	-	-	-	-	0.3333	-	-	-	-
L DKFCBBBAIG	-	-	-	-	-	-	0.1111	-	-	-	-

ตารางที่ 3.11 (ต่อ)

Genotype	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
LI	DFFCBBBAIO	-	-	-	-	-	0.2222	-	-	-	-
LII	LFCCBBBELN	-	-	-	-	-	-	-	-	0.833	-
LIII	LFCEBBBELN	-	-	-	-	-	-	-	-	0.167	-
LIV	KLIFCDCFMT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00
LV	BBBBBAAABC	Oys095	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LVI	DFGABBBBHP	-	-	Oys121	-	-	-	-	-	-	-
LVII	DFGABBBBAIO	-	-	Oys122	-	-	-	-	-	-	-

Composite haplotypes were constructed from each single haplotypes (restriction patterns) and arranged from that of 16S rDNA-*Acs* I, *Alu* I, *Dde* I, *Dra* I, *Taq* I and *Rsa* I, 18S rDNA-*Hinf* I and COI-*Acs* I, *Dde* I and *Mbo* I, respectively.



0.01

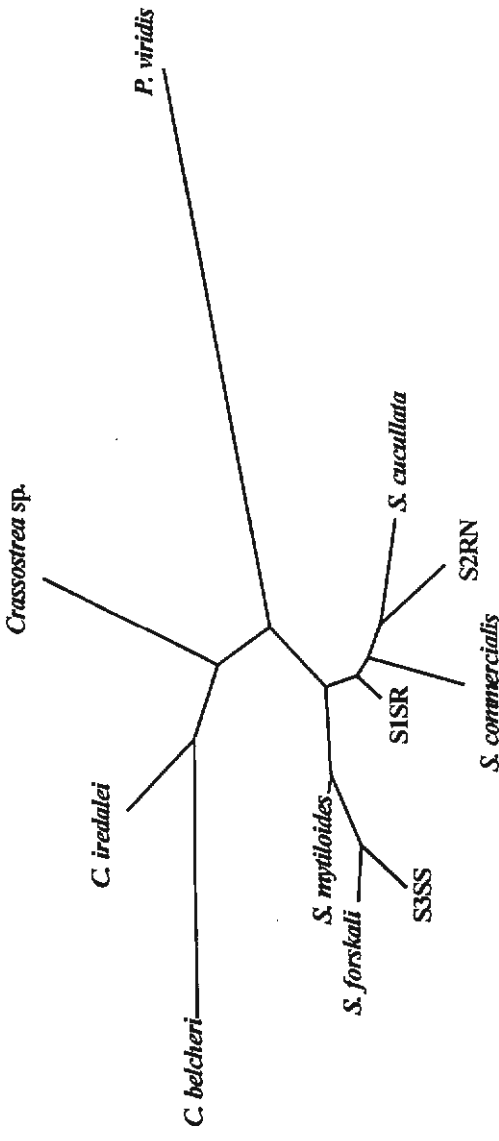
รูป 3.35 แผนภูมิ Neighbor-joining tree สร้างจากค่าเฉลี่ยของ genetic distance ระหว่าง composite haplotypes ที่พบในการทดลองนี้

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

ชนิด	Haplotype diversity ($h \pm SE$)	Nucleotide diversity ($\times 100$)
<i>C. belcheri</i>	0.2279 ± 0.12949	0.0945
<i>C. iredalei</i>	0.1857 ± 0.11022	0.0912
<i>S. cucullata</i>	0.6285 ± 0.08716	0.3501
<i>S. forskali</i>	0.8545 ± 0.04544	2.8711
<i>S. mytiloides</i>	0.9044 ± 0.04968	3.2388
<i>Crassostrea</i> sp.	0.3889 ± 0.16440	0.3538
<i>Saccostrea</i> sp. กลุ่ม 1	0.8889 ± 0.09100	1.0858
<i>Saccostrea</i> sp. กลุ่ม 2	0.4167 ± 0.19066	0.1447
<i>Saccostrea</i> sp. กลุ่ม 3	0.4000 ± 0.23732	0.1828
<i>S. commercialis</i>	0.3333 ± 0.21517	0.0862
<i>P. viridis</i>	0.0000 ± 0.00000	0.0000
ค่าเฉลี่ย	0.4753 ± 0.00846	0.7726 ± 0.00124

ตาราง 3.13 ค่า Nucleotide diversity (above diagonal) and nucleotide divergence (below diagonal) ระหว่างชนิดของตัวอย่างหอยนางรมและหอยแมลงภู่ที่
ใช้ในการทดลอง

	Cb	Ci	Sc	Sf	Sm	Csp	Ssp 1	Ssp 2	Ssp 3	Scom	Pevi
Cb	-	0.050973	0.114125	0.093959	0.087970	0.080604	0.096071	0.095941	0.092264	0.104880	0.130984
Ci	0.050044	-	0.090977	0.071090	0.070745	0.073767	0.078835	0.094179	0.066192	0.095216	0.108684
Sc	0.111902	0.088771	-	0.063875	0.060793	0.099533	0.029320	0.031169	0.070859	0.041160	0.119048
Sf	0.079131	0.056278	0.047769	-	0.037709	0.089358	0.046508	0.055451	0.019585	0.060174	0.121814
Sm	0.071304	0.054095	0.042849	0.007160	-	0.091350	0.045919	0.050259	0.031607	0.053766	0.118622
Csp	0.078362	0.071542	0.096013	0.073233	0.073387	-	0.079867	0.115208	0.086270	0.101341	0.125164
Ssp 1	0.090170	0.072951	0.022140	0.026724	0.024296	0.072669	-	0.038383	0.056745	0.037195	0.098699
Ssp 2	0.094745	0.092999	0.028694	0.040371	0.033341	0.112715	0.032230	-	0.059757	0.042904	0.110704
Ssp 3	0.090877	0.064822	0.068194	0.004316	0.014499	0.083587	0.050402	0.058119	-	0.067875	0.129820
Scom	0.103977	0.094329	0.038978	0.045388	0.037141	0.099141	0.031335	0.041750	0.066530	-	0.111616
Pevi	0.130511	0.108229	0.117298	0.107459	0.102428	0.123395	0.093270	0.109981	0.128906	0.111185	-



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

วิจารณ์ผลการทดลอง

I. อนุกรมวิธานของหอยนางรมสกุล *Crassostrea* และสกุล *Saccostrea* ในประเทศไทย

ความรู้พื้นฐานด้านความหลากหลายของชนิดและพันธุกรรมของหอยนางรมในประเทศไทยมีส่วนสำคัญที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างโปรแกรมการผสมพันธุ์ และการคัดเลือกพันธุ์หอยนางรมที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ของประเทศไทย อย่างไรก็ตามความรู้ทางด้านความหลากหลายของหอยนางรมในประเทศไทยทั้งในระดับภายในและระหว่างสปีชีส์ยังมีอยู่น้อยมาก และข้อมูลอนุกรมวิธานของหอยนางรมในประเทศไทยยังไม่ชัดเจน เนื่องจากรูปร่างและลักษณะภายนอกของหอยนางรม เช่น ลักษณะวิทยาของเปลือกหอยสามารถแปรผันตามสถานะของสิ่งแวดล้อม และถิ่นที่อยู่อาศัยได้ (Ecomorphological variation) (Tack et al., 1992) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการเกิด hybridization ระหว่างสปีชีส์เช่นระหว่าง *C. virginica* และ *C. rhizophorae* และให้ลูกหอยที่มีลักษณะของ shell morphology และ scar pigmentation แปรผันไปจากพ่อแม่ (Hedgecock and Okazaki, 1984) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการศึกษาอนุกรมวิธานของหอยนางรมควรใช้ลักษณะของลักษณะวิทยาควบคู่กับวิธีการอื่นๆเช่น อนุพันธุศาสตร์

หอยนางรมในประเทศไทยจัดอยู่ใน family Crassostreinae แต่ชื่อวิทยาศาสตร์ของหอยนางรมนั้นก็ยังใช้กันอย่างสับสน ตัวอย่างเช่น ก่อนหน้านี้ *C. iredalei* จะใช้ชื่อว่า *C. lugubris* ในขณะที่ *S. mordax* เป็น synonym ของ *S. cucullata* สำหรับ *S. mytiloides* มีการเปลี่ยนชื่อเป็น *Striostrea (Parastriostrea) mytiloides* ซึ่งจากผลการศึกษาข้างต้นชี้ว่าไม่ถูกต้อง แสดงให้เห็นว่า การใช้พื้นฐานของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในอนุกรมวิธานของหอยนางรมในประเทศไทยเพียงอย่างเดียวนั้นคงไม่ได้ข้อยุติ

ข้อมูลอนุกรมวิธานของหอยนางรมในสกุล *Crassostrea* และสกุล *Saccostrea* ในประเทศไทยมีอยู่อย่างจำกัด โดยการศึกษาหอยนางรมในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ก่อนหน้านี้หอยนางรม *Saccostrea* ทั้งหมดในประเทศไทยได้ใช้ชื่อเป็น *S. cucullata* (Amonjaruchit, 1988) ในทางตรงกันข้าม Brohmaronda et al. (1998) และ Tookwinas (1991) ได้จำแนกหอยนางรมพันธุ์เล็ก ที่เก็บจากหลายจังหวัดในประเทศไทยว่าเป็น *S. commercialis* ซึ่งจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไม่มี *S. commercialis* ในประเทศไทย

Yoosukh (2000) ได้จำแนกประเภทหอยนางรม superfamily Ostreioidea ในประเทศไทย โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือกหอย จำแนกได้เป็น 2 families คือ Ostreioidea และ Gryphaeidea ซึ่ง Ostreioidea สามารถแบ่งได้เป็น 3 subfamilies คือ Ostreinae (Tribe Ostreini ประกอบด้วย *Planostrea pestrigris* และ *Ostrea* sp.) Crassostreinae (*C. belcheri* และ *C. lugubris*, *S. cucullata* *S. mordax* *S. mytiloides* และ *Saccostrea* spp.) และ Lophinae (*Lopha cristagalli*,

Dendostrea folium และ *Dendostrea sp.*) ใน *Saccostrea* spp. ประกอบด้วยหอยนางรม *Saccostrea* ที่ไม่รู้สปีชีส์ที่แน่ชัดอีก 3 สปีชีส์

Visootviseth et al. (1998) ได้ศึกษาหอยนางรม *Saccostrea* ที่เก็บจาก อ. ศรีราชา (จ. ชลบุรี), สามแสบ (จ. ชุมพร), เกาะทะลุ (จ. ชุมพร), เกาะปราบ (จ. สุราษฎร์ธานี), เกาะช้าง (จ. ตรัง) ซึ่งอยู่ในฝั่งอ่าวไทย และ บ้านทับเที่ยง (จ. ตรัง) และ เกาะเขาใหญ่ (จ. สตูล) ในฝั่งทะเลอันดามันและได้นำตัวอย่างหอยนางรมเหล่านี้มาวิเคราะห์ด้วย morphometric และ protein electrophoresis ผลจากการศึกษาสามารถแยกหอยนางรมออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม A ประกอบด้วย อ. ศรีราชา ทับเที่ยง (Tubtieng) เกาะปราบ เกาะเขาใหญ่ (Koh Khaoyai) และเกาะช้าง species 1, กลุ่ม B ประกอบด้วย สามแสบ (Sam Saeb) และ เกาะช้าง species 2 และกลุ่ม C คือ เกาะทะลุ (Koh Talu) หอยนางรมทั้งหมดนี้ไม่ได้แยกโดยใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ แต่ทั้งหมดเรียกรวมว่า *S. cucullata*

ความแตกต่างระหว่างหอยนางรมสกุล *Crassostrea* และสกุล *Saccostrea* สามารถแยกโดย chomata ซึ่งคือ ปุ่มหรือสันที่ขึ้นอยู่บริเวณรอบขอบเปลือก ถ้าเป็น *Crassostrea* จะไม่มี chomata แต่ถ้าเป็น *Saccostrea* จะมี chomata ภายในหอยนางรมสกุล *Crassostrea* หรือหอยตะไกรม สามารถแยกได้เป็น 2 สปีชีส์ โดยหอยที่มีรอยกล้ำเนื้อยึดฝาเปลือกเป็นสีดำจะเรียกว่า *C. iredalei* ถ้าเป็นสีขาวจะเรียกว่า *C. belcheri* ภายในหอยนางรมสกุล *Saccostrea* โดยเฉพาะหอยนางรม *S. forskali* และ *S. mytiloides* ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างกันได้ยาก

ในการศึกษาครั้งนี้มีตัวอย่างจาก 4 geographic samples (CsKB, S1SR, S2RN และ S3SS) ที่ไม่สามารถจำแนกว่าเป็นสปีชีส์ได้อย่างชัดเจนโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นจึงต้องใช้ molecular genetic markers มาช่วยในการจำแนกหอยนางรมในประเทศไทย

II. การศึกษา population genetics และการจัดจำแนกหอยนางรมสกุล *Crassostrea* และสกุล *Saccostrea* ในประเทศไทย

II.1 RAPD-PCR

มีการนำเทคนิค RAPD มาใช้ศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในหอยหลายสปีชีส์ ตัวอย่างเช่น การตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมใน *C. virginica* (Hirschfeld et al., 1999), การแยก polymorphic DNA markers ในการศึกษาพันธุกรรมของ sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Patwary et al., 1994) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน limpets *Siphowaria* spp. (Chambers et al., 1998) แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและเครื่องหมายที่จำเพาะกับสปีชีส์ในหอยนางรมที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ของประเทศไทย ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงและการจัดการหอยนางรมในประเทศ

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยนางรมในประเทศไทยด้วย RAPD-PCR พบ monomorphic bands ของแต่ละสปีชีส์ (ที่พบอย่างน้อย 95% ของทุกตัวอย่างในสปีชีส์นั้น) จำนวนมาก และพบว่ามี RAPD fragments ที่เป็น species-specific markers กับหอยนางรมที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ของไทย คือ *C. belcheri* *C. iredalei* และ *S. cucullata* จากการทดลองถึงแม้จะพบ monomorphic RAPD fragments ใน *S. forskali* และ *S. mytiloides* แต่ bands ดังกล่าวก็พบในหอยนางรมสปีชีส์อื่น ๆ ด้วย จึงไม่สามารถนำมาใช้เป็น species-specific markers ใน 2 สปีชีส์นี้ได้

ถึงแม้ว่าจำนวนตัวอย่างของ *C. belcheri*, *C. iredalei* และ *S. cucullata* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะน้อย แต่การเก็บตัวอย่างได้ทำการเก็บตัวอย่างครอบคลุมพื้นที่ที่มีการกระจายตัวของหอยนางรมดังกล่าว ทั้งบริเวณอ่าวไทย และอันดามัน และผลจาก species-specific markers ที่พบ แสดงให้เห็นว่า markers ที่ได้ไม่มีผลเนื่องมาจาก sampling errors ของตัวอย่างที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ RAPD ทุกไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ให้ fragments ที่ fixed frequencies ในทั้ง *S. commercialis* และ *P. viridis* ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำไพรเมอร์เหล่านี้มาใช้เป็น markers ในทั้ง 2 สปีชีส์อีกด้วย

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ให้ RAPD genotype จำนวนมากในหอยนางรมทั้ง 3 สกุลในประเทศไทย แสดงให้เห็นว่าหอยนางรมมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง เพื่อลดปัญหาเกี่ยวกับความแตกต่างของจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง จึงได้ใช้อัตราส่วนระหว่างจำนวนเฉลี่ยของ genotypes ต่อไพรเมอร์ และจำนวนของตัวอย่างในสปีชีส์ (a ratio between the number of genotypes per primer and the number of investigated specimens in a particular species) ซึ่งจะมี ความน่าเชื่อถือมากกว่าการใช้จำนวน genotypes ในแต่ละสปีชีส์เพียงอย่างเดียว และพบว่าใน *C. belcheri* ให้ค่าอัตราส่วนดังกล่าวเท่ากับ 0.58 ในขณะที่สปีชีส์อื่นมีค่าอยู่ในระดับที่สูงกว่า คือ ใน *C. iredalei* มีค่า 0.90 ใน *S. cucullata* มีค่าเท่ากับ 0.98 และใน *S. forskali* และ *S. mytiloides* มีค่าเท่ากับ 1.0

Hirchfeld et al. (1999) ใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *C. virginica* จาก 4 กลุ่มประชากรธรรมชาติประกอบด้วย ประชากรจาก Wellfleet, Wareham River, East Wardham/Onset และ Barnstable Harbor และ 1 กลุ่มประชากรที่มาจากการเพาะเลี้ยง คือ Cotuit ที่อยู่ในรัฐ Massachusetts ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยได้ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 10 ไพรเมอร์ กับตัวอย่างทั้งหมด 79 ตัวอย่างที่มาจาก 5 แหล่ง และพบความหลากหลายทางพันธุกรรม (ค่า polymorphic bands) ในระดับที่สูงในตัวอย่างจาก Barnstable Harbor (74%) ติดตามด้วยตัวอย่างที่มาจาก Wellfleet (71%) Wareham River (70%) East Wardham/Onset (62%) และ Cotuit (54%) ตามลำดับ และพบว่า RAPD polymorphism ระหว่าง 3 กลุ่มประชากรที่มาจากธรรมชาติ คือ Barnstable Harbor, Wellfleet และ Wareham River และกลุ่มประชากรที่มาจากการเพาะ

ก็ยังมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่ตัวอย่างจาก the East Wardham/Onset ไม่แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตัวอย่างจาก Cotuit ($P > 0.05$) จากผลการทดลองแสดงว่าประชากรเริ่มต้นจาก Cotuit อาจจะมาจากรวมกันของประชากรจาก East Wardham/Onset ข้อมูลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรที่มาจากการเพาะเลี้ยงและกลุ่มประชากรตามธรรมชาติของ *C. virginica* ใน Massachusetts สามารถนำมาใช้ช่วยในการจัดการของหอยนางรมชนิดนี้

ถ้าไม่พิจารณา unidentified species (*Crassostrea* sp. *Saccostrea* sp. group 1 *Saccostrea* sp. group 2 และ *Saccostrea* sp. group 3) แล้ว ค่าเฉลี่ยของจำนวน bands ต่อไพรเมอร์ และเปอร์เซ็นต์ของ polymorphic bands ของหอยนางรมในสกุล *Crassostrea* จะมีค่าต่ำกว่าในหอยนางรมสกุล *Saccostrea* แสดงว่าในหอยนางรมสกุล *Saccostrea* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสูงกว่าหอยนางรมสกุล *Crassostrea*

เมื่อทำการเปรียบเทียบระดับของ polymorphic RAPD bands ใน *Crassostrea* กับกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ในประเทศไทย (Tassanakajon et al., 1998) ใน *P. vanamei* ที่มาจาก Sinaloa และ Oaxaca ใน Mexico (Garcia et al., 1994) และ ปูทะเลสกุล *Scylla* จำนวน 3 สปีชีส์จากภาคตะวันออกของประเทศไทย (Klinbunga et al., 2000) กับเปอร์เซ็นต์ของ polymorphic bands ในหอยนางรม *Saccostrea* แต่ละสปีชีส์ (97.69% 99.40% และ 98.50% ใน *S. cucullata* *S. forskali* และ *S. mytiloides* ตามลำดับ) พบว่าหอยนางรม *Saccostrea* มีเปอร์เซ็นต์ของ polymorphic bands สูงกว่าในกลุ่มสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่กล่าวมา

ความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในแต่ละสปีชีส์ (genetic distance within a species) ของหอยนางรมสกุล *Crassostrea* มีค่าต่ำกว่าภายใน *S. cucullata* *S. forskali* และ *S. mytiloides* ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาทาง morphological (Brock, 1990) และ allozyme electrophoresis (Buroker et al., 1979; Hedgecock, 1995; Visootviseth et al., 1998)

ความแตกต่างทางพันธุกรรมของหอยนางรมที่ไม่รู้สปีชีส์ (unidentified species) มีค่าสูง โดยเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของแถบ DNA (polymorphic bands) ใน *Crassostrea* sp. และ *Saccostrea* sp. groups 1, 2 และ 3 มีค่าเท่ากับ 85.92%, 90.11%, 77.63% และ 89.55% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบ RAPD fragments หลายชิ้น ที่ความถี่ 100% (fixed frequencies) กับหอยนางรมแต่ละกลุ่มแต่ไม่พบในสปีชีส์อื่น ๆ และอาจจะใช้เป็น marker ที่จำเพาะในแต่ละกลุ่มได้

เมื่อนำค่า genetic distance ระหว่างคู่ของ geographic samples ที่ได้จากรAPD-PCR มาสร้างเป็น Neighbor-joining tree พบว่าสามารถแยกหอยนางรมสกุล *Crassostrea* และสกุล *Saccostrea* ได้อย่างชัดเจน ภายในสกุล *Crassostrea* ยังแสดงความแตกต่างระหว่างหอยนางรม *C. belcheri* ที่มาจากอ่าวไทย (ฝั่งตะวันออก) และทะเลอันดามัน (ตะวันตก) ได้

ส่วนภายในหอยนางรมสกุล *Saccostrea* พบว่าใน *S. cucullata* จะอยู่รวมเป็น monophyletic populations เช่นเดียวกับใน *S. mytiloides* ส่วนใน *S. forskali* แยกออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกสามารถแบ่งออกเป็นทางฝั่งอ่าวไทย (ตะวันออก) ประกอบด้วย จ. จันทบุรี (SfCT) อ. อ่างศิลา จ. ชลบุรี (SfCBS) จ. ประจวบคีรีขันธ์ (SfPJ) และ จ. สงขลา (SfSK) และทางฝั่งอันดามัน (ตะวันตก) ประกอบด้วย จ. ระนอง (SfRN) และ จ. สตูล (SfST) กลุ่มที่ 2 คือตัวอย่างที่เก็บจากเกาะสี่ช้าง จ. ชลบุรี (SfCTS) และเกาะปราบ จ. สุราษฎร์ธานี (SfSR) ซึ่งจากผล phylogenetic tree พบว่ากลุ่ม 2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *S. mytiloides* จากผลแสดงว่า การเรียกชื่อ *S. mytiloides* เป็น *Striostrea* (*Parastriostrea*) *mytiloides* ซึ่งอยู่คนละ genus กันนั้นไม่ถูกต้อง

II.2 PCR-RFLP

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของหอยนางรมในประเทศไทยด้วยวิธี PCR-RFLP ของ ยีน 16S rDNA, 18S rDNA และ COI พบว่าระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยนางรมมีค่าสูงเช่นเดียวกับผลที่ได้จาก RAPD-PCR โดยการจำแนกสปีชีส์ของหอยนางรม *C. belcheri*, *C. iredalei* และ *S. cucullata* สามารถทำได้โดยใช้ single haplotypes และ composite haplotypes ดังแสดงในตารางที่ 3.8 - 3.11 อย่างไรก็ตาม PCR-RFLP ยังไม่สามารถจำแนก *S. forskali* ออกจาก *S. mytiloides* เนื่องจากหอยนางรมทั้งสองชนิดมีจีโนมที่คล้ายคลึงกัน และค่า nucleotide divergence ระหว่างสองสปีชีส์นี้มีค่าต่ำมาก (ตาราง 3.13) ดังนั้น *S. mytiloides* ไม่ควรจัดอยู่ในสกุล *Striostrea* แต่ควรจัดอยู่ใน *Saccostrea*

ค่า haplotype diversity และ nucleotide diversity ภายในสปีชีส์ของหอยนางรมชนิด *Crassostrea* มีค่าต่ำกว่า *Saccostrea* (ตาราง 3.12) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองจาก RAPD-PCR และ ฐานวิธาน โดย *S. forskali* และ *S. mytiloides* มี nucleotide diversity ภายในสปีชีส์เท่ากับ 2.8711% และ 3.2388% ซึ่งสูงกว่าหอยนางรมชนิดอื่นๆมาก (0.0945% , 0.0912% และ 0.3501% ใน *C. belcheri*, *C. iredalei* และ *S. cucullata* ตามลำดับ) แสดงถึงความแปรผันทางพันธุกรรมที่สูงมากภายในสปีชีส์ดังกล่าว และสามารถอธิบายถึง high morphological variation ใน *S. forskali* และ *S. mytiloides* นอกจากนี้ยังพบว่า genetic variability ใน unidentified species ทั้ง 3 กลุ่มมีค่าสูงกว่าใน *C. belcheri*, *C. iredalei* และ *S. cucullata*

จาก phylogenetic relationships ของ composite haplotypes ที่ได้ (รูป 3.35 และ 3.36) แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *Crassostrea* และ *Saccostrea* อย่างชัดเจน ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง หอยนางรมแต่ละสปีชีส์ในกลุ่ม *Crassostrea* มีค่าสูงกว่าแต่ละสปีชีส์ภายในกลุ่ม *Saccostrea* ทั้งนี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *S. forskali* และ *S. mytiloides* ที่ได้จาก PCR-RFLP นั้นมีลักษณะเช่นเดียวกับผลที่ได้จากวิธี RAPD-PCR

III. Taxonomic difficulties ของหอยนางรมในประเทศไทย

จากการทดลองนี้พบหอยนางรม 2 ตัวที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็น *S. forskali*-like (Oys030) และ *C. iredalei*-like oysters (Oys039) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าหอยนางรม 2 ตัวนี้มี *C. iredalei*-specific markers ที่ 1250 bp เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPB08 นอกจากนี้ยังพบว่า Oy030 มี *C. iredalei*-specific markers ที่ 745 bp ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC210 แต่ไม่พบ markers อื่น ๆ การหายไปของ species-specific markers อาจจะมีผลมาจากการเกิดการผสมกลับกับหอยพ่อแม่พันธุ์ (introgressive hybridization) ระหว่าง *C. iredalei* และหอยนางรมสปีชีส์อื่น ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็น *S. forskali* เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างนี้ด้วย PCR-RFLP พบว่า Oys30 มีจีโนไทป์ XIII (DEDCBABCDF) ซึ่งพบในตัวอย่างส่วนใหญ่ของ *S. forskali* จึงสรุปได้ว่า Oys30 เป็น introgressive hybrid ที่มี *S. forskali* เป็น species ที่เป็นแม่ ส่วน Oys39 มีจีโนไทป์ V (BBBBAAAABC) ซึ่งพบเฉพาะใน *C. iredalei* แต่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Oys39 เป็น *S. forskali*-like ดังนั้น Oys39 ควรจัดเป็น hybrid ระหว่าง *C. iredalei* กับ *S. forskali* และ backcrossed กับ *C. iredalei* ซึ่งเป็น species แม่

หอยนางรม Oys095 และ Oys104 นั้นไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าเป็นสปีชีส์ใดโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้จำแนก Oy095 ว่าเป็นลูกผสมระหว่าง *C. belcheri* กับ *C. iredalei* ในขณะที่ Oy104 เป็น *C. iredalei*-like oyster จากการศึกษาด้วยเทคนิค RAPD พบว่า หอยนางรมทั้ง 2 ตัวนี้มี *C. iredalei*-specific markers ครบทั้ง 5 markers และไม่พบ *C. belcheri*-specific ใน Oy095 ดังนั้น หอยนางรม 2 ตัวนี้เป็น *C. iredalei* มากกว่าที่จะเป็นหอยนางรมลูกผสม เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างนี้ด้วย PCR-RFLP พบว่า Oys095 มีจีโนไทป์ LV (BBBBBAAAABC) :ซึ่งมีความแตกต่างจาก *C. iredalei* เพียง 1 mutation step และ Oys104 มีจีโนไทป์ V (BBBBAAAABC) ซึ่งพบเฉพาะใน *C. iredalei* ดังนั้นจึงสรุปว่า Oys095 และ Oys104 เป็น *C. iredalei* แต่แสดง ecomorphological variation

หอยนางรม Oys121 และ Oys122 สามารถจำแนกเป็น *Saccostrea* โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษาด้วยใช้ RAPD markers ไม่พบ species-specific markers ใดๆ และพบว่าหอยนางรม 2 ตัวนี้ไม่สามารถจำแนกได้ว่าเป็นสปีชีส์ใด จากการศึกษาด้วย PCR-RFLP ใน 18S และ 16S rDNA และ intergenic COI-COII ของตัวอย่างนี้ชี้ว่า Oys121 และ Oys122 น่าจะจัดเป็น *S. forskali*

ตัวอย่างจาก 4 กลุ่มประกอบด้วยหอยนางรมที่มาจากคลองบ่อท้อ จ.กระบี่ เกาะปราบ จ. สุราษฎร์ธานี เกาะหนูย จ. ระนอง และจาก จ. สมุทรสาครไม่สามารถจำแนกตามชื่อวิทยาศาสตร์ได้ จึงใช้ชื่อว่า *Crassostrea* sp. *Saccostrea* sp. group 1 *Saccostrea* sp. group 2 และ *Saccostrea* sp. group 3 ตามลำดับ ใน *Crassostrea* sp. ไม่พบ chomata แสดงว่าหอยนางรมชนิดนี้เป็นหอยนางรมที่อยู่ในสกุล *Crassostrea* และไม่พบ species-specific markers ทั้งใน *C. belcheri* และ *C. iredalei* ใน

ทุกตัวอย่างของ *Crassostrea* sp. เลย เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างกลุ่มนี้ด้วย PCR-RFLP พบว่า *Crassostrea* sp. มีจีโนไทป์ XLII (DIHABCAAFK) และ XLIII (CIHABCAAFL) ซึ่งไม่พบในตัวอย่างหอยนางรมชนิดใดๆในการทดลองนี้ และจากผลของ phylogenetic tree พบว่า *Crassostrea* sp. ได้แยกออกจาก *C. belcheri* และ *C. iredalei* อย่างชัดเจน ดังนั้นตัวอย่างนี้น่าจะเป็นหอยนางรมสกุล *Crassostrea* สปีชีส์ใหม่ในประเทศไทย ซึ่งก่อนหน้านี้ Dilokrattanatrakul (1998) ได้พบ *Crassostrea* sp. ที่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าเป็นสปีชีส์ใด ที่ Klong Thom (จ. กระบี่) แสดงว่าในประเทศไทยมีหอยนางรมในสกุล *Crassostrea* มากกว่า 2 สปีชีส์

ผลของ Phylogenetic tree ของ RAPD พบว่า *Saccostrea* sp. group 1 จากเกาะปราบ จ. สุราษฎร์ธานี มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *S. forskali* ที่มาจากที่เดียวกัน การขาด diagnostic RAPD markers ใน *S. forskali* และ *S. mytiloides* ทำให้ไม่สามารถจำแนกหอยนางรมในกลุ่มนี้ได้ และ phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างนี้ด้วย PCR-RFLP พบว่า *Saccostrea* sp. group 1 ควรจัดเป็น *S. forskali*

Saccostrea sp. group 2 จากเกาะหนู จ. ระนอง นับเป็นสปีชีส์ใหม่ โดยพบว่ามีหลาย RAPD fragments ที่พบในทุกตัวในหอยนางรมกลุ่มนี้ ไม่พบใน *S. forskali* และ *S. mytiloides* เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPA09 OPB01 OPB08 UBC210 และ UBC220 พบว่าค่าเฉลี่ย similarity index ภายในกลุ่มนี้สูงกว่าใน *Crassostrea* แต่ต่ำกว่าใน *Saccostrea* อื่น ๆ และไม่พบ 750 bp (OPB08) และ 1800 bp (UBC220) แสดงว่าหอยนางรมชนิดนี้ไม่ใช่ *S. cucullata* เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างกลุ่มนี้ด้วย PCR-RFLP พบว่า *Saccostrea* sp. group 2 มี genotypes XLIV (JJFCBBBBGM), XLV (JJFCBBBBGS) และ XLVI (JJFCBBBBGV) ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ นอกจากนี้ ผลของ Phylogenetic tree จาก RAPD-PCR และ PCR-RFLP ได้แยก *Saccostrea* sp. group 2 เป็นกิ่งใหม่ออกมาจาก *S. cucullata* ซึ่งช่วยในการสนับสนุนข้อสรุปว่าหอยนางรมชนิดนี้ไม่ใช่ *S. cucullata* ดังนั้นจึงสรุปว่า หอยนางรมในกลุ่มนี้คือ หอยนางรมสปีชีส์ใหม่ในประเทศไทย

Saccostrea sp. group 3 ที่เก็บจากจ.สมุทรสาคร ได้จำแนกเบื้องต้นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่าเป็น *S. mytiloides*-like oysters ผลของ Phylogenetic tree จาก RAPD แสดงให้เห็นว่า หอยนางรมกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *S. mytiloides* ที่มาจากที่เดียวกันมากกว่าที่มาจาก จ. ระนองและจ. ภูเก็ต เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างกลุ่มนี้ด้วย PCR-RFLP พบว่า *Saccostrea* sp. group 3 มี genotypes XIII (DEDCBABCDF) และ XIV (DEDABABCDF) ซึ่งพบทั้งใน *S. forskali* และ *S. mytiloides* ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดว่าหอยนางรมกลุ่มนี้ควรจัดให้เป็น *S. forskali* หรือ *S. mytiloides*

หอยนางรมสกุล *Saccostrea* สามารถแปรตามสิ่งแวดล้อมที่อยู่อาศัยได้ (Tack et al., 1992) ดังนั้นหอยนางรม 2 สปีชีส์ที่อยู่ที่เดียวกันอาจจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน และอาจทำ

ให้มีการจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกันได้ ในทางตรงกันข้ามหอยนางรมสปีชีส์เดียวกันที่อยู่คนละแหล่ง อาจมีลักษณะที่แตกต่างกัน ทำให้การจำแนกสปีชีส์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นอาจทำได้ยาก จากผลของ Phylogenetic tree พบว่าภายในหอยนางรมสกุล *Saccostrea* ในประเทศไทยมีจำนวนสปีชีส์มากกว่าที่เคยมีรายงานไว้

ก่อนหน้านี้หอยนางรม *Saccostrea* ทั้งหมดในประเทศไทยได้สันนิษฐานว่าเป็น *S. cucullata* (Amonjaruchit, 1988) เพียงอย่างเดียว ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีหอยนางรมในสกุล *Saccostrea* อย่างน้อย 4 สปีชีส์ที่พบในประเทศไทย นอกจากนี้หอยนางรม *Saccostrea* ที่มาจาก อ. อ่างศิลา จ. ชลบุรี ได้ถูกจัดให้เป็น *S. commercialis* (Department of Fisheries, 1993) เมื่อนำตัวอย่างจากแหล่งนี้ (SfCBA) มาใช้ศึกษาผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าหอยนางรม *Saccostrea* ที่มาจาก อ. อ่างศิลา (จ. ชลบุรี) นี้ไม่ใช่ *S. commercialis* เพราะไม่พบ species-specific markers ของ *S. commercialis* ในหอยนางรมจากแหล่งนี้ และผลจาก Phylogenetic tree ของ RAPD และ PCR-RFLP พบว่าหอยนางรมจาก อ. อ่างศิลา จ. ชลบุรี (SfCBA) น่าจะเป็น *S. forskali*

Tsuchiya และ Liardwitayapasit (1986) ได้จำแนก small rock oysters ที่เก็บจากเกาะสีชัง (จ. ชลบุรี) ว่าเป็น *S. mordax* และมีรายงานว่า *S. mordax* คือ homospecific ของ *S. cucullata* เมื่อวิเคราะห์หอยนางรมจากแหล่งดังกล่าวด้วย RAPD analysis แต่อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาเราไม่พบ *S. cucullata*-specific markers ในตัวอย่างชุดนี้ ดังนั้นตัวอย่างหอยนางรมจากเกาะสีชังในการทดลองนี้ควรจัดเป็น *S. forskali*

Charoensit (1995) ได้ศึกษาการผสมข้ามสปีชีส์และข้ามสกุลของหอยนางรมระหว่าง *C. belcheri*, *C. iredalei* และ *S. cucullata* ในห้องทดลอง พบว่าลูกผสมของหอยนางรมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ข้ามสปีชีส์ระหว่าง *C. belcheri* กับ *C. iredalei* สามารถอยู่รอดถึงระยะ spat ในขณะที่การผสมพันธุ์ข้ามสกุลระหว่าง *C. iredalei* เพศเมีย และ *S. cucullata* เพศผู้สามารถผสมพันธุ์กันได้และให้ลูกหอยพันธุ์ผสมของหอยนางรมสกุลนี้ได้และพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของหอยพันธุ์ผสมสูงกว่า *S. cucullata* แต่ไม่ให้ผลแตกต่างจาก *C. iredalei* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และลักษณะของเปลือกหอยพันธุ์ผสมมีลักษณะของเปลือกอยู่ระหว่างหอยพ่อแม่พันธุ์ทั้งสอง อย่างไรก็ตาม *S. cucullata* ที่ใช้ในการศึกษารังนี้้นอาจจะไม่ใช่ *S. cucullata* จริง ๆ เนื่องมาจากการจำแนกชนิดของหอยนางรมขนาดเล็ก (*Saccostrea*) ให้ถูกต้องชัดเจนนั้นทำได้ค่อนข้างยาก ดังนั้นหอยนางรมในประเทศไทย ซึ่งแต่เดิมเคยเรียกชื่อหอยนางรมขนาดเล็กทั้งหมดว่าเป็น *S. cucullata* จึงควรจะมีการตรวจสอบว่าเป็น *S. cucullata* จริงหรือไม่ โดยอาจนำ species-specific markers สำหรับ *S. cucullata* มาช่วยในการจำแนกได้

IV. การโคลน RAPD fragment ที่จำเพาะต่อหอยนางรม *C. belcheri*

C. belcheri เป็นหอยนางรมที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ของไทยมากที่สุด (Charoensit, 1995) การคัดเลือกพันธุ์ลูกหอยและพ่อแม่พันธุ์ของหอยสปีชีสนี้ เป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงหอยนางรมชนิดนี้ในประเทศไทย แม้ว่า species-specific RAPD markers ที่พบในหอยนางรมที่สำคัญทั้ง 3 ชนิดจะใช้ในการตรวจได้โดยตรง แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค RAPD-PCR มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสถานะการทำ PCR อาจทำให้เกิดลักษณะ false negative ได้เนื่องจากเทคนิค RAPD ต้องการ DNA ที่มีคุณภาพดี แต่ DNA ที่ได้จากลูกหอยนางรมอาจมีคุณภาพไม่ดีพอสำหรับทำ RAPD ดังนั้นจึงทำการแก้ปัญหานี้ได้โดยเปลี่ยน *C. belcheri*-specific RAPD fragments ให้เป็น sequence-characterized amplified region (SCAR) markers (Weising et al., 1995)

แต่อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยไม่พยายามพัฒนา SCAR markers จาก *C. belcheri*-specific markers ทั้ง 10 markers เพราะ RAPD markers ที่มีขนาดมากกว่า 1000 bp (1650 bp และ 1550 bp จาก OPB08 2100 bp, 1400 bp และ 1250 bp จาก OPB01 และ 1050 bp จาก UBC220) จะทำให้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นทำได้ยาก และ RAPD marker ขนาด 250 bp จาก OPA09 มีขนาดเล็ก ทำให้มีพื้นที่น้อยสำหรับการออกแบบ PCR ไพรมเมอร์

Jones et al. (1997) ได้พัฒนา species-specific primers เพื่อใช้แยก Schistosoma-intermediate hosts ของ *Bulinus* taxa (Gastropoda : Planorbidae) โดยการเปลี่ยน RAPD markers ไปเป็น SCAR markers โดยการ clone และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RAPD marker ที่จำเพาะใน *B. senegalensis* และ *B. forskali* และออกแบบ PCR ไพรมเมอร์ โดยได้ products ที่จำเพาะกับ *B. forskali* มีขนาด 553 bp และใน *B. senegalensis* มีขนาด 564 bp และ 370 bp และได้ตรวจความจำเพาะของไพรมเมอร์อีกครั้งในแต่ละสปีชีส์ ผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นถึงการใช้ประโยชน์ของ RAPD-based marker ในการแยก species complexes ใน *Bulinus*

คณะผู้วิจัยได้ใช้หลักการเดียวกันโดยนำ *C. belcheri*-specific RAPD fragments จำนวน 3 ชิ้น (650 bp จาก OPB01 และ 835 bp และ 603 bp จาก OPB08) มาทำ cloning และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าขนาดของชิ้น insert ใน pPACB1 pPACB2 และ pPACB3 คือ 637 bp, 811 bp และ 563 bp ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 insert นี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ใน GenBank ไม่พบว่ามี ความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตใด จึงได้ออกแบบ PCR ไพรมเมอร์ pPACB1-F/R, pPACB2-F/R และ pPACB3-F/R จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละโคลน และนำมาทำ PCR โดยใช้ DNA ของ *C. belcheri* เป็น DNA ต้นแบบ พบว่าขนาดของ PCR products

ที่ได้เท่ากับขนาดของ DNA ที่คาดหมายจากลำดับนิวคลีโอไทด์คือ ขนาด 536 bp 600 bp และ 506 bp ตามลำดับ

การทดสอบ sensitivity ของแต่ละคู่ของไพรเมอร์ พบว่าทั้ง 3 คู่ของไพรเมอร์สามารถตรวจ DNA ของ *C. belcheri* ได้น้อยถึงประมาณ 30 pg ระดับของ sensitivity ที่ตรวจได้สามารถที่จะนำมาใช้ในการศึกษาการกระจายตัวของตัวอ่อนของหอยนางรมสปีชีส์นี้ในหลาย ๆ พื้นที่ในประเทศไทยได้ จากนั้นจึงเลือกคู่ของไพรเมอร์ pPACB1-F/R มาใช้ตรวจสอบความจำเพาะต่อ *C. belcheri* กับตัวอย่างหอยทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ พบว่าไพรเมอร์คู่นี้สามารถให้ PCR product ขนาด 536 bp ใน *C. belcheri* เท่านั้นโดยไม่พบ PCR products ในตัวอย่างหอยสปีชีส์อื่นๆ

ผลการทดลองนี้ได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนา species-specific SCAR marker ของ *C. belcheri* (pPACB1F/R) ในประเทศไทย โดย SCAR marker นี้ และ markers อื่น ๆ (pPACB2F/R, pPACB3F/R และ RAPD markers) สามารถนำมาใช้ช่วยในการจำแนก และคัดเลือกลูกหอยและพ่อแม่พันธุ์ของ *C. belcheri* ได้ถูกต้องแม่นยำ เพื่อที่จะเป็นส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงของหอยนางรมที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ของไทย

V. การประยุกต์ใช้ข้อมูลของความหลากหลายทางพันธุกรรม และเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อหอยนางรม 3 สปีชีส์ในประเทศไทย

เครื่องหมาย pPACB1 F/R เป็น species-specific marker และยังสามารถนำมาใช้ตรวจสอบการแพร่กระจาย (distributions) และ recruitment ของตัวอ่อนในหอยนางรมชนิด *C. belcheri* ระยะต่างๆ ข้อมูลที่ได้นี้จะช่วยเพิ่มความรู้และความเข้าใจชีววิทยาของ *C. belcheri* มากขึ้น

ในขณะที่ RAPD และ mtDNA composite haplotypes ที่จำเพาะต่อชนิดที่พบใน *C. belcheri*, *C. iredalei* และ *S. cucullata* สามารถนำมาใช้ช่วยในการคัดเลือกสปีชีส์ของพ่อแม่พันธุ์ และลูกหอยนางรมเพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงได้อย่างถูกต้อง และ markers เหล่านี้สามารถนำมาใช้ศึกษารูปแบบการกระจายและการลงเกาะตัวของตัวอ่อนหอยนางรม (distributions and recruitment) ทั้ง 3 ชนิดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการจัดการในการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทย

ในการศึกษารั้งนี้ยังพบ *C. iredalei*-specific RAPD fragments ที่สามารถใช้อันตรกิริยาเกิด introgressive hybridization ของตัวอย่างได้ ซึ่งถ้าใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะจำแนกได้เป็น *S. forskali*-like หรือ *C. iredalei*-like oysters เท่านั้น สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่า ต่อไปอาจมีการพัฒนา SCAR markers ของหอยนางรมสปีชีส์นี้เพื่อใช้สำหรับการจำแนกทางอนุกรมวิธาน และตรวจ interspecific hybridization ของหอยนางรมที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงในประเทศไทย

ในเดือนธันวาคม ปี 2537 เกิดการตาย ของพ่อแม่พันธุ์ของหอยนางรม *C. belcheri* ใน จ. สุราษฎร์ธานีประมาณ 90% ซึ่งหอยนางรมสปีชีส์นี้เป็นสปีชีส์ที่มีการเพาะเลี้ยงกันมากในประเทศไทย

ไทย สิ่งที่เกิดขึ้นนั้นทำให้ต้องเร่งให้มีโปรแกรมการจัดการพ่อแม่พันธุ์ *C. belcheri* ที่เหมาะสม จากการศึกษาครั้งนี้แสดงถึง high genetic heterogenous ของหอยนางรมในสกุล *Crassostrea* และ *Saccostrea* ดังนั้นควรมีการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของ gene pool ในพันธุกรรมของหอยนางรมในประเทศไทย

ในการศึกษาครั้งนี้แสดงถึงการใช้เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ ในการตรวจสอบความหลากหลายที่สูงของหอยนางรมในประเทศไทย และพบหลาย species-specific fragments ใน *C. belcheri*, *C. iredalei* และ *S. cucullata* เครื่องหมายทางพันธุกรรมเหล่านี้สามารถที่จะนำมาช่วยในการเพาะเลี้ยงหอยนางรม เช่น ช่วยในการคัดเลือกสปีชีส์ของพ่อแม่พันธุ์ และลูกหอย และศึกษารูปแบบของการกระจายตัวและการพัฒนาของลูกหอยนางรมในประเทศไทยได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยนางรม 5 ชนิด ในประเทศไทยประกอบด้วย *C. belcheri*, *C. iredalei*, *Saccostrea cucullata*, *S. forskalii* และ *S. mytiloides* ด้วยวิธี RAPD และ PCR-RFLP พบว่าหอยนางรมสกุล *Saccostrea* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงกว่าหอยนางรมสกุล *Crassostrea*
2. จากวิธี RAPD-PCR พบเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อหอยนางรมชนิด *C. belcheri*, *C. iredalei* และ *S. cucullata* จำนวน 10, 5 และ 2 แถบ ตามลำดับ
3. ทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ *C. belcheri* จำนวน 3 แถบ จากนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแต่ละ recombinant clone โดยไพรเมอร์แต่ละคู่มีความไวต่อการตรวจสอบดีเอ็นเอของ *C. belcheri* ที่มีความเข้มข้นเพียง 30 พิโคกรัม และไพรเมอร์ pPACB1-F/R ให้เครื่องหมายทางพันธุกรรมขนาด 536 คู่เบสที่จำเพาะต่อ *C. belcheri* เท่านั้น
4. การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างหอยนางรมในประเทศไทยด้วยวิธี PCR-RFLP ของยีน 16S r DNA, 18S rDNA และ COI พบ composite haplotypes จำนวน 54 haplotypes โดย composite haplotypes I, II และ III พบเฉพาะใน *C. belcheri* ส่วน composite haplotypes IV, V และ VI พบเฉพาะใน *C. iredalei* และ composite haplotypes VII – XI พบใน *S. cucullata* เท่านั้น
5. จากการศึกษาครั้งนี้พบหอยนางรมชนิดใหม่ที่ยังไม่ทราบว่ามีชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องว่าอะไร จำนวน 2 ชนิด คือ *Crassostrea* sp. (CsKB) จากกระบี่ และ *Saccostrea* sp. group 2 (S2RN) จากรนอง จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมให้แน่ชัดทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและด้านพันธุศาสตร์ว่าตัวอย่างดังกล่าวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่าอะไร
6. จากการศึกษาทางพันธุกรรมแสดงว่า *S. mytiloides* ไม่ควรเปลี่ยนชื่อวิทยาศาสตร์เป็น *Striostrea* (*parastristrea*) *mytiloides* แต่ควรใช้ชื่อเดิม เนื่องจาก *S. mytiloides* ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับ *S. forskalii* มาก โดย phylogenetic relationships แสดงให้เห็นว่า *S. mytiloides* เป็น sister taxa ของ *S. forskalii* แทนที่จะเป็นหอยนางรม *Saccostrea* ชนิดอื่นๆที่ใช้ในการทดลองนี้

เอกสารอ้างอิง

- วิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, กอง. 2530. เศรษฐกิจการผลิตและการตลาดหอยนางรม. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 50 หน้า.
- ชุติมา ดันติกิตติ. 2525. อิทธิพลของช่วงเวลาการไหลเวียนน้ำและลักษณะการวางวัสดุให้หอยเกาะที่มีผลต่อการเติบโตของหอยนางรมปากจีบ (*Crassostrea commercialis* Iredale & Roughley). วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ประมง, กรม. 2536. คู่มือการเพาะเลี้ยงหอยนางรม. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 47 หน้า.
- วันทนา อยู่สุข. 2531. หอยนางรมของไทย. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 16 หน้า.
- สมชัย บุศราวิช. 2539. อนุกรมวิธานของหอยนางรมปากจีบในประเทศไทย(บทคัดย่อ). เสนอในการประชุมวิชาการประมง. หน้า 117.
- Amornjaruchit, S. 1988. Economically important mulluscan shellfish of Thailand, In F.W. McCoy and T. Chongpeepien (eds), Bivalve mollusc culture research in Thailand. *TCLARM Technical Reports* 19: 1-18.
- Banks, M.A., Hedgecock, D., and Waters, C. 1993. Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2: 129-136.
- Boom, J.D.G., Boulding, E.G., and Beckenbach, A.T. 1994. Mitochondrial DNA variation in introduced populations of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in British Columbia. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 51: 1608-1614.
- Boudry, P., Heurtebise, S., Collet, B., Cornette, F., and Gerard, A. 1998. Differentiation between populations of the Portuguese oysters, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reveal by mtDNA RFLP analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 226: 279-291.

- Brock, V. 1990. Intergeneric distances between *Ostrea*, *Crassostrea*, and *Saccostrea*, studied by means of crossed immunoelectrophoresis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 68: 59-63.
- Brohmanonda, P., Mutarasint, K., Chongpeepien, T., and Amornjaruchit, S. 1988. Oyster culture in Thailand. In F.W. McCoy and T. Chongpeepien (eds), Bivalve mollusc culture research in Thailand. *TCLARM Technical Reports* 19: 31-39.
- Buroker, N.E., Hershberger, W.K., and Chew, K.K. 1979. Population genetics of the family Ostreidae. II. Interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Mar. Biol.* 54: 171-184.
- Chambers, R.J., McQuaid, C.D., and Kirby, R. 1998. The use of randomly amplified polymorphic DNA to analyze the genetic diversity, the systematic relationships and the evolution of intertidal limpets, *Siphonaria* spp. (Pulmonata: Gastropoda), with different reproductive modes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 227: 49-66.
- Charoensit, P. 1995. *Hybridization in commercial oysters*. Master's Thesis, Department of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Department of Fisheries. 1999a. *Fisheries Statistics of Thailand 1996*. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperative.
- Department of Fisheries. 1999b. *Marine Fishery Census Whole Country 1996*. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperative.
- Department of Fisheries. 1993. *Manual for cultivation of oysters*. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture.
- Dilokrattanatrakul, C. 1998. *Morphological and numerical taxonomy of oysters in Thailand*. M.Sc. Thesis. Mahidol University, Thailand, 141 pp.
- Felsenstein, J. 1993. *Phylip (Phylogenetic Inference Package) version 3.5c*. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Garcia, D. K., and Benzie, J. A. H. 1995. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programmes. *Aquaculture* 130 : 137-144.
- Garcia, D.K., Faggart, M.A., Rhoades, L., Alcivar-Warren, A.A., Wyban, J.A., Carr, W.H., Sweeney, J.N. and Ebert, K.M. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 270-280.

- Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1: 55-63.
- Harry, H.W. 1985. Synopsis of the supraspecific classification of living oysters (Bivalvia: Gryphaeidae and Ostreidae). *Veliger* 28: 121-158.
- Hedgecock, D., and Okazaki, N.B. 1984. Genetic diversity within and between populations of American oysters (*Crassostrea*). *Malacologia* 25: 535-549.
- Hedgecock, D. 1995. The cupped oyster and the Pacific oyster. In: Thorpe, J., Gall, G., Lannan, J., and Nash, C. (eds.), *Conservation of Fish and Shellfish Resources: Managing Diversity*, London: Academic Press. pp. 115-137.
- Hirschfeld, B.M., Dhar, A.K., Rask, K., and Alcivar-Warren, A. 1999. Genetic diversity in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from Massachusetts using the RAPD technique. *J. Shellfish Res.* 18: 121-125.
- Hoelzel, A.R., and Green, A. (1992). Population – level variation by sequencing PCR – amplified DNA. In: Hoelzel, A.R. (ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations*, Oxford: Oxford University Press, 159-187.
- Hu, Y-P., and Foltz, D. 1996. Genetic of scnDNA polymorphisms in juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) Part I: Characterizing the inheritance of polymorphisms in controlled crosses. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5: 123-129.
- Jones, C.S., Noble, L.R., Lockyer, A.E., Brown, D.S. and Rollinson, D. 1997. Species-specific primers discriminate schistosoma intermediate hosts: unambiguous PCR diagnostic of *Bulinus forskali* group taxa (Gastropoda: Planorbidae). *Mol. Ecol.* 6: 843-849.
- Karl, S.A. and Avise, J.C. 1992. Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLPs. *Science* 256: 100-102.
- Karl, S.A. and Avise, J.C. 1993. PCR-based assays of Mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA: techniques and applications for population genetics. *Mol. Biol. Evol.* 10: 342-361.
- Klinbunga, S., Boonyapakdee, A., and Pratoomchat. B. 2000b. Genetic diversity and species diagnostic markers of mud crabs (Genus *Scylla*) in eastern Thailand determined by RAPD analysis. *Mar. Biotechnol.* 2: 180-187.

- Lynch, M. 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.* 7:478-484.
- McElroy, D., P. Moran, E. Birmingham and I. Kornfield, 1991. *REAP (Restriction Enzyme Analysis Package) version 4.0*. University of Maine, Orono, Maine, USA.
- Nei, M. and Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 5269-5273.
- Okurama, B., Jones, C.S., and Noble, L.R. 1993. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of clonal population structure and geographic variation in a freshwater bryozoan. *Pro. R. Soc. Lond. B* 253: 147-154.
- Palumbi, S.R., Martin, A., Pomano, S., McMillan, W.O., Stice, L., and Grabowski, G. (1991). *The Simple Fool's Guide to PCR, version 2*. University of Hawaii, Zoology Department, Honolulu, HI.
- Patwary, M. U., Kenchington, E. L., Bird, C. J. and Zouros, E. 1994. The use of random amplified polymorphic DNA markers in genetic studies of the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). *J. Shellfish Res.* 13: 547-553.
- Reeb, C.A., and Avise, J.C. 1990. A genetic discontinuity in a continuously distributed species: mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics* 124: 397-406.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Small, M.P., and Chapman, R.W. 1997. Intraspecific variation in the 16S ribosomal gene of *Crassostrea virginica*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 6:189-196.
- Sihanuntavong, D., Sittipraneed, S. and Klinbunga, S. 1999. Mitochondrial DNA diversity and population structure of the honey bee (*Apis cerana*) in Thailand. *J. Apicultural Res.* 38: 211 - 219
- Stothard, J.R., and Rollinson, D. 1996. An evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for the identification and phylogeny of freshwater snails of the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *J. Moll. Stud.* 62: 165-176.
- Tack, J. F., Berghe, E. and Polk, P. H. 1992. Ecomorphology of *Crassostrea cucullata* (Born, 1778) (Ostreidae) in a mangrove creek (Gazi, Kenya). *Hydrobiologia* 247: 109-117.

- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Jarayabhand, P., Klinbunga, S. and Boonsaeng, V. 1998. Genetic structure in wild populations of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Mar. Biotechnol.* 6: 249-254.
- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Rimphanitchayakit, V., Jarayabhand, P. and Boonsaeng, V. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6: 110-115.
- Tookwinus, S. 1991. Coastal aquaculture and sea farming in Thailand, *Proceedings of the First Workshop of the Tropical Marine Mollusc Programme (TMMD)*, Phuket Marine Biological Center, Thailand 12-18 August. 82-83.
- Tsuchiya, M. and Lirdwitayapaisit, T. 1986. Distribution of intertidal animals on rocky shores of the Si Chang Island, the Gulf of Thailand. *Galaxea*. 5: 15-25.
- Vincent, J., Pestka, S.B., and Pestka, S. (1993). Cloning of polymerase chain reaction – generated DNA containing terminal restriction endonuclease recognition sites. In: Wu, R. (ed.), *Methods in Enzymology Vol. 218: Recombinant DNA Part I*, San Diego: Academic Press, Inc., 357-368.
- Visootviseth, P., Day, A., and Siwadune, T. 1998. Electrophoretic and morphometric analyses in species differentiation of small oysters, *Saccostrea* spp., in Thailand. *J. Sci. Soc. Thailand*. 24: 24-36.
- Weising, K., Nybom, H., Wolf, K., and Meyer, W 1995. *DNA Fingerprinting In Plant and Fungi*. Boca Raton, F. L.:CRC Press, 322 pp.
- Welsh, J., and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Yoosukh, W. 2000. Taxonomic account of oysters in Thailand. *Proceeding of Aquaculture and Genetics of Tropical Oyster*. 1-2 May 1997, Ranong, Thailand (in press).

ภาคผนวก 1

สถานที่เก็บตัวอย่าง, วันที่เก็บ และสปีชีส์ของหอยนางรมที่จำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตัวอย่าง	Code of samples	Location	Date of collection	Species (Morphology)
สุราษฎร์ธานี 1	Cb 001	สุราษฎร์ธานี	16/03/1999	<i>C. belcheri</i>
สุราษฎร์ธานี 2	Cb 002	สุราษฎร์ธานี	16/03/1999	<i>C. belcheri</i>
สุราษฎร์ธานี 3	Cb 003	สุราษฎร์ธานี	16/03/1999	<i>C. belcheri</i>
สุราษฎร์ธานี 4	Cb 004	สุราษฎร์ธานี	16/03/1999	<i>C. belcheri</i>
สุราษฎร์ธานี 5	Cb 005	สุราษฎร์ธานี	16/03/1999	<i>C. belcheri</i>
สุราษฎร์ธานี 6	Cb 006	สุราษฎร์ธานี	16/03/1999	<i>C. belcheri</i>
สุราษฎร์ธานี 7	Cb 007	สุราษฎร์ธานี	16/03/1999	<i>C. belcheri</i>
สุราษฎร์ธานี 8	Cb 008	สุราษฎร์ธานี	16/03/1999	<i>C. belcheri</i>
สุราษฎร์ธานี 9	Cb 009	สุราษฎร์ธานี	16/03/1999	<i>C. belcheri</i>
สุราษฎร์ธานี 10	Cb 010	สุราษฎร์ธานี	16/03/1999	<i>C. belcheri</i>
NTc 1 040698	Cb 011	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอแหลมอม)	04/06/1998	<i>C. belcheri</i>
NTc 2 040698	Cb 012	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอแหลมอม)	04/06/1998	<i>C. belcheri</i>
NTc 3 040698	Cb 013	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอแหลมอม)	04/06/1998	<i>C. belcheri</i>
NTc 4 040698	Cb 014	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอแหลมอม)	04/06/1998	<i>C. belcheri</i>
KYc 2 010698	Cb 015	จ. ระนอง (อำเภอเขาชัย อ. สุราษฎร์ธานี)	01/06/1998	<i>C. belcheri</i>
KYc 3 010698	Cb 016	จ. ระนอง (อำเภอเขาชัย อ. สุราษฎร์ธานี)	01/06/1998	<i>C. belcheri</i>
KYc 4 010698	Cb 017	จ. ระนอง (อำเภอเขาชัย อ. สุราษฎร์ธานี)	01/06/1998	<i>C. belcheri</i>
BTa 1 070498	Cb 018	จ. กระบี่ (ร้านอาหารบ่อท่อ)	07/04/1998	<i>C. belcheri</i>
BTa 2 070498	Cb 019	จ. กระบี่ (ร้านอาหารบ่อท่อ)	07/04/1998	<i>C. belcheri</i>
BTa 4 070498	Cb 020	จ. กระบี่ (ร้านอาหารบ่อท่อ)	07/04/1998	<i>C. belcheri</i>
ศรีราชา 1	Ci 021	จ. ชลบุรี (อ. ศรีราชา)	06/10/1998	<i>C. iredalei</i>
ศรีราชา 2	Ci 022	จ. ชลบุรี (อ. ศรีราชา)	06/10/1998	<i>C. iredalei</i>
ศรีราชา 3	Ci 023	จ. ชลบุรี (อ. ศรีราชา)	06/10/1998	<i>C. iredalei</i>
ศรีราชา 4	Ci 024	จ. ชลบุรี (อ. ศรีราชา)	06/10/1998	<i>C. iredalei</i>
ศรีราชา 5	Ci 025	จ. ชลบุรี (อ. ศรีราชา)	06/10/1998	<i>C. iredalei</i>
ศรีราชา 6	Ci 026	จ. ชลบุรี (อ. ศรีราชา)	06/10/1998	<i>C. iredalei</i>
KBa 3 020698	Ci 027	จ. ประจวบคีรีขันธ์ (คลองบางนางรม ต. คลองวาฬ)	02/06/1998	<i>C. iredalei</i>
KBb 6 020698	Ci 028	จ. ประจวบคีรีขันธ์ (คลองบางนางรม ต. คลองวาฬ)	02/06/1998	<i>C. iredalei</i>
KBb 7 020698	Ci 029	จ. ประจวบคีรีขันธ์ (คลองบางนางรม ต. คลองวาฬ)	02/06/1998	<i>C. iredalei</i>
KBb 9 020698	*Oy 030	จ. ประจวบคีรีขันธ์ (คลองบางนางรม ต. คลองวาฬ)	02/06/1998	<i>S. forskalli</i> -like oyster
KBb 10 020698	Ci 031	จ. ประจวบคีรีขันธ์ (คลองบางนางรม ต. คลองวาฬ)	02/06/1998	<i>C. iredalei</i>

Code of samples		Location	Date of collection	Species (morphology)
NTb 5 040698	Ci 032	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอหาดหมอม)	04/06/1998	<i>C. iredalei</i>
NTb 6 040698	Ci 033	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอหาดหมอม)	04/06/1998	<i>C. iredalei</i>
NTb 7 040698	Ci 034	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอหาดหมอม)	04/06/1998	<i>C. iredalei</i>
NTb 8 040698	Ci 035	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอหาดหมอม)	04/06/1998	<i>C. iredalei</i>
NTb 9 040698	Ci 036	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอหาดหมอม)	04/06/1998	<i>C. iredalei</i>
NTb 10 040698	Ci 037	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอหาดหมอม)	04/06/1998	<i>C. iredalei</i>
KYb 1 010698	*Ci 038	จ. ระนอง (อำเภอเขาชัย อ. สุธาส์ราญ)	01/06/1998	<i>C. iredalei</i>
KYb 2 010698	*Oy 039	จ. ระนอง (อำเภอเขาชัย อ. สุธาส์ราญ)	01/06/1998	<i>C. iredalei</i> -like oyster
KKa 1 070498	Ci 040	จ. พังงา (คลองบ้านเก่า โคกไคร)	07/04/1998	<i>C. iredalei</i>
KKa 2 070498	Ci 041	จ. พังงา (คลองบ้านเก่า โคกไคร)	07/04/1998	<i>C. iredalei</i>
KKa 4 070498	Ci 042	จ. พังงา (คลองบ้านเก่า โคกไคร)	07/04/1998	<i>C. iredalei</i>
KKa 5 070498	Ci 043	จ. พังงา (คลองบ้านเก่า โคกไคร)	07/04/1998	<i>C. iredalei</i>
KGa 1 010398	Sc 044	จ. ตรัง (เกาะผี)	01/08/1998	<i>S. cucullata</i>
KGa 2 010398	Sc 045	จ. ตรัง (เกาะผี)	01/08/1998	<i>S. cucullata</i>
KGa 4 010398	Sc 046	จ. ตรัง (เกาะผี)	01/08/1998	<i>S. cucullata</i>
KGa 5 010398	Sc 047	จ. ตรัง (เกาะผี)	01/08/1998	<i>S. cucullata</i>
KGa 6 010398	Sc 048	จ. ตรัง (เกาะผี)	01/08/1998	<i>S. cucullata</i>
เกาะหนู A 1	Sc 049	จ. ตรัง (เกาะผี)	01/08/1998	<i>S. cucullata</i>
เกาะหนู A 2	Sc 050	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>S. cucullata</i>
เกาะหนู A 3	Sc 051	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>S. cucullata</i>
เกาะหนู A 4	Sc 052	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>S. cucullata</i>
เกาะหนู A 5	Sc 053	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>S. cucullata</i>
เกาะหนู A 6	Sc 054	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>S. cucullata</i>
เกาะหนู B 10	Sc 055	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>S. cucullata</i>
ALa 1 080498	Sc 056	จ. ภูเก็ต (เกาะแสด)	08/04/1998	<i>S. cucullata</i>
ALa B 080498	Sc 057	จ. ภูเก็ต (เกาะแสด)	08/04/1998	<i>S. cucullata</i>
ALa D 080498	Sc 058	จ. ภูเก็ต (เกาะแสด)	08/04/1998	<i>S. cucullata</i>
ALa G 080498	Sc 059	จ. ภูเก็ต (เกาะแสด)	08/04/1998	<i>S. cucullata</i>
ALa E 080498	Sc 060	จ. ภูเก็ต (เกาะแสด)	08/04/1998	<i>S. cucullata</i>
ALa A 080498	Sc 061	จ. ภูเก็ต (เกาะแสด)	08/04/1998	<i>S. cucullata</i>
BHd 1 210598	Sc 062	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. cucullata</i>
BHd 2 210598	Sc 063	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. cucullata</i>
BHd 3 210598	Sf 064	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
BHd 4 210598	Sc 065	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. cucullata</i>
BHd 5 210598	Sc 066	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. cucullata</i>
BHd 6 210598	Sc 067	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. cucullata</i>

Code of samples		Location	Date of collection	Species
ASa 2 170298	Sf 068	จ. ชลบุรี (อ่างศิลา)	17/02/1998	<i>S. forskali</i>
ASa 3 170298	Sf 069	จ. ชลบุรี (อ่างศิลา)	17/02/1998	<i>S. forskali</i>
ASa 4 170298	Sf 070	จ. ชลบุรี (อ่างศิลา)	17/02/1998	<i>S. forskali</i>
ASa 5 170298	Sf 071	จ. ชลบุรี (อ่างศิลา)	17/02/1998	<i>S. forskali</i>
BHa 1 210598	Sc 072	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. cucullata</i>
BHa 4 210598	Sc 073	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. cucullata</i>
BHa 5 210598	Sc 074	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. cucullata</i>
BHa 1 210598	Sf 075	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
BHb 2 210598	Sf 076	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
BHb 3 210598	Sf 077	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
BHb 4 210598	Sf 078	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
BHb 5 210598	Sf 079	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
PBa 1 040898	Sf 080	จ. สตูล (บ้านปากบารา อ. ละงู)	04/08/1998	<i>S. forskali</i>
PBa 2 040898	Sf 081	จ. สตูล (บ้านปากบารา อ. ละงู)	04/08/1998	<i>S. forskali</i>
PBa 3 040898	Sf 082	จ. สตูล (บ้านปากบารา อ. ละงู)	04/08/1998	<i>S. forskali</i>
PBa 4 040898	Sf 083	จ. สตูล (บ้านปากบารา อ. ละงู)	04/08/1998	<i>S. forskali</i>
PBa 5 040898	Sf 084	จ. สตูล (บ้านปากบารา อ. ละงู)	04/08/1998	<i>S. forskali</i>
PBa 6 040898	Sf 085	จ. สตูล (บ้านปากบารา อ. ละงู)	04/08/1998	<i>S. forskali</i>
KYa 1 010698	Sf 086	จ. ระนอง (อำเภอเขาชัย อ. หุขสาราญ)	01/06/1998	<i>S. forskali</i>
KYa 2 010698	Sf 087	จ. ระนอง (อำเภอเขาชัย อ. หุขสาราญ)	01/06/1998	<i>S. forskali</i>
KYa 3 010698	Sf 088	จ. ระนอง (อำเภอเขาชัย อ. หุขสาราญ)	01/06/1998	<i>S. forskali</i>
KYa 4 010698	Sf 089	จ. ระนอง (อำเภอเขาชัย อ. หุขสาราญ)	01/06/1998	<i>S. forskali</i>
KYa 5 010698	Sf 090	จ. ระนอง (อำเภอเขาชัย อ. หุขสาราญ)	01/06/1998	<i>S. forskali</i>
KYa 6 010698	Sf 091	จ. ระนอง (อำเภอเขาชัย อ. หุขสาราญ)	01/06/1998	<i>S. forskali</i>
KBa 4 020698	Sf 092	จ. ประจวบคีรีขันธ์ (คลองบางนางรม ต. คลองวาฬ)	02/06/1998	<i>S. forskali</i>
KBa 5 020698	Sf 093	จ. ประจวบคีรีขันธ์ (คลองบางนางรม ต. คลองวาฬ)	02/06/1998	<i>S. forskali</i>
KBa 6 020698	Sf 094	จ. ประจวบคีรีขันธ์ (คลองบางนางรม ต. คลองวาฬ)	02/06/1998	<i>S. forskali</i>
KBb 8 020698	*Oy 095	จ. ประจวบคีรีขันธ์ (คลองบางนางรม ต. คลองวาฬ)	02/06/1998	A hybrid between <i>C. iredalei</i> and <i>C. belcheri</i>
NTa 1 040698	Sf 096	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอนาหม่อม)	04/06/1998	<i>S. forskali</i>
NTa 2 040698	Sf 097	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอนาหม่อม)	04/06/1998	<i>S. forskali</i>
NTa 3 040698	Sf 098	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอนาหม่อม)	04/06/1998	<i>S. forskali</i>
NTa 4 040698	Sf 099	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอนาหม่อม)	04/06/1998	<i>S. forskali</i>
NTa 5 040698	Sf 100	จ. สงขลา (บ้านนาทับ, กิ่งอำเภอนาหม่อม)	04/06/1998	<i>S. forskali</i>

Code of samples		Location	Date of collection	Species
เกาะสีชัง 1	Sf 101	จ. ชลบุรี (เกาะสีชัง)	07/05/1999	<i>S. forskali</i>
เกาะสีชัง 2	Sf 102	จ. ชลบุรี (เกาะสีชัง)	07/05/1999	<i>S. forskali</i>
เกาะสีชัง 3	Sf 103	จ. ชลบุรี (เกาะสีชัง)	07/05/1999	<i>S. forskali</i>
เกาะสีชัง 4	*Oy 104	จ. ชลบุรี (เกาะสีชัง)	07/05/1999	<i>C. iredalei</i> -like oyster
เกาะสีชัง 5	Sf 105	จ. ชลบุรี (เกาะสีชัง)	07/05/1999	<i>S. forskali</i>
เกาะสีชัง 6	Sf 106	จ. ชลบุรี (เกาะสีชัง)	07/05/1999	<i>S. forskali</i>
เกาะสีชัง 7	Sf 107	จ. ชลบุรี (เกาะสีชัง)	07/05/1999	<i>S. forskali</i>
เกาะสีชัง 8	Sf 108	จ. ชลบุรี (เกาะสีชัง)	07/05/1999	<i>S. forskali</i>
เกาะสีชัง 9	Sf 109	จ. ชลบุรี (เกาะสีชัง)	07/05/1999	<i>S. forskali</i>
เกาะสีชัง 10	Sf 110	จ. ชลบุรี (เกาะสีชัง)	07/05/1999	<i>S. forskali</i>
เกาะสีชัง 11	Sf 111	จ. ชลบุรี (เกาะสีชัง)	07/05/1999	<i>S. forskali</i>
เกาะสีชัง 12	Sf 112	จ. ชลบุรี (เกาะสีชัง)	07/05/1999	<i>S. forskali</i>
KSa 8 210598	Sf 113	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
KSa 9 210598	*D 114	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>Dendostrea</i> sp.
KSa 10 210598	*D 115	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>D. folium</i>
KSa 11 210598	Sf 116	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
KSa 12 210598	*D 117	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>D. folium</i>
KSa 13 210598	Sf 118	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
KSa 14 210598	Sf 119	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
KSa 15 210598	Sf 120	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
BHa 2 210598	*Oy 121	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>Saccostrea</i> sp.-like oyster
BHa 3 210598	*Oy 122	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>Saccostrea</i> sp.-like oyster
BHa 6 210598	Sf 123	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
BHa 7 210598	Sf 124	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
BHa 8 210598	Sf 125	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
BHa 9 210598	Sf 126	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
KMa 2 210598	Sf 127	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
KMa 3 210598	Sm 128	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. mytiloides</i>
KMa 4 210598	Sm 129	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. mytiloides</i>
KMa 5 210598	Sf 130	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
KSa 5 210598	Sf 131	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
KSa 6 210598	Sf 132	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
KSa A 210598	*D 133	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>D. folium</i>
KSa B 210598	Sf 134	จ. จันทบุรี	21/05/1998	<i>S. forskali</i>
NBa 2 080498	Sm 135	จ. ภูเก็ต (อ่าวน้ำบ่อ แหวมพันวา)	08/04/1998	<i>S. mytiloides</i>
NBa 4 080498	Sm 136	จ. ภูเก็ต (อ่าวน้ำบ่อ แหวมพันวา)	08/04/1998	<i>S. mytiloides</i>
NBa 5 080498	Sm 137	จ. ภูเก็ต (อ่าวน้ำบ่อ แหวมพันวา)	08/04/1998	<i>S. mytiloides</i>
NBa 6 080498	Sm 138	จ. ภูเก็ต (อ่าวน้ำบ่อ แหวมพันวา)	08/04/1998	<i>S. mytiloides</i>

Code of samples		Location	Date of collection	Species
KP 1 090199	Sm 139	จ. ระนอง	09/01/1999	<i>S. mytiloides</i>
KP 2 090199	Sm 140	จ. ระนอง	09/01/1999	<i>S. mytiloides</i>
KP 3 090199	Sm 141	จ. ระนอง	09/01/1999	<i>S. mytiloides</i>
KP 4 090199	Sm 142	จ. ระนอง	09/01/1999	<i>S. mytiloides</i>
KP 5 090199	Sm 143	จ. ระนอง	09/01/1999	<i>S. mytiloides</i>
KP 6 090199	Sm 144	จ. ระนอง	09/01/1999	<i>S. mytiloides</i>
SSa 1 101299	Sm 145	จ. สมุทรสาคร	10/12/1999	<i>S. mytiloides</i>
SSa 2 101299	Sm 146	จ. สมุทรสาคร	10/12/1999	<i>S. mytiloides</i>
SSa 3 101299	Sm 147	จ. สมุทรสาคร	10/12/1999	<i>S. mytiloides</i>
SSa 4 101299	Sm 148	จ. สมุทรสาคร	10/12/1999	<i>S. mytiloides</i>
SSa 5 101299	Sm 149	จ. สมุทรสาคร	10/12/1999	<i>S. mytiloides</i>
KP 7 090199	Sm 150	จ. ระนอง	09/01/1999	<i>S. mytiloides</i>
KP 8 090199	Sm 151	จ. ระนอง	09/01/1999	<i>S. mytiloides</i>
KP 10 090199	Sm 152	จ. ระนอง	09/01/1999	<i>S. mytiloides</i>
SSa 7 101299	Sm 153	จ. สมุทรสาคร	10/12/1999	<i>S. mytiloides</i>
SSa 8 101299	Sm 154	จ. สมุทรสาคร	10/12/1999	<i>S. mytiloides</i>
SSa 10 101299	Sm 155	จ. สมุทรสาคร	10/12/1999	<i>S. mytiloides</i>
SSb 6 101299	S3 156	จ. สมุทรสาคร	10/12/1999	<i>Saccostrea sp. group 3</i>
SSb 7 101299	S3 157	จ. สมุทรสาคร	10/12/1999	<i>Saccostrea sp. group 3</i>
SSb 8 101299	S3 158	จ. สมุทรสาคร	10/12/1999	<i>Saccostrea sp. group 3</i>
SSb 9 101299	S3 159	จ. สมุทรสาคร	10/12/1999	<i>Saccostrea sp. group 3</i>
SSb 10 101299	S3 160	จ. สมุทรสาคร	10/12/1999	<i>Saccostrea sp. group 3</i>
BTb 2 070498	Cs 161	จ. กระบี่ (คลองบ่อท่อ)	07/04/1998	<i>Crassostrea sp.</i>
BTb 3 070498	Cs 162	จ. กระบี่ (คลองบ่อท่อ)	07/04/1998	<i>Crassostrea sp.</i>
BTb 4 070498	Cs 163	จ. กระบี่ (คลองบ่อท่อ)	07/04/1998	<i>Crassostrea sp.</i>
BTb 5 070498	Cs 164	จ. กระบี่ (คลองบ่อท่อ)	07/04/1998	<i>Crassostrea sp.</i>
BTb 6 070498	Cs 165	จ. กระบี่ (คลองบ่อท่อ)	07/04/1998	<i>Crassostrea sp.</i>
BTb 7 070498	Cs 166	จ. กระบี่ (คลองบ่อท่อ)	07/04/1998	<i>Crassostrea sp.</i>
BTb 8 070498	Cs 167	จ. กระบี่ (คลองบ่อท่อ)	07/04/1998	<i>Crassostrea sp.</i>
BTb 9 070498	Cs 168	จ. กระบี่ (คลองบ่อท่อ)	07/04/1998	<i>Crassostrea sp.</i>
BTb 11 070498	Cs 169	จ. กระบี่ (คลองบ่อท่อ)	07/04/1998	<i>Crassostrea sp.</i>
KPa 2 040498	Sl 170	จ. สุราษฎร์ธานี (เกาะปราบ)	04/04/1998	<i>Saccostrea sp. group 1</i>
KPa 3 040498	Sf 171	จ. สุราษฎร์ธานี (เกาะปราบ)	04/04/1998	<i>S. forskali</i>
KPa 4 040498	Sf 172	จ. สุราษฎร์ธานี (เกาะปราบ)	04/04/1998	<i>S. forskali</i>
KPa 5 040498	Sf 173	จ. สุราษฎร์ธานี (เกาะปราบ)	04/04/1998	<i>S. forskali</i>
KPb 7 040498	Sl 174	จ. สุราษฎร์ธานี (เกาะปราบ)	04/04/1998	<i>Saccostrea sp. group 1</i>
KPb 9 040498	Sl 175	จ. สุราษฎร์ธานี (เกาะปราบ)	04/04/1998	<i>Saccostrea sp. group 1</i>

Code of samples		Location	Date of collection	Species
KPb 10 040498	S1 176	จ. สุราษฎร์ธานี (เกาะปราบ)	04/04/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 1
KPb 11 040498	S1 177	จ. สุราษฎร์ธานี (เกาะปราบ)	04/04/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 1
KPb 12 040498	S1 178	จ. สุราษฎร์ธานี (เกาะปราบ)	04/04/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 1
KPb 13 040498	S1 179	จ. สุราษฎร์ธานี (เกาะปราบ)	04/04/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 1
KPb 14 040498	S1 180	จ. สุราษฎร์ธานี (เกาะปราบ)	04/04/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 1
KPb 16 040498	S1 181	จ. สุราษฎร์ธานี (เกาะปราบ)	04/04/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 1
เกาะหนู B 1	S2 182	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 2
เกาะหนู B 2	S2 183	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 2
เกาะหนู B 3	S2 184	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 2
เกาะหนู B 4	S2 185	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 2
เกาะหนู B 5	S2 186	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 2
เกาะหนู B 6	S2 187	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 2
เกาะหนู B 7	S2 188	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 2
เกาะหนู B 8	S2 189	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 2
เกาะหนู B 9	S2 190	จ. ระนอง (เกาะหนู)	09/05/1998	<i>Saccostrea</i> sp. group 2
Aust 1	Scom 01	ประเทศออสเตรเลีย	25/10/1998	<i>S. commercialis</i>
Aust 1	Scom 02	ประเทศออสเตรเลีย	25/10/1998	<i>S. commercialis</i>
Aust 1	Scom 03	ประเทศออสเตรเลีย	25/10/1998	<i>S. commercialis</i>
Aust 1	Scom 04	ประเทศออสเตรเลีย	25/10/1998	<i>S. commercialis</i>
Aust 1	Scom 05	ประเทศออสเตรเลีย	25/10/1998	<i>S. commercialis</i>
Aust 1	Scom 06	ประเทศออสเตรเลีย	25/10/1998	<i>S. commercialis</i>
Aust 1	Scom 07	ประเทศออสเตรเลีย	25/10/1998	<i>S. commercialis</i>
Aust 1	Scom 08	ประเทศออสเตรเลีย	25/10/1998	<i>S. commercialis</i>
Aust 1	Scom 09	ประเทศออสเตรเลีย	25/10/1998	<i>S. commercialis</i>
Aust 1	Scom 10	ประเทศออสเตรเลีย	25/10/1998	<i>S. commercialis</i>
Aust 1	Scom 11	ประเทศออสเตรเลีย	25/10/1998	<i>S. commercialis</i>
Aust 1	Scom 12	ประเทศออสเตรเลีย	25/10/1998	<i>S. commercialis</i>
GM 1	Pv 01	จ. ชลบุรี	04/06/1999	<i>P. viridis</i>
GM 2	Pv 02	จ. ชลบุรี	04/06/1999	<i>P. viridis</i>
GM 3	Pv 03	จ. ชลบุรี	04/06/1999	<i>P. viridis</i>
GM 4	Pv 04	จ. ชลบุรี	04/06/1999	<i>P. viridis</i>
GM 5	Pv 05	จ. ชลบุรี	04/06/1999	<i>P. viridis</i>
GM 6	Pv 06	จ. ชลบุรี	04/06/1999	<i>P. viridis</i>
GM 7	Pv 07	จ. ชลบุรี	04/06/1999	<i>P. viridis</i>
GM 8	Pv 08	จ. ชลบุรี	04/06/1999	<i>P. viridis</i>
GM 9	Pv 09	จ. ชลบุรี	04/06/1999	<i>P. viridis</i>
GM 10	Pv 10	จ. ชลบุรี	04/06/1999	<i>P. viridis</i>
GM 11	Pv 11	จ. ชลบุรี	04/06/1999	<i>P. viridis</i>
GM 12	Pv 12	จ. ชลบุรี	04/06/1999	<i>P. viridis</i>

* These specimens were not included in data analysis.

ภาคผนวก 2

Genetic distances between pairs of mtDNA composite haplotypes

Pairwise genetic distances of 54 composite haplotypes generated from digestion of 16S rDNA with Acs I, Alu I, Dde I, Dra I, Taq I and Rsa I, 18S rDNA with Hinf I and COI with Acs I, Dde I and Mbo I

54						
I						
II	0.00407275772					
III	0.00394177006	0.00836845962				
IV	0.05924648373	0.05167653480	0.04927199018			
V	0.05167653480	0.04478630881	0.04283566641	0.00394177006		
VI	0.04854313886	0.04695925129	0.03993325417	0.01009182394	0.00560528503	
VII	0.11567399756	0.11386946520	0.11746185402	0.09565329933	0.09408019036	0.08269876958
VIII	0.11567399756	0.11386946520	0.11746185402	0.08718672935	0.08569894173	0.08269876958
IX	0.10556297276	0.10389142492	0.10722204868	0.08866576272	0.08718672935	0.07698391337
X	0.12838747010	0.12641586449	0.13033832340	0.09408019036	0.09249637804	0.08929815659
XI	0.12803070312	0.12600564307	0.13003285403	0.09292492100	0.09128506125	0.08796847970
XII	0.10766599028	0.09742602656	0.10911450333	0.08548801033	0.07815249610	0.08847655917
XIII	0.09455210586	0.08434723685	0.09616639338	0.07307686613	0.06571969232	0.07540325218
XIV	0.08564908434	0.07505685013	0.08743894477	0.07156037851	0.06400553149	0.07386953067
XV	0.11989527924	0.10874835413	0.13322504887	0.08906217885	0.08219110923	0.09206739823
XVI	0.10296610637	0.09128506125	0.11686393489	0.07168192170	0.06437824487	0.07391886782
XVII	0.11746185402	0.10389142492	0.13417809767	0.07463897318	0.07329898399	0.08420280067
XVIII	0.09079217658	0.08875517364	0.10567306417	0.08702992488	0.08519016428	0.07253210705
XIX	0.10852109745	0.09449291210	0.12575272174	0.07307686613	0.07168192170	0.08279401776
XX	0.09721539982	0.09565329933	0.10886613580	0.09013569683	0.08866576272	0.10389142492
XXI	0.09292492100	0.08279401776	0.09455210586	0.07168192170	0.06437824487	0.07391886782
XXII	0.08620926843	0.07587404258	0.08794996257	0.07307686613	0.06571969232	0.07540325218
XXIII	0.07822015948	0.07625322738	0.09079217658	0.08519016428	0.07432994201	0.06303174761
XXIV	0.09079217658	0.08875517364	0.10567306417	0.08702992488	0.08519016428	0.07253210705
XXV	0.09922929607	0.08460089625	0.10140695245	0.06649535451	0.05791397813	0.06888029588

0.02127505185	0.01445582700	0.05204880320	0.03476859671	0.03836630670	0.03586891095
0.02838099862	0.04762358458	0.02701614231	0.01608057652	0.03404762209	0.04169663930
XXVI	0.10442850333	0.09024872842	0.10647070864	0.07540615312	0.06717896964
0.06745804148	0.07391886782	0.07540325218	0.06603891885	0.05581855504	0.02127505185
0.01360215613	0.00910475433	0.03089942998	0.05204880320	0.05619247149	0.04006681271
0.03836630670	0.03548589920	0.01907408078	0.01360215613	0.03836604273	0.04574511213
0.00529877203					
XXVII	0.08564908434	0.08384039869	0.09791101916	0.09791101916	0.09602693131
0.03138523603	0.03993325417	0.03689398434	0.03407034867	0.02853934959	0.06121335831
0.05283870403	0.06121335831	0.05057569639	0.04369489660	0.03274953874	0.01076939071
0.04463144104	0.02661191489	0.05785993786	0.06223865961	0.01944332050	0.01393934702
0.04006681271	0.04624576292				
XXVIII	0.08016325266	0.07822015948	0.09280421501	0.11062018354	0.10858159794
0.04342450550	0.05217767607	0.04887378693	0.04637086917	0.03658567515	0.08669199119
0.06820100917	0.06277066673	0.07697777878	0.06087714403	0.04887378693	0.00921948941
0.03946479879	0.04186483483	0.07432994201	0.06317409756	0.01868830392	0.01267402033
0.04169663930	0.04574511213	0.00777978776			
XXIX	0.07505685013	0.07331468444	0.08564908434	0.10848796444	0.09412257251
0.03846941996	0.04854313886	0.04478630881	0.04174477654	0.03631263106	0.05957101524
0.05110178273	0.05957101524	0.04915171488	0.04212430092	0.04478630881	0.01944332050
0.05714720402	0.03689398434	0.05603801110	0.06065213759	0.01797654985	0.02324877726
0.03836604273	0.04469296082	0.00733437786	0.00941238846		
XXX	0.08018423943	0.07069905031	0.08186031401	0.06692123205	0.05915598986
0.06597656867	0.05924648373	0.06084058562	0.06430390809	0.05966129228	0.01689858432
0.00979448683	0.01689858432	0.04390814818	0.03708564726	0.03968618365	0.05259125494
0.05136413423	0.04569899871	0.01446497685	0.01890742086	0.03975650886	0.05910704876
0.02089978231	0.02734313002	0.03569883607	0.04670551445	0.03405785199	
XXXI	0.09292492100	0.08279401776	0.10469046406	0.07834706561	0.07028013477
0.04962574627	0.05532981443	0.05691246218	0.04809632230	0.04246939239	0.02587829024
0.02073665310	0.02587829024	0.01977417380	0.02863932794	0.03178338460	0.03802960806
0.05351532169	0.02227807574	0.02325274060	0.03138523603	0.02838099862	0.04269568541
0.02338264888	0.01553067396	0.02198670351	0.03372727294	0.02053478712	0.01770784525
XXXII	0.08384039869	0.07331468444	0.09602693131	0.06906124786	0.06065213759
0.04854313886	0.05438301817	0.05601755292	0.04695925129	0.04165639031	0.03372727294
0.02587829024	0.03372727294	0.02863932794	0.02111161185	0.02404697278	0.03174737580
0.03591012393	0.02890818132	0.02853934959	0.03542864511	0.02174397753	0.03653108535
0.01649980961	0.02338264888	0.01776920701	0.02733657845	0.01621070110	0.01352235995
0.00471946897					
XXXIII	0.09602693131	0.08384039869	0.11048059276	0.07849165013	0.07678251892
0.03993325417	0.04478630881	0.04629205167	0.03846941996	0.03304571530	0.04417812247
0.03620587534	0.04417812247	0.03717462362	0.02997219809	0.02198886934	0.02886927818
0.03361658260	0.02661191489	0.03960098876	0.04560583092	0.03174737580	0.03332198832
0.02579136390	0.03232720033	0.01556542275	0.01730822841	0.01776920701	0.02236712224
0.01180231027	0.00733437786				
XXXIV	0.09455210586	0.08434723685	0.09616639338	0.08742244635	0.07834706561
0.07065741688	0.06336108349	0.06499844980	0.06892807389	0.06388645441	0.01011676946
0.00541796183	0.01011676946	0.04134352854	0.05057569639	0.05341035777	0.06121335831
0.07530704136	0.04615325028	0.01009182394	0.01590272041	0.05957101524	0.06820100917
0.02838099862	0.02053478712	0.05283870403	0.06820100917	0.05110178273	0.01578595472
0.02928467123	0.03463146081	0.04673563458			
XXXV	0.09634762663	0.09449291210	0.11046793675	0.07920601554	0.07754731606
0.04730585802	0.05204777400	0.05341035777	0.04599037039	0.03846941996	0.06400553149
0.05167653480	0.05613559016	0.05623803100	0.04572264175	0.03641860480	0.03009290389
0.04295133884	0.03759571544	0.05601755292	0.05737685488	0.03292028806	0.03443788718
0.03601022467	0.04275136049	0.02342944598	0.03009290389	0.03463146081	0.04442689123
0.03138523603	0.02587829024	0.02342944598	0.05763876419		
XXXVI	0.08240730519	0.08085732049	0.09247120423	0.07651885539	0.07505071627
0.05761513936	0.04872792069	0.04988637397	0.05635805458	0.05486856254	0.06465819132
0.05747574623	0.06465819132	0.06270617840	0.05514490778	0.03860901190	0.04980232272
0.04215841140	0.04470002630	0.06137627590	0.06644622918	0.05340131358	0.05480215146
0.05737685488	0.06747124098	0.04089952103	0.04521634493	0.04883864854	0.04813679935
0.05143815764	0.04399699066	0.03676348869	0.06273087166	0.01334716489	
XXXVII	0.08159471391	0.07999824672	0.09188751136	0.07559086722	0.07407703180
0.05617456209	0.04709414301	0.04830075998	0.05486856254	0.05341035777	0.06289594896
0.05611720840	0.06289594896	0.06137627590	0.05415595599	0.03753452361	0.04842549664
0.04089952103	0.03888983161	0.06008429002	0.06465819132	0.05208683882	0.05353982527
0.05613559016	0.06571969232	0.03968618365	0.04373449645	0.04778736198	0.04711596330
0.04992532469	0.04283566641	0.03545755357	0.06148740957	0.01205559239	0.00380118457

XXXVIII 0.08794996257 0.08620926843 0.09999982603 0.07316406045 0.07159052026 0.07587404258
 0.05341035777 0.04422427692 0.04548477641 0.05204777400 0.04478630881 0.05983476556
 0.04778736198 0.05208683882 0.06220821236 0.05199237176 0.04139073677 0.03594376186
 0.04793749299 0.04260527770 0.05167653480 0.05340131358 0.03915121085 0.04070149216
 0.04267809486 0.04915134363 0.02883422221 0.03594376186 0.04122395894 0.04084616460
 0.03689398434 0.03160389002 0.02883422221 0.05322551732 0.00394177006 0.00918541835
 0.00782260777
 XXXIX 0.08240730519 0.08085732049 0.09247120423 0.07651885539 0.07505071627 0.07929608282
 0.05761513936 0.04872792069 0.04988637397 0.05635805458 0.05486856254 0.06465819132
 0.05747574623 0.06465819132 0.06270617840 0.05514490778 0.04345441280 0.04980232272
 0.04830075998 0.04470002630 0.06137627590 0.06644622918 0.05340131358 0.05480215146
 0.05737685488 0.06747124098 0.04089952103 0.04521634493 0.04883864854 0.04813679935
 0.05143815764 0.04399699066 0.03676348869 0.06273087166 0.01334716489 0.00512834904
 0.00380118457 0.00918541835
 XL 0.09292492100 0.08279401776 0.09455210586 0.06571969232 0.05904889066 0.06745804148
 0.06170918659 0.05532981443 0.05691246218 0.06004421185 0.05470634378 0.00881446137
 0.00407275772 0.00881446137 0.02686202840 0.03589594098 0.03895359602 0.05337886846
 0.06085358494 0.03447812483 0.00867119460 0.01472134065 0.05178210485 0.05957101524
 0.01680382058 0.00911495711 0.04505824747 0.05957101524 0.04336513467 0.01446497685
 0.01543876296 0.02053478712 0.03007736932 0.01009182394 0.04478630881 0.05143815764
 0.04992532469 0.04138977000 0.05143815764
 XLI 0.08384039869 0.07331468444 0.08564908434 0.06400553149 0.05714720402 0.06570198051
 0.07540325218 0.06887199021 0.07028013477 0.07391886782 0.06406280627 0.01624384172
 0.00881446137 0.00427305728 0.03589594098 0.05682328808 0.06085358494 0.04748359234
 0.04342450550 0.04138977000 0.01360215613 0.00881446137 0.04574511213 0.05383184366
 0.00974935970 0.00442724683 0.05337886846 0.05383184366 0.05178210485 0.02179303993
 0.02053478712 0.02838099862 0.03802960806 0.01497798519 0.04915134363 0.05859284069
 0.05666604882 0.04560583092 0.05859284069 0.00471946897
 XLII 0.08016325266 0.07822015948 0.08208280551 0.06284089633 0.07610908518 0.06477180319
 0.10211843291 0.11446656903 0.10389687265 0.11255437771 0.10442377141 0.10410236501
 0.08519016428 0.08018104055 0.11649174895 0.10136276920 0.10389687265 0.07714529380
 0.09581908820 0.10565894590 0.08332947948 0.08016325266 0.07504966202 0.07714529380
 0.08391129193 0.08687733777 0.08018104055 0.08831467148 0.08898986353 0.08408793291
 0.09386449364 0.08898986353 0.10415242711 0.08519016428 0.09079217658 0.09999982603
 0.09977256110 0.09280421501 0.09999982603 0.08332947948 0.07818926078
 XLIII 0.08215168990 0.08027856561 0.08400353847 0.05915598986 0.07069905031 0.06065213759
 0.08050894834 0.09064730654 0.08233601098 0.08870352451 0.10211843291 0.10736561256
 0.09518687151 0.08702992488 0.11966229623 0.10389687265 0.10640046608 0.08214712253
 0.09791101916 0.10809362354 0.09351902567 0.08743894477 0.07087481074 0.08214712253
 0.08898986353 0.09386449364 0.08702992488 0.09313002982 0.09581908820 0.09064746384
 0.10389687265 0.09581908820 0.11062018354 0.09518687151 0.08743894477 0.09188751136
 0.09138084429 0.08921007189 0.09188751136 0.09351902567 0.08519016428 0.00909816981
 XLIV 0.09408019036 0.09249637804 0.10556297276 0.09565329933 0.09408019036 0.09090222458
 0.03234132078 0.02814220728 0.02958285467 0.03084282032 0.02986283240 0.06180694050
 0.05691246218 0.07028013477 0.05076260972 0.04962574627 0.03825689615 0.04762358458
 0.05189252385 0.03480222545 0.06170918659 0.06302181404 0.06119665424 0.05217767607
 0.06570198051 0.06745804148 0.03548589920 0.04762358458 0.04327043226 0.05322551732
 0.04447566075 0.04327043226 0.03548589920 0.05691246218 0.04730585802 0.04220472602
 0.04086277489 0.04422427692 0.04220472602 0.04962574627 0.06303211090 0.11446656903
 0.11686393489
 XLV 0.09565329933 0.09408019036 0.10722204868 0.09721539982 0.09565329933 0.09249637804
 0.03383107434 0.02566580329 0.03101562789 0.02814220728 0.02711460802 0.06333908427
 0.05848364749 0.07168192170 0.05223159592 0.05114573007 0.03956210993 0.04887378693
 0.05302213151 0.03617187424 0.06336108349 0.06450112940 0.06260446273 0.05347577225
 0.06717896964 0.06887199021 0.03689398434 0.04887378693 0.04478630881 0.05476241974
 0.04593842213 0.04478630881 0.03689398434 0.05848364749 0.04861865388 0.04345441280
 0.04215841140 0.04548477641 0.04345441280 0.05114573007 0.06437824487 0.11635790578
 0.11868436755 0.00389039543
 XLVI 0.10389142492 0.10220644514 0.11746185402 0.09565329933 0.09408019036 0.09090222458
 0.03234132078 0.02814220728 0.02958285467 0.03084282032 0.02986283240 0.06180694050
 0.05691246218 0.07028013477 0.05076260972 0.04962574627 0.03825689615 0.04762358458
 0.05189252385 0.03480222545 0.06170918659 0.06302181404 0.06119665424 0.05217767607
 0.06570198051 0.06745804148 0.03548589920 0.04762358458 0.04327043226 0.05322551732
 0.04447566075 0.04327043226 0.03548589920 0.05691246218 0.04730585802 0.04220472602
 0.04086277489 0.04422427692 0.04220472602 0.04962574627 0.06303211090 0.11446656903
 0.11686393489 0.00259879901 0.00667756791
 XLVII 0.09412257251 0.09219655547 0.10848796444 0.08564908434 0.08384039869 0.07155610443
 0.02625637102 0.03407034867 0.03138523603 0.02863832647 0.02288122768 0.06649535451

0.05785993786	0.06649535451	0.04435070258	0.03720619075	0.03548589920	0.01944332050
0.04762358458	0.03274953874	0.06360903925	0.06741029272	0.01115407823	0.01588667818
0.04398860681	0.05017257836	0.00733437786	0.01588667818	0.01621070110	0.03924534258
0.02438474001	0.02015690281	0.01776920701	0.05785993786	0.02198670351	0.03955644237
0.03829419658	0.02736154413	0.03955644237	0.04934745006	0.05791397813	0.07818926078
0.07610908518	0.03846941996	0.03993325417	0.03846941996		
XLVIII	0.09602693131	0.09412257251	0.11048059276	0.09791101916	0.09602693131
	0.08201282656				
0.02758485837	0.03548589920	0.03274953874	0.03001465836	0.02438474001	0.07610908518
0.06738256334	0.07610908518	0.05057569639	0.04369489660	0.04138977000	0.02474219995
0.05347577225	0.03829419658	0.07429004383	0.07678251892	0.01255088520	0.02089978231
0.05203421293	0.05791397813	0.01206076128	0.01393934702	0.01405732705	0.04668082522
0.03007736932	0.02605882362	0.01556542275	0.06738256334	0.02736154413	0.04089952103
0.03968618365	0.03311868229	0.04089952103	0.05785993786	0.06649535451	0.09107349152
0.08702992488	0.03993325417	0.04138977000	0.03993325417	0.00427305728	
XLIX	0.09412257251	0.09219655547	0.10848796444	0.07678251892	0.07505685013
	0.06406280627				
0.02275804531	0.03407034867	0.02758485837	0.02863832647	0.02288122768	0.05957101524
0.05110178273	0.05957101524	0.04435070258	0.03720619075	0.02758485837	0.01255088520
0.03953291877	0.03274953874	0.05603801110	0.06065213759	0.02579136390	0.01588667818
0.03836604273	0.04469296082	0.01405732705	0.02324877726	0.02441537763	0.04494245770
0.02853934959	0.02441537763	0.02175648849	0.05110178273	0.02198670351	0.03955644237
0.03829419658	0.02736154413	0.03955644237	0.04336513467	0.05178210485	0.07818926078
0.07610908518	0.03407034867	0.03548589920	0.03407034867	0.01253745911	0.01776920701
L	0.09412257251	0.09219655547	0.10848796444	0.08564908434	0.08384039869
	0.07155610443				
0.02275804531	0.03407034867	0.02758485837	0.02863832647	0.02288122768	0.06649535451
0.05785993786	0.06649535451	0.04915171488	0.04212430092	0.03138523603	0.01588667818
0.04342450550	0.03689398434	0.06360903925	0.06741029272	0.03015903038	0.01944332050
0.04398860681	0.05017257836	0.01776920701	0.01944332050	0.02015690281	0.05125013679
0.03304571530	0.02903440249	0.01776920701	0.05785993786	0.02587829024	0.03955644237
0.03829419658	0.03160389002	0.03955644237	0.04934745006	0.05791397813	0.08898986353
0.08519016428	0.03407034867	0.03548589920	0.03407034867	0.01621070110	0.01405732705
0.00285867891					
LI	0.10647070864	0.10442850333	0.12399413413	0.07678251892	0.07505685013
	0.06406280627				
0.02625637102	0.03407034867	0.03138523603	0.02863832647	0.02288122768	0.05957101524
0.05110178273	0.05957101524	0.04435070258	0.03720619075	0.02758485837	0.01255088520
0.03953291877	0.03274953874	0.05603801110	0.06065213759	0.02174397753	0.01588667818
0.03836604273	0.04469296082	0.01405732705	0.02324877726	0.02441537763	0.04494245770
0.02853934959	0.02441537763	0.02175648849	0.05110178273	0.02198670351	0.03955644237
0.03829419658	0.02736154413	0.03955644237	0.04336513467	0.05178210485	0.07818926078
0.07610908518	0.03407034867	0.03548589920	0.03407034867	0.01253745911	0.01405732705
0.00285867891	0.00588554928				
LII	0.10488116820	0.10324947952	0.10650128862	0.09681021092	0.09528958815
	0.09222217228				
0.03843626928	0.04254206915	0.04385028434	0.03717563837	0.03563504976	0.06947043535
0.06417347128	0.07840260833	0.05194420680	0.05076260972	0.04385028434	0.04974848105
0.05829464130	0.02849786809	0.06962624808	0.07996299676	0.04855932071	0.04974848105
0.06168191643	0.06361159596	0.02913089804	0.04564781789	0.03978629990	0.05415595599
0.04114678713	0.03978629990	0.03685099901	0.06417347128	0.04075722388	0.04773816837
0.04645631481	0.04588511582	0.03852039822	0.05633703997	0.07060454121	0.10296610637
0.09565329933	0.04189047820	0.04332691693	0.04189047820	0.02785727535	0.03284424416
0.03548953259	0.03978629990	0.03548953259			
LIII	0.10488116820	0.10324947952	0.10650128862	0.09681021092	0.09528958815
	0.09222217228				
0.04524938371	0.04935518358	0.05056393724	0.04409120564	0.04224988669	0.07840260833
0.07059085039	0.07840260833	0.05875732122	0.05727722185	0.05056393724	0.04974848105
0.05829464130	0.03348270498	0.07614086021	0.07996299676	0.04855932071	0.04974848105
0.06168191643	0.06361159596	0.03524024990	0.04564781789	0.04599037039	0.06008429002
0.04766139926	0.04599037039	0.04296035087	0.07059085039	0.04075722388	0.04773816837
0.04645631481	0.04588511582	0.03852039822	0.06285165210	0.07060454121	0.10296610637
0.09565329933	0.04702301397	0.04838452517	0.04702301397	0.03406134585	0.03895359602
0.04169360309	0.04599037039	0.04169360309	0.00258498578		
LIV	0.13012144128	0.12855627254	0.14634217772	0.11008404468	0.10874835413
	0.10607019591				
0.11889259457	0.11889259457	0.12027361726	0.11750889831	0.11556926276	0.12861415986
0.13012144128	0.12861415986	0.10950821982	0.10741013730	0.11078423350	0.10474572944
0.10874835413	0.11205963427	0.14292377721	0.13012144128	0.09466475777	0.10474572944
0.11177600742	0.11365472182	0.10673218968	0.11492945835	0.11516753526	0.13183576706
0.10741013730	0.10532907786	0.11667344886	0.13012144128	0.10045477676	0.11526741362
0.11333363872	0.10170279604	0.11526741362	0.11701619019	0.11516753526	0.12716140621
0.11817187342	0.10950821982	0.12027361726	0.10950821982	0.09692715217	0.10673218968
0.09692715217	0.10532907786	0.09692715217	0.11161552033	0.11161552033	

ภาคผนวก 3

Publications

1. Klinbunga, S., Ampayup, P., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Yoosukh, W. (2000). Development of species-specific markers of the tropical oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand. *Mar. Biotechnol.* 2: 476-484.
2. Klinbunga, S., Ampayup, P., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Yoosukh, W. (2001). Genetic diversity and molecular markers of commercial oysters (Genera *Crassostrea*, *Saccostrea* and *Striostrea*) in Thailand determined by RAPD analysis. *Marine Biotechnol.* 3: (in press).
3. Ampayup, P., Tassanakajon, A., Klinbunga, S. and Yoosukh, W. (1999). Identification of species-specific markers in Thai oysters (genera *Crassostrea* and *Saccostrea*) using RAPD analysis. 25th Congress on Science and Technology of Thailand. p. 714-715.
4. Ampayup, P., Klinbunga, S., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Yoosukh, W. (2000). Genetic variation and species-specific markers of cupped oysters (Genera *Crassostrea*, *Saccostrea* and *Striostrea*) in Thailand. 26th Congress on Science and Technology of Thailand. p.389.
5. Khamnamtong, N., Klinbunga, S., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Yoosukh, W. (2000). Molecular genetic markers for taxonomy of cupped oysters (Genera *Crassostrea*, *Saccostrea* and *Striostrea*) in Thailand. 26th Congress on Science and Technology of Thailand. p. 390.
6. Klinbunga, S., Ampayup, P., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Yoosukh, W. (2001). Applied molecular techniques for evolutionary studies of oysters in Thailand. In: *Molecular Evolution: Technical Approaches*. 19-23 March 2001, Chulalongkorn University, pp 21.1-21.9.

DUPLICATE

Mar. biotechnol. 3, 030–000, 2001
DOI: 10.1007/s101260000057

MARINE
BIOTECHNOLOGY

© 2001 Springer-Verlag New York Inc.

Genetic Diversity and Molecular Markers of Cupped Oysters (Genera *Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) In Thailand Revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis

S. Klinbunga,^{1,*} P. Ampayup,² A. Tassanakajon,² P. Jarayabhand,^{3,4} and W. Yoosukh⁵

¹Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Bangkok 10400, Thailand

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, and ³Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁴Angsila Marine Biological Research Station, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Chonburi 20210, Thailand

⁵Department of Marine Science, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Abstract: Genetic diversity and species-diagnostic markers of 5 oysters in Thailand, *Crassostrea belcheri* (Sowerby, 1871), *Crassostrea iredalei* (Faustino, 1932), *Saccostrea cucullata* (Born, 1778), *Saccostrea forskali* (Gmelin, 1791), and *Striostrea* (*Parastriostrea*) *mytiloides* (Lamarck, 1819), were investigated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In a total, 135, 127, and 108 genotypes were observed from primers OPA09, OPB01, and OPB08 (Operon Technologies Inc., kits A and B), and 131 and 122 genotypes from primers UBC210 and UBC220 (University of British Columbia), respectively. Two hundred fifty-four reproducible and polymorphic fragments (200–2500 bp in length) were generated across the 5 investigated species. The average number of bands per primer varied between 12.4 and 32.2. The percentage of polymorphic bands within *Crassostrea* (53.23%–77.67%) was lower than that within *Saccostrea* and *Striostrea* oysters (86.21%–99.36%). Nine, species-specific markers were found in *C. belcheri*, 4 in *C. iredalei*, and 2 in *S. cucullata*. 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 and 0.811. A neighbor-joining tree indicated distant relationships between *Crassostrea* and *Saccostrea* oysters, but closer relationships were observed between the latter and *Striostrea mytiloides*.

Key words: genetic diversity, species-specific markers, RAPD, PCR, oysters.

INTRODUCTION

Oysters are widely distributed throughout tropical and sub-tropical areas. They are benthic marine species inhabiting

near-shore, shallow water, bay, and estuary locations (Hedgecock, 1995). Primarily on the basis of morphology, 5 oyster species of genera *Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*—*Crassostrea belcheri* (Sowerby, 1871), *Crassostrea iredalei* (Faustino, 1932), *Saccostrea cucullata* (Born, 1778), *Saccostrea forskali* (Gmelin, 1791), and *Striostrea* (*Parastriostrea*) *mytiloides* (Lamarck, 1819)—have been recognized

Received June 6, 2000; accepted September 12, 2000

*Corresponding author: Marine Biotechnology Research Unit, c/o Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; telephone +66-2-2185279; fax +66-2-2547680; e-mail sirawut@biotec.or.th

in Thai waters (Yoosukh, 1988; Yoosukh and Duangdee, 1999).

Oysters have been cultured in Thailand for at least 50 years. Among local oysters, only *C. belcheri*, *C. iredalei*, and *Saccostrea cucullata* are being cultured commercially (Jarayabhand and Thavornnyutikarn, 1995). The production of these oysters was estimated to be approximately 1500 tons annually between 1986 and 1990 (Department of Fisheries, 1993a). The annual production of cultivated oysters in Thailand had been limited mainly by the lack of appropriate growing-out techniques and the limitation and seasonal inconsistency of seed supply (Jarayabhand et al., 1994).

Farming of oysters in Thailand has developed rapidly during the last few years. Although oyster production from aquaculture has increased to approximately 20,000 tons annually since 1994, it still accounts for only 35% of the total production (Department of Fisheries, 1998). Moreover, oyster seeds are collected entirely from nature, resulting in overexploitation of natural populations at different stages of development (Jarayabhand et al., 1994).

Laboratory scale production of *Saccostrea cucullata* and large-scale hatcheries of *C. belcheri* have been successfully developed (Jarayabhand et al., 1985; Sahavachrin et al., 1988). These provide opportunities to develop selective breeding programs for increasing the culture and management efficiency of Thai oysters, particularly *C. belcheri*, *C. iredalei*, and *Saccostrea cucullata*.

Knowledge of genetic variation of commercial oysters in Thailand is important for the construction of appropriate breeding programs and management of these species. However, relatively little is known about interspecific and intraspecific genetic variability of oysters in Thailand. Moreover, genetic markers that would assist selection of appropriate broodstock species for aquaculture production should be identified and studies of larval distribution patterns and recruitment of Thai oysters should also be carried out. This information would enhance aquaculture output without adversely affecting native populations, leading to sustainable farming of these taxa (Hedgecock, 1995).

At present, taxonomic identification of oysters in Thai waters remains unclear, limiting culture efficiency and development of closed life-cycle culture of these species. These oysters have been classified principally using morphological characters. However, oysters are variable in form. Their external characteristics (e.g., shell morphology) are influenced by a variety of habitats and environmental conditions (Tack et al., 1992). Accordingly, two sympatric species may be morphologically similar and misidentified as a single

species. Conversely, allopatric populations in different habitats may show ecomorphological variation and have questionable species status. Species-specific markers are thus required to unambiguously identify the correct species of commercial oysters in Thailand at various stages (larvae, seed, and broodstock) of the life cycle.

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis is a simple and rapid technique for population genetic studies (Hadrys et al., 1992). It has been used to determine genetic diversity and identify useful genetic markers at different taxonomic levels of various marine organisms (Garcia et al., 1994; Patwary et al., 1994; Tyler-Walters and Hawkins, 1995; Tassanakajon et al., 1997, 1998; Heipel et al., 1998; Klinbunga et al., 2000). RAPD analysis uses a random oligonucleotide primer (usually 10 bases long), obviating the need for knowledge of the sequences of the genomic under investigation (Welsh and McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Moreover, an unlimited number of RAPD primers can be screened for desired molecular markers within a short time. These make RAPD analysis ideal for searching for useful genetic markers in various species (Weising et al., 1995).

The objectives of this study are to determine genetic diversity levels of local oysters in Thailand and to identify species-specific RAPD markers of 3 commercially cultured species, for which no data are available at present. The knowledge obtained can be applied to the identification of seed and broodstock of *C. belcheri*, *C. iredalei*, and *Saccostrea cucullata* to ensure sustainable culture of these oysters in Thailand.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

One hundred thirty-six individual oysters were collected over their geographic ranges in Thailand. They are *C. belcheri* ($N = 20$), *C. iredalei* ($N = 20$), *Saccostrea cucullata* ($N = 26$), *Saccostrea forskali* ($N = 47$), and *Striostrea mytiloides* ($N = 23$) (Table 1 and Figure 1) according to Vaught (1989) and Yoosukh and Duangdee (1999).

The Australian oyster *Saccostrea commercialis* ($N = 12$) was also collected from Brisbane, Australia, and included as an ingroup reference for oysters of the genus *Saccostrea*. Specimens were transported back to the laboratory at the Marine Biotechnology Research Unit and stored at -30°C until further utilized.

(11) (F1)

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

Sample*	Abbreviation	Sample size (N)
<i>Crassostrea belcheri</i>		
Suratthani (east of PT)	CBSrE	10
Songkhla (east of PT)	CBSkE	4
Ranong (west of PT)	CBRnW	3
Krabi (west of PT)	CBKbW	3
<i>Crassostrea iredalei</i>		
Chonburi (GOT, east)	CICbE	6
Prachuapkrirkhan (east of PT)	CIPjE	4
Songkhla (east of PT)	CISkE	6
Phangnga (west of PT)	CIPnW	4
<i>Saccostrea cucullata</i>		
Trat (GOT, east)	SCTtE	5
Chanthaburi (GOT, east)	SCCtE	8
Ranong (west of PT)	SCRnW	7
Phuket (west of PT)	SCPkW	6
<i>Striostrea mytiloides</i>		
Samut Sakhon (GOT, east)	SMSsE	8
Phuket (west of PT)	SMPkW	6
Ranong (west of PT)	SMRnW	9
<i>Saccostrea forskali</i>		
Chanthaburi (GOT, east)	SFCtE	20
Chonburi (GOT, east)	SFCbE	4
Prachuapkrirkhan (east of PT)	SFPjE	3
Suratthani (east of PT)	SFSrE	3
Songkhla (east of PT)	SFSkE	5
Ranong (west of PT)	SFRnW	6
Satun (west of PT)	SFSsW	6
<i>Saccostrea commercialis</i> (Bisbee, Australia)	SCOM	12

*GOT indicates Gulf of Thailand; PT, peninsular Thailand.



Figure 1. Map of Thailand indicating sample collection sites of 5 oyster species (*Crassostrea belcheri*, *C. iredalei*, *Saccostrea cucullata*, *Striostrea mytiloides*, and *Saccostrea forskali*) used in this study. Dots represent geographic areas from which at least 1 oyster species was sampling. Detailed information and abbreviations of sample sites are shown in Table 1.

DNA Extraction

Approximately 100 mg of adductor muscle of each oyster was dissected out and transferred to an Eppendorf tube containing 5 vol of a lysis solution (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, and 250 mM NaCl; pH 8.0, 1.0% sodium dodecylsulfate [SDS] and 200 µg/ml proteinase K). Genomic DNA was extracted using a phenol-chloroform-SDS method (Klinbunga et al., 1996). The DNA concentration was spectrophotometrically determined and further ad-

justed by a minigel method (Maniatis et al., 1982). DNA was stored at 4°C until required.

RAPD Analysis and Agarose Gel Electrophoresis

One hundred three RAPD primers purchased from Operon Technologies Inc. (Alameda, Calif.) and the University of British Columbia, Canada, were screened. Five primers exhibiting highly reproducible and easily scored results (OPA09, GGGTAACGCC; OPB01, GTTTCGGTCC; OPB08, GTCACACGG; UBC210, GCACCGAGAG; and UBC220, GTCGATGTCG) were chosen for determination of genetic diversity

and identification of species-diagnostic markers in Thai oysters (Fritsch et al., 1993). RAPD-polymerase chain reaction (PCR) was carried out in a 25- μ l reaction volume containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.001% gelatin, 100 μ M of each dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), 0.2 μ M of each primer, 1 U *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus), and 50 ng of genomic DNA. The amplification reaction was carried out for 40 cycles (Perkin-Elmer model 2400) composed of denaturation at 94°C for 10 seconds, annealing at 36°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 90 seconds. The final extension was performed at the same temperature for 5 minutes. The resulting products were electrophoretically analyzed through a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized using a UV transilluminator (Maniatis et al., 1982).

Data Analysis

Each RAPD fragment is treated as an independent character. Sizes of each RAPD band were estimated by comparison with 100-bp and 200-bp ladders and recorded in a binary matrix to represent the absence (0) or presence (1) of a particular band. The similarity index between individuals was calculated by $S_{xy} = 2n_{xy}/(n_x + n_y)$, where n_x and n_y represent the number of RAPD bands in individuals x and y , respectively, and n_{xy} represents the number of shared bands between individuals (Nei and Li, 1979). Between-sample similarity is calculated as the average of all possible comparisons of individuals across samples i and j using the same equation. Genetic distances between pairs of samples ($\bar{D}_{ij}$) were converted from the index of similarity between samples using the equation $\bar{D}_{ij} = 1 - \bar{S}_{ij}$ (Lynch, 1990).

Phylogenetic relationships between investigated samples of Thai oysters were constructed by a neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) using NEIGHBOR implemented in PHYLIP Version 3.5c (Felsenstein, 1993).

RESULTS

Percentage of Polymorphic Bands and the Numbers of Genotypes of Thai Oysters

High genetic diversity of *C. belcheri*, *C. iredalei*, *Saccostrea cucullata*, *Striostrea mytiloides*, and *Saccostrea forskali* was observed by RAPD analysis of 5 decanucleotide primers (OPA09, OPB01, OPB08, UBC210, and UBC220). A total of 254 RAPD fragments ranging from 200 bp to 2500 bp in

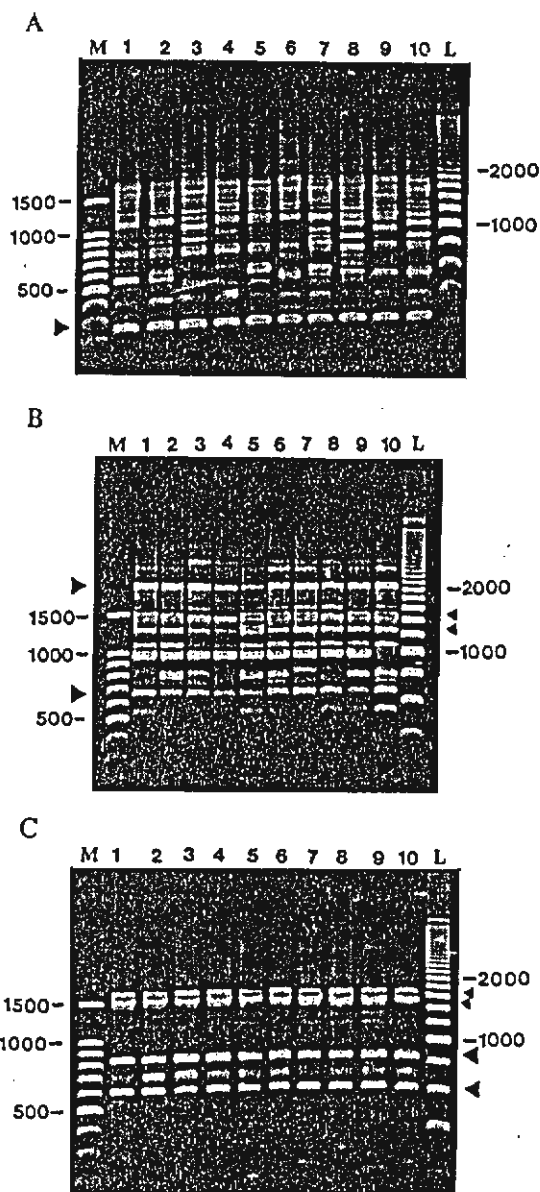


Figure 2. RAPD patterns generated by amplification of *Crassostrea belcheri* DNA with primers OPA09 (A), OPB01 (B), and OPB08 (C). The 100-bp (lane M) and 200-bp (lane L) DNA ladders were used as DNA markers. Arrowheads indicate species-specific markers found in *C. belcheri*.

length were consistently generated (Figures 2–5 and Table 2). The number of reproducible bands across all investigated samples was 55, 42, 62, 44, and 51 bands for primers OPA09, OPB01, OPB08, UBC210, and UBC220, respec-

F2-5
T2

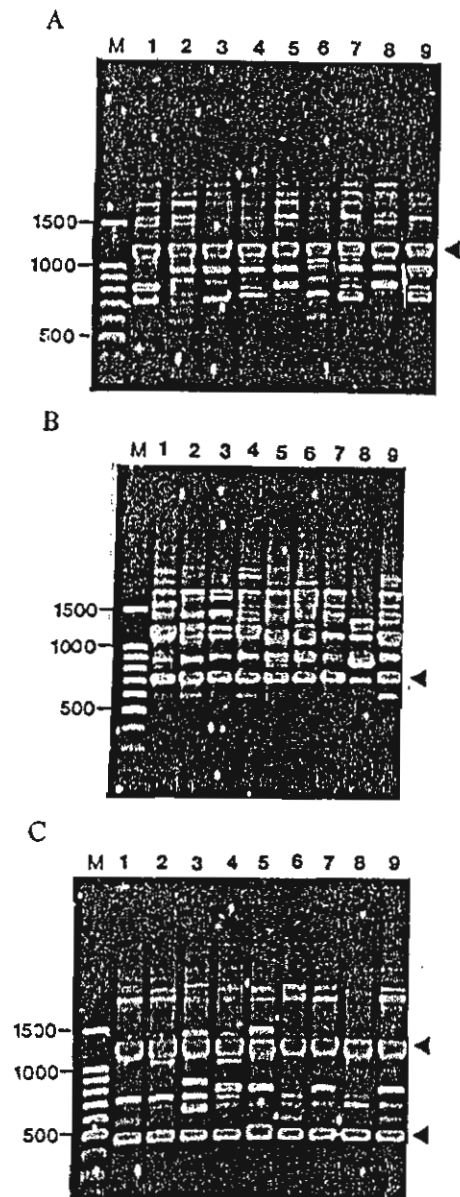


Figure 3. RAPD patterns generated by amplification of *Crassostrea iredalei* DNA with primers OPA09 (A), OPB01 (B), and OPB08 (C). The 100-bp DNA ladder (lane M) was used in a DNA marker. Arrowheads indicate species-specific markers found in *C. iredalei*.

tively. All of these were polymorphic, indicating extremely high polymorphic levels of these primers in oysters. The average percentage of polymorphic bands (found in less than 95% of investigated individuals) of each oyster species

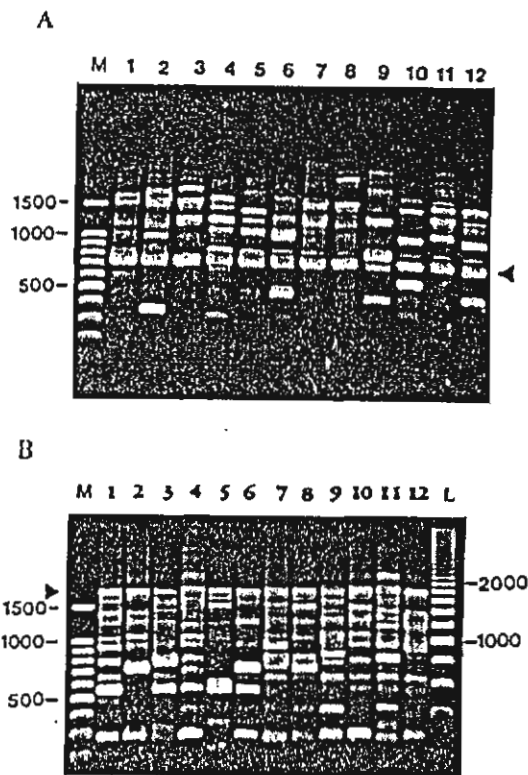


Figure 4. RAPD patterns generated by amplification of *Saccostrea cucullata* DNA with primers OPB08 (A) and UBC220 (B). The 100-bp and 200-bp DNA ladders (lanes M and L, respectively) were used as DNA markers. Arrowheads indicate species-specific markers found in *S. cucullata*.

was 53.23% to 99.36%. Each *Saccostrea* and *Striostrea* oyster exhibited greater levels of polymorphic bands than did *C. belcheri* and *C. iredalei* (Table 3).

In a total 135, 127, 108, 131, and 122 RAPD genotypes were generated from the respective primers. The average number of genotypes per primer of *C. belcheri* was 11.6, followed by 18.0, 23.0, 25.4, and 47.0 in *C. iredalei*, *Striostrea mytiloides*, *Saccostrea cucullata*, and *Saccostrea forskali*, respectively. The mean of a ratio between the number of genotypes per primer and the number of investigated specimens in a particular species ranged from 0.58 to 1.00 (Table 3). Shared genotypes between individuals of different oyster species were not observed in any primer.

Species-Diagnostic Markers of Three Commercial Cultured Oyster Species

Four primers (OPA09, OPB01, OPB08, and UBC220) generated RAPD fragments exhibiting fixed frequencies in at

(T3)

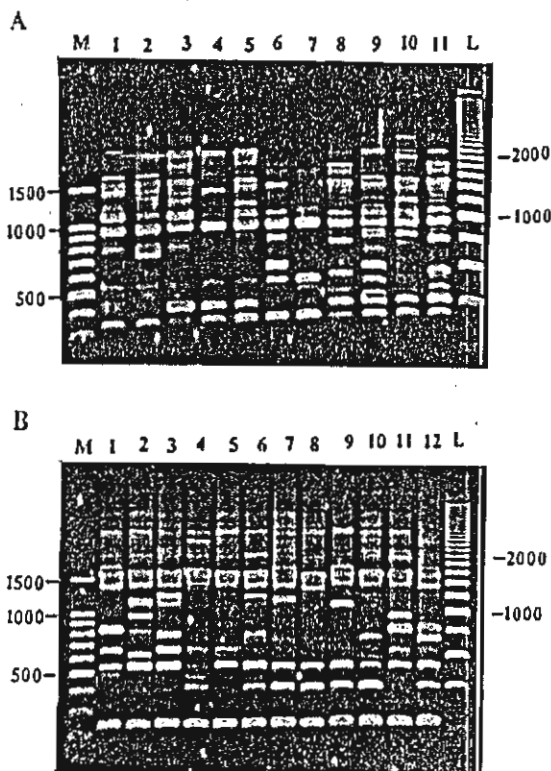


Figure 5. Examples of RAPD patterns of *Saccostrea forskali* (A, lanes 1–7 and 10), *Striostrea mytiloides* (A, lanes 8, 9 and 11), and *Saccostrea commercialis* (B) generated by RAPD-PCR using the primer UBC210. Lanes M and L are the 100-bp and 200-bp DNA ladders, respectively.

least one oyster species (Table 4). The primer OPB08 yielded species-specific markers in all commercially cultured oyster species in Thailand, whereas primers OPB01 and OPA09 specifically provided RAPD markers in both *C. belcheri* and *C. iredalei*. The primer UBC220 yielded an additional species-diagnosis fragment (1800 bp) in *Saccostrea cucullata* (Figures 2–4 and Table 4). No species-specific RAPD fragments were found in *Striostrea mytiloides* and *Saccostrea forskali* (Figure 5). Population-specific markers were not observed in any oyster species.

Genetic Distances and Phylogenetic Relationships of Thai Oysters

Generally genetic differences within species were much lower than those between different oyster species with the exception of those between *Striostrea mytiloides* and *Sac-*

Table 2. Sequences of RAPD Primers, Sizes, and Number of Amplified Bands, and Percentage of Polymorphic Bands Based on RAPD Analysis of Five Oysters in Thailand*

Primer	Nucleotide sequence	Size range (no. of RAPD bands)	Percentage of polymorphic bands
OPA09	GGGTAACGCC	200–1750 (55)	100
OPB01	GTTTCGCTCC	375–2100 (42)	100
OPB08	GTCACACGG	275–2500 (62)	100
UBC210	GCACCGAGAG	235–2000 (44)	100
UBC220	GTCGATGTCG	280–2300 (51)	100
Overall		200–2500 (254)	100

**Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, *Saccostrea cucullata*, *Striostrea mytiloides*, and *Saccostrea forskali*.

costrea forskali (Table 5). The average genetic distance within *C. belcheri* (0.126) was much lower than those within *C. iredalei* (0.266), *Saccostrea cucullata* (0.446), *Striostrea mytiloides* (0.607), and *Saccostrea forskali* (0.690).

A neighbor-joining tree constructed from genetic distances of all pairs of geographic samples indicated well-separated allocation among *C. belcheri*, *C. iredalei*, and *Saccostrea cucullata* but a closed relationship between *Striostrea mytiloides* and *Saccostrea forskali* (Figure 6).

DISCUSSION

Several molecular genetic studies addressing population genetics (Hedgecock and Okazaki, 1984; Karl and Avise, 1992, 1993; Foltz and Hu, 1996; Smail and Chapman, 1997), intraspecific phylogeography (Reeb and Avise, 1990; Hare and Avise, 1998), and interspecific phylogenetic relationships and genetic differentiation (Banks et al., 1993; Anderson and Adlard, 1994; Littlewood, 1994; Boudry et al., 1998) have been reported in oysters. Nevertheless, there have been no publications on genetic diversity and species-diagnostic markers of commercial oysters in Thailand, which are necessary to elevate culture and management efficiency of these taxa.

Table 3. Average Number of Bands per Primer, Number of Monomorphic and Polymorphic Bands, Percentage of Polymorphic Bands, and Mean of a Ratio Between the Number of Genotypes and the Number of Investigated Individuals Within Each Oyster Species Revealed by RAPD Analysis Using Five Primers*

Species	Average no. of bands per primer	No. of monomorphic/polymorphic bands	Percentage of polymorphic bands	Mean no. of genotypes per no. of investigated individuals
<i>Crassostrea belcheri</i>	12.4	29/33	53.23	0.58
<i>Crassostrea iredalei</i>	15.0	19/56	77.67	0.90
<i>Saccostrea cucullata</i>	26.0	3/127	97.69	0.98
<i>Striostrea mytiloides</i>	26.6	2/131	98.50	1.00
<i>Saccostrea forskali</i>	31.2	1/155	99.36	1.00
<i>Saccostrea commercialis</i>	17.4	12/75	86.21	1.00

*Primers OPA09, OPB01, OPB08, UBC210, and UBC220.

Table 4. Species-Specific Markers of Commercial Cultured Oysters in Thailand Identified by RAPD Analysis of Four Oligonucleotide Primers

Primer	Species	RAPD markers (bp)
OPA09	<i>Crassostrea belcheri</i>	250
	<i>Crassostrea iredalei</i>	1150
OPB01	<i>Crassostrea belcheri</i>	2100, 1400, 1250, 650
	<i>Crassostrea iredalei</i>	700
OPB08	<i>Crassostrea belcheri</i>	1650, 1550, 835, 600
	<i>Crassostrea iredalei</i>	1250, 450
	<i>Saccostrea cucullata</i>	750
UBC220	<i>Saccostrea cucullata</i>	1800

Using RAPD analysis, a large number of genotypes of 5 oyster species (genera *Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand was generated from each primer, indicating extremely high genetic diversity of these taxa. To eliminate the effects of different sample sizes, we introduced a ratio between the number of genotypes per primer and the number of investigated specimens in a particular species, which is more reliable than the number of genotypes alone. The lowest level was observed in *C. belcheri* (0.58), whereas other species showed highest levels of this ratio (0.90 in *C. iredalei*, 0.98 in *Saccostrea cucullata*, and 1.0 in *Striostrea mytiloides* and *Saccostrea forskali*). This suggested that inbreeding is currently not a major concern for natural oyster populations in Thailand.

All RAPD bands generated by each primer used in this

study were polymorphic (observed in less than 95% of investigated individuals overall). This was similar to results from studies of genetic diversity of three sympatric mud crabs of the genus *Scylla* in eastern Thailand (Klinbunga et al., 2000). Our data suggested the potential of RAPD analysis to determine interspecific genetic differences between oysters in Thailand, particularly *C. belcheri*, *C. iredalei*, and *Saccostrea cucullata*.

The average number of bands per primer and the percentage of polymorphic bands of *Saccostrea* and *Striostrea* oysters were much greater than those of *Crassostrea* oysters, indicating the lowest level of genetic diversity in the last group. The level of polymorphic RAPD bands in *Crassostrea* was comparable to that of 5 geographic populations of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* in Thailand (Tassanakajon et al., 1998), specific pathogen-free and wild stocks of the shrimp *P. vannamei* originating from Sinaloa and Oaxaca in Mexico (Garcia et al., 1994), and 3 species of mud crabs of the genus *Scylla* in eastern Thailand (Klinbunga et al., 2000). Conversely, the percentage of polymorphic bands in *Saccostrea* and *Striostrea* species (97.69%, 98.50%, and 99.36% in *Saccostrea cucullata*, *Striostrea mytiloides*, and *Saccostrea forskali*, respectively) was higher than those taxa.

The number of monomorphic bands of each species (observed in at least 95% of individuals in a particular species) varied greatly among different oyster species. Several unique RAPD fragments exhibiting fixed frequencies were observed in *C. belcheri* and *C. iredalei*, whereas 2 fragments were specifically found in *Saccostrea cucullata*. This indi-

Table 5. Genetic Distances Between Pairs of Geographic Samples Calculated from RAPD Analysis of Five Local Oysters (*Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iradalei*, *Saccostrea cucullata*, *Saccostrea mytiloides*, and *Saccostrea forskali*) and an Ingroup References, *Saccostrea commercialis*, Using Primers OPA09, POB01, OPB08, UBC210, and UBC220

	CBSdE	CBSkE	CBKnW	CBKdW	CIOE	CIPJE	CISKE	CIPnW	SCtIE	SCQIE	SCRnW	SCPKW	SMRnW	SMSE	SFOE	SFOE	SFPJE	SFSkE	SFRnW	SFSW	SOOM	
CBSdE	—																					
CBSkE	0.105	—																				
CBKnW	0.128	0.124	—																			
CBKdW	0.135	0.150	0.095	—																		
CIOE	0.677	0.705	0.699	0.670	—																	
CIPJE	0.699	0.695	0.686	0.662	0.149	—																
CISKE	0.700	0.690	0.699	0.677	0.605	0.201	—															
CIPnW	0.673	0.676	0.680	0.657	0.205	0.216	0.218	—														
SCtIE	0.780	0.771	0.780	0.794	0.776	0.775	0.760	0.767	—													
SCQIE	0.766	0.764	0.776	0.784	0.783	0.781	0.783	0.770	0.506	—												
SCRnW	0.770	0.765	0.792	0.790	0.753	0.756	0.738	0.747	0.418	0.495	—											
SCPKW	0.784	0.778	0.802	0.811	0.777	0.793	0.767	0.771	0.415	0.438	0.404	—										
SMRnW	0.729	0.716	0.725	0.728	0.747	0.736	0.756	0.729	0.696	0.666	0.672	0.666	—									
SMSE	0.757	0.745	0.765	0.757	0.787	0.793	0.809	0.782	0.757	0.710	0.733	0.703	0.565	—								
SFOE	0.755	0.739	0.754	0.746	0.755	0.749	0.752	0.747	0.716	0.691	0.701	0.685	0.566	0.553	—							
SFOE	0.752	0.736	0.749	0.739	0.776	0.768	0.782	0.776	0.734	0.665	0.687	0.690	0.550	0.663	0.601	0.517	—					
SFPJE	0.784	0.765	0.792	0.778	0.746	0.739	0.743	0.753	0.697	0.645	0.639	0.639	0.531	0.630	0.577	0.514	0.478	—				
SFSkE	0.769	0.748	0.758	0.738	0.737	0.739	0.744	0.722	0.693	0.702	0.675	0.683	0.534	0.669	0.656	0.546	0.540	0.562	—			
SFSkE	0.765	0.755	0.767	0.752	0.760	0.735	0.749	0.744	0.703	0.660	0.644	0.673	0.538	0.655	0.573	0.526	0.476	0.434	0.603	—		
SFRnW	0.756	0.752	0.769	0.760	0.766	0.763	0.759	0.758	0.670	0.641	0.679	0.639	0.609	0.686	0.639	0.577	0.534	0.527	0.629	0.545	—	
SFSW	0.765	0.756	0.778	0.769	0.767	0.758	0.702	0.756	0.686	0.632	0.676	0.626	0.604	0.671	0.626	0.584	0.554	0.521	0.616	0.530	0.431	—
SOOM	0.764	0.750	0.767	0.748	0.774	0.753	0.707	0.763	0.740	0.710	0.731	0.714	0.651	0.681	0.646	0.651	0.637	0.640	0.690	0.636	0.628	0.648

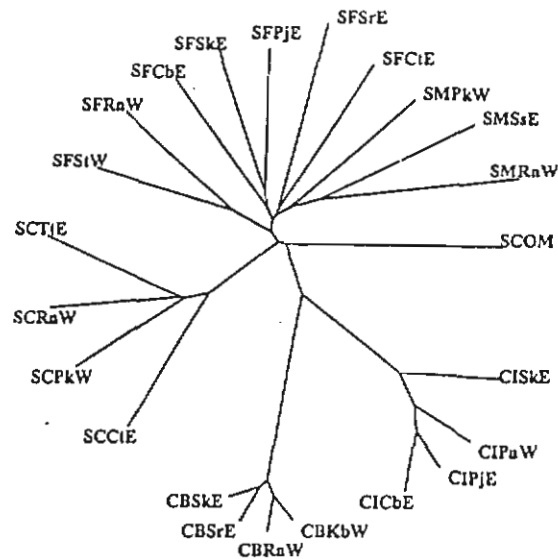


Figure 6. A neighbor-joining tree illustrating genetic relationships of 5 oyster species locally found in Thailand based on genetic distances resulted from RAPD analysis using 5 primers (OPA09, OPB01, OPB08, UBC210, and UBC220). The Australian oyster (*Saccostrea commercialis*) was included as an ingroup reference.

cated the possibility to further develop sequence-characterized amplified region (SCAR) markers through cloning and sequencing of these specific bands (Weising et al., 1995). We did not observe any fixed RAPD fragment in *Striostrea mytiloides* and *Saccostrea forskali*. However, RAPD primers used in this study generated 12 fixed fragments in *Saccostrea commercialis*, suggesting the possibility of using these primers to identify useful genetic markers in this species.

Interspecific hybridization between *C. gigas* and *C. rivularis* resulted in viable and fertile progeny (Allen and Gaffney, 1993). Charoensit (1995) examined interspecific and intergeneric hybridization between *C. belcheri*, *C. iredalei*, and *Saccostrea cucullata* in laboratory conditions. Hybrid progeny between 2 *Crassostrea* species survived to the spat stage, whereas intergeneric hybridization between female *C. iredalei* and male *S. cucullata* was surprisingly successful. This information indicated further complications in taxonomic identification of oysters through hybridization. Species-diagnostic markers found in *C. belcheri*, *C. iredalei*, and *Saccostrea cucullata* are thus useful for examination of the correct seed and broodstock species and for estimating the degree of hybridization in natural populations of Thai oysters.

Genetic differences within each *Crassostrea* species were much lower than those within each *Saccostrea* and *Striostrea* species. The results were in accord with those based on morphological studies (Brock, 1990) and allozyme electrophoresis (Buroker et al., 1979; Hedgecock, 1995; Visootviseth et al., 1998). High genetic diversity within each oyster may have reflected correlation between genetic adaptation to climatic or environmental variants (Buroker, 1985).

A neighbor-joining tree constructed from genetic distances between pairs of geographic samples illustrated a clear separation between *Crassostrea* and *Saccostrea*. Within the former group, clear phylogenetic differences between oysters from different coastal areas (between the east and west of peninsular Thailand) were consistently observed in *C. belcheri* but not in *C. iredalei*. Within the latter genus, *Saccostrea cucullata* was well allocated to a separate group whereas *Striostrea mytiloides* showed close relationships with *Saccostrea forskali*. Formerly, *Striostrea mytiloides* was regarded as *Saccostrea echinata* (Yoosukh and Duangdee, 1999). The placement of *Striostrea mytiloides* samples as a sister taxon with those of *Saccostrea forskali* (SFSrE and SFCtE) suggested that these species are closely related phylogenetically. Our results based on PCR restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S ribosomal DNA of the same sample set support this conclusion (data not shown). Accordingly, *Striostrea mytiloides* should be recognized as a member of *Saccostrea* rather than *Striostrea*. The second group of *Saccostrea forskali* (SFSiW, SFRnW, SFCbE, SFSkE, and SFPjE) showed phylogeographic relationships between geographic samples originating from different coastal regions.

Several pairwise comparisons between an ingroup reference (*Saccostrea commercialis*) and Thai oysters suggested that genetic divergence evaluated from the RAPD approach rapidly reaches a plateau of divergence among these taxa. This may result in saturated phylogenetic signals of data in this study. Other molecular approaches such as DNA sequencing or restriction analysis of conserved gene regions (e.g., 18S and 16S rDNA) may provide more reliable data than the RAPD approach.

Notably, results from this study were drawn solely from sharing of RAPD-amplified fragments after electrophoresis. The possibility of comigration of RAPD fragments having different sequences but similar sizes cannot be excluded. As a result, homology of comigrating diagnostic fragments should be further verified by Southern blotting analysis (Hadrys et al., 1992). This would result in more valid and

stable data for taxonomic identification and subsequent applications in breeding programmes of these taxa.

Saccostrea oysters have been reported to display ecomorphological variation (Tack et al., 1992). All *Saccostrea* oysters in Thailand were previously assumed to be only *S. cucullata* (Visoothiviseth et al., 1998). Results from our study indicated that more than one *Saccostrea* species is present in Thai waters, implying problems with the use of a part of the species complexes for aquaculture.

Moreover, the *Saccostrea* oyster originating from Chonburi (SFCbE) had been misidentified as *Saccostrea commercialis* (Department of Fisheries, 1993b). Our RAPD results indicate that it may not be *S. commercialis* due to a lack of species-diagnostic markers typically found in that species and phylogenetic relationships of oysters in this study. Nevertheless, replicate sampling of the extensive non-Thai *S. commercialis* over its geographic range is required to draw an unambiguous conclusion.

In December 1996, a massive die-off (approximately 90%) of *C. belcheri* broodstock in Suratthani (the most important cultivated area of this species in Thailand) occurred. Stock enhancement programs of *C. belcheri* are being carried out in that area (P. Jarayabhand, personal communication). Our data indicated high genetic heterogeneity of the Thai oysters genera *Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea* and a possible population subdivision in *C. belcheri* (Figure 6 and Table 5). Nevertheless, intraspecific population differentiation of *C. belcheri* in Thailand in a large sample has not been studied. Therefore, indigenous *C. belcheri* broodstock should presently be used for restocking purposes. This will prevent anthropological disturbances of the gene pool of this economically important oyster.

RAPD-PCR analysis has been used successfully to determine population differentiation in the giant tiger shrimp *P. monodon* (Tassanakajon et al., 1998), to identify species-specific markers in mud crabs *Scylla serrata*, *S. oceanica*, and *S. tranquebarica* in eastern Thailand, and to demonstrate a lack of interspecific hybridization between these taxa (Klinbunga et al., 2000). In the present study, we illustrate the use of this approach to identify large genetic differences between Thai oysters and several species-specific RAPD fragments in *C. belcheri*, *C. iredalei*, and *Saccostrea cucullata*. These genetic markers can be further used for aquaculture (selection of a particular broodstock species and determination of seed species) and biological applications (patterns of distribution and recruitment) in these taxa (Linstrom, 1999).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mr. Somchai Bussarawit, Mr. Piyapong Chotipuntu, and Mr. Teerapong Dunagdee for helping us collect specimens used in this study. Our sincere appreciation goes to the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), the National Science and Technology Development Agency (NSTDA), and the Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for providing facilities required by our experiments. This work is supported by Thailand Research Fund (TRF) project number RDG4120018.

REFERENCES

- Allen, S.K., and Gaffney, P.M. (1993). Genetic confirmation of hybridization between *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Crassostrea rivularis* (Gould). *Aquaculture* 113:291-300.
- Anderson, T.J., and Adlard, R.D. (1994). Nucleotide sequence of a rDNA internal transcribed spacer supports synonym of *Saccostrea commercialis* and *S. glomerata*. *J Moll Stud* 60:196-197.
- Banks, M.A., Hedgecock, D., and Waters, C. (1993). Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol Mar Biol Biotechnol* 2:129-136.
- Boudry, P., Heurtebise, S., Collet, B., Cornette, F., and Gérard, A. (1998). Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *J Exp Mar Biol Ecol* 226:279-291.
- Brock, V. (1990). Intergeneric distances between *Ostrea*, *Crassostrea*, and *Saccostrea*, studied by means of crossed immunoelectrophoresis. *Mar Ecol Prog Ser* 68:59-63.
- Buroker, N.E. (1985). Evolutionary patterns in the family Ostreidae: larviparous vs oviparous. *J Exp Mar Biol Ecol* 90:233-247.
- Buroker, N.E., Nershbeger, W.K., and Chew, K.K. (1979). Population genetics of the family Ostreidae, II: interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Mar Biol* 54:171-184.
- Charoensit, P. (1995). *Hybridization in Commercial Oysters*. M.Sc. thesis, Chulalongkorn University, Thailand.
- Department of Fisheries. (1993a). *Fisheries Statistics of Thailand 1991*. Bangkok, Thailand: Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Department of Fisheries. (1993b). *Manual for Cultivation of Oys-*

- ters. Bangkok, Thailand: Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives. In Thai.
- Department of Fisheries. (1998). *Fisheries Statistics of Thailand 1995*. Bangkok, Thailand: Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Felsenstein, J. (1993). *PHYLIP (Phylogenetic Inference Package) Version 3.5c*. Seattle: Department of Genetics, University of Washington. Distributed by the author.
- Foltz, D.W., and Hu, Y.-P. (1996). Genetics of scnDNA polymorphisms in juvenile oysters (*Crassostrea virginica*), part II: heterozygosity deficiency and gametic disequilibrium in natural population samples. *Mol Mar Biol Biotechnol* 5:130-137.
- Fritsch, P., Hanson, M.A., Spore, C.D., Pack, P.E., and Rieseberg, L.H. (1993). Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Mol Biol Rep* 11:10-20.
- Garcia, D.K., Faggart, M.A., Rhoades, L., Alcivar-Warren, A.A., Wyban, J.A., Carr, W.H., Sweeney, J.N., and Ebert, K.M. (1994). Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:270-280.
- Hadrys, H., Balick, M., and Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol* 1:55-63.
- Hare, M.P., and Avise, J.C. (1998). Population structure in the American oyster as inferred by nuclear gene genealogies. *Mol Biol Evol* 15:119-128.
- Hedgecock, D. (1995). The cupped oyster and the Pacific oyster. In: *Conservation of Fish and Shellfish Resources: Managing Diversity*, Thorpe, J., Gall, G., Lannan, J., and Nash, C. (eds.). London: Academic Press, 115-137.
- Hedgecock, D., and Okazaki, N.B. (1984). Genetic diversity within and between populations of American oysters (*Crassostrea*). *Malacologia* 25:535-549.
- Heipel, D.A., Bishop, J.D.D., Brand, A.R., and Thorpe, J.P. (1998). Population genetic differentiation of the great scallop *Pecten maximus* in western Britain investigated by randomly amplified polymorphic DNA. *Mar Ecol Prog Ser* 162:163-171.
- Jarayabhand, P., and Thavornyutikarn, M. (1995). Realized heritability estimation on growth rate of oyster, *Saccostrea cucullata* Born, 1778. *Aquaculture* 138:111-118.
- Jarayabhand, P., Rungsupa, S., Chaitanavisuti, N., and Kanjanamawin, P. (1985). A preliminary study on the induced spawning of oyster (*Crassostrea* sp.) in Thailand. In: *Proceeding of the Conference on Living Aquatic Resources*. Bangkok, Thailand: Chulalongkorn University, 272-285.
- Jarayabhand, P., Jareonita, S., Srisaard, C., and Menasveta, P. (1994). Experiments on larviculture of Thai oyster species. *Thai J Aquat Sci* 1:43-53.
- Karl, S.A., and Avise, J.C. (1992). Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLPs. *Science* 256:100-102.
- Karl, S.A., and Avise, J.C. (1993). PCR-based assays of Mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA: techniques and applications for population genetics. *Mol Biol Evol* 10:342-361.
- Klinbunga, S., Penman, D.J., and McAndrew, B.J. (1996). An improved protocol for total DNA isolation and visualization of mtDNA RFLP(s) in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Thai J Aquat Sci* 3:36-41.
- Klinbunga, S., Boonyapakdee, A., and Pratoomchat, B. (2000). Genetic diversity and species diagnostic markers of mud crabs (genus *Scylla*) in eastern Thailand determined by RAPD analysis. *Mar Biotechnol* 2:180-187.
- Linstrom, D.P. (1999). Molecular species identification of newly hatched Hawaiian amphidromous gobioid larvae. *Mar Biotechnol* 1:167-174.
- Littlewood, D.T.J. (1994). Molecular phylogenetics of cupped oysters based on partial 28S rDNA gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 3:221-229.
- Lynch, M. (1990). The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol Biol Evol* 7:478-484.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Nei, N., and Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5269-5273.
- Patwary, M.U., Kenchington, E.L., Bird, C.J., and Zouros, E. (1994). The use of random amplified polymorphic DNA markers in genetic studies of the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). *J Shellfish Res* 13:547-553.
- Reeb, C.A., and Avise, J.C. (1990). A genetic discontinuity in a continuously distributed species: mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics* 124:397-406.
- Sahavachrin, S., Chindanond, A., Amornjaruchit, S., Nugranad, J., Silapajarn, K., Chawivarnskorn, V., Limsurat, S., Angell, C.L., McCoy, E.W., Mutaraasint, K., and Potaros, M. (1988). Hatcheries techniques for tropical bivalves molluscs. In: *Bivalve Mollusc Culture Research in Thailand*, McCoy, C.L., and Chongpeepian, T. (eds.). Manila, Philippines: International Center for Living

- Aquatic Resources Management, 19–30. ICLARM Technical Report 19.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425.
- Small, M.P., and Chapman, R.W. (1997). Intraspecific variation in the 16S ribosomal gene of *Crassostrea virginica*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 6:189–196.
- Tack, J.F., Berghe, E., and Polk, P.H. (1992). Ecomorphology of *Crassostrea cucullata* (Born, 1778) (Ostreidae) in a mangrove creek (Gazi, Kenya). *Hydrobiologia* 247:109–117.
- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Rimphanitchayakit, V., Jarayabhand, P., and Boonsaeng, V. (1997). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Mol Mar Biol Biotechnol* 6:110–115.
- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., and Boonsaeng, V. (1998). Genetic structure in wild populations of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Mar Biotechnol* 6:249–254.
- Tyler-Walters, H., and Hawkins, A.R. (1995). The application of RAPD markers to the study of the bivalve mollusc *Lasaea rubra*. *J Mar Biol Assoc UK* 75:563–569.
- Vaught, K.C. (1989). *A Classification of Living Mollusca*. Melbourne: American Malacologists, Inc.
- Visootviseth, P., Day, A., and Siwadune, T. (1998). Electrophoretic and morphometric analyses in species differentiation of small oysters, *Saccostrea* spp., in Thailand. *J Sci Soc Thailand* 24:24–36.
- Weising, K., Nybom, H., Wolf, K., and Meyer, W. (1995). *DNA Fingerprinting in Plant and Fungi*. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- Welsh, J., and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18:7213–7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18:6531–6535.
- Yoosukh, W. (1988). *Oysters in Thailand*. Bangkok, Thailand: Marine Science Department, Kasetsart University.
- Yoosukh, W., and Duangdee, T. (1999). Living oysters in Thailand. In: *Phuket Marine Biological Center Special Publication No. 19*. Phuket, Thailand: Marine Biological Center, 363–370.

Development of Species-Specific Markers of the Tropical Oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand

S. Klinbunga,^{1,*} P. Ampayup,² A. Tassanakajon,² P. Jarayabhand,³ and W. Yoosukh⁴

¹Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Bangkok 10400, Thailand

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³Angsila Marine Biological Research Station, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Chonburi 20210, Thailand; and Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁴Department of Marine Science, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Abstract: Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to identify species-specific markers of 5 oyster species in Thailand: *Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, *Saccostrea cucullata*, *Saccostrea forskali*, and *Striostrea* (*Parastriostrea*) *mytiloides*. Species-specific markers were found in *C. belcheri*, *C. iredalei*, and *S. cucullata* but not in *S. forskali* and *S. mytiloides*. Three *C. belcheri*-specific RAPD fragments were cloned and sequenced. A primer set was designed from each of the recombinant clones (pPACB1, pPACB2, and pPACB3). The polymerase chain reaction products showed expected sizes of 536, 600, and 500 bp, respectively, with the sensitivity of detection approximately 30 pg of *C. belcheri* total DNA template. The specificity of pPACB1 was examined against 135 individuals of indigenous oyster species in Thailand and against outgroup references *S. commercialis* ($N = 12$) and *Perna viridis* ($N = 12$). Results indicated the 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 the selective breeding program for this commercially important species.

Key words: oyster, species-specific markers, RAPD, PCR, *Crassostrea belcheri*.

INTRODUCTION

Oysters are benthic marine species exhibiting long planktonic larval stages (Avisé, 1994). They inhabit near-shore, shallow-water bays, and estuaries and are widely distributed throughout the world between 64°N and 44°S (Hedgecock, 1995). Principally on the basis of shell morphology, 15 oys-

ter species belonging to 7 genera from the families Ostreidae and Gryphaeidae are recognized in Thai waters (W. Yoosukh, unpublished data). Within the genera *Crassostrea* and *Saccostrea* (subfamily Crassostreidae, Ostreidae), 5 species are locally found in Thailand: *Crassostrea belcheri*, *C. iredalei*, *Saccostrea cucullata* (which are commercially cultured; see Jarayabhand and Thavornytikarn, 1995), *S. forskali*, and *Striostrea* (*Parastriostrea*) *mytiloides* (formerly called *S. echinata*). Nevertheless, *C. belcheri* is the most commercially important oyster species in Thailand (Charoensit, 1995).

Received December 8, 1999; accepted March 16, 2000.

*Corresponding author: Marine Biotechnology Research Unit, c/o Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; telephone +66-2-2185279; fax +66-2-2547680; e-mail sirawut@biotec.or.th

The production of cultured oysters in Thailand has been approximately 2000 tons annually since 1986 (Department of Fisheries, 1993). Cultivation of *C. belcheri* using wild seed has suffered from limitation of supply. This is due mainly to heavy exploitation of natural *C. belcheri* and destruction of its habitats. Therefore, large-scale propagation of hatchery-produced seed was developed (Jarayabhand et al., 1985; Sahavacharin et al., 1988). Subsequently, experimentation on *C. belcheri* has been carried out to support sustainable aquaculture of this species (Jarayabhand et al., 1994).

The taxonomic identification of oysters is presently unclear; as a result, selection of correct broodstock species is one of the main factors for the successful culture of *C. belcheri*. All commercially cultured oysters in Thailand belong to the genera *Crassostrea* (*C. belcheri* and *C. iredalei*) and *Saccostrea* (*S. cucullata*). These can be differentiated by external morphology and by the absence of chromata in the former. Within the genus *Crassostrea*, oysters having black adductor muscle scars are taxonomically regarded as *C. iredalei* and those having white scars as *C. belcheri* (Visootviseth et al., 1998).

Although the method of distinguishing *C. belcheri* and *C. iredalei* is simple, sacrifice of broodstock is often unavoidable. In breeding programs for *C. belcheri*, a nondestructive identification method is desired. Moreover, identification of correct seed species is also necessary for monospecific farming and for quality control of commercial trading of *C. belcheri* seed. This is difficult for species identification based principally on morphological characters. Accordingly, genetic markers specifically found in *C. belcheri* need to be developed.

Appropriate genetic markers are useful and can be utilized to increase culture and efficiency of management for several marine species (Buroker et al., 1979; Boom et al., 1994; Bell and Grassle, 1998; Linstrom, 1999). Nevertheless, almost all of the genetic studies of the genus *Crassostrea* have been restricted to the investigation of intraspecific genetic polymorphism of various oyster species, particularly *C. gigas* and *C. virginica* (Reeb and Avise, 1990; Foltz and Hu, 1996; Hu and Foltz, 1996; Small and Chapman, 1997).

To date, there have been no publications concerning molecular genetic studies of *C. belcheri* in Thailand. These are essential for the development of effective breeding and management programs for this economically important species. Randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) analysis is a relatively simple

method for identification of genetic markers at different taxonomic levels without knowledge of the genome being investigated (Welsh and McClelland, 1990; Williams et al., 1990; Hadrys et al., 1992).

We focused on cloning, sequencing, and designing species-specific primers of RAPD markers that were specifically found in *C. belcheri* but were absent in other oysters of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea* found in Thailand. The objective of this experiment was the development of reproducible species-diagnostic markers for *C. belcheri*. These markers and RAPD markers will offer accurate identification and selection of seed and broodstock of *C. belcheri* to improve culture efficiency for this economically important species.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Twenty *C. belcheri* individuals were collected from 4 geographically different regions of Peninsular Thailand: Surat ($N = 10$) and Songkhla ($N = 4$) located in the Gulf of Thailand; and Ranong ($N = 3$) and Krabi ($N = 3$) located in the Andaman Sea (Figure 1). Other oyster species locally found in Thailand, including *C. iredalei* ($N = 24$), *S. cucullata* ($N = 26$), *S. mytiloides* ($N = 6$), and *S. forskali* ($N = 59$), were collected throughout their geographic ranges.

Twelve individuals of *S. commercialis* and the mussel *Perna viridis*, collected from Australia and eastern Thailand, respectively, were included as outgroup references. Specimens were transported back to the laboratory at the Marine Biotechnology Research Unit (MBRU), Chulalongkorn University, and stored at -30°C until needed.

DNA Extraction

Total DNA was individually extracted from the adductor muscle of each oyster using the phenol-chloroform-sodium dodecyl sulfate (SDS) method of Klinbunga et al. (1996). DNA concentration was spectrophotometrically determined and further adjusted by a minigel method (Maniatis et al., 1982).

RAPD Analysis and Agarose Gel Electrophoresis

A total of 103 octanucleotide primers purchased from University of British Columbia and Operon Technologies Ltd.



Figure 1. Map of Thailand illustrating sampling collection sites for *C. belcheri* used in this study.

were screened (Fitsch et al., 1993). Three primers (OPA09, GGGTAACGCC; OPB01, GTTTCGCTCC; and OPB08, GTCCACACGG) were chosen to amplify DNA extracted from 6 oyster species and the mussel *P. viridis*. RAPD-PCR was carried out in a 25- μ l reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.001% gelatin, 100 μ M of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), 0.2 μ M of primer, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus), and 50 ng of genomic DNA (Tassanakajon et al., 1998). The amplification reaction was carried out for 40 cycles using a DNA thermocycler (Perkin-Elmer Cetus model 2400) consisting of denaturation at 94°C for 10 seconds, annealing at 36°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 90 seconds. The final extension was performed at 72°C for 5 minutes (Okumura et al., 1993). The RAPD

products were electrophoretically analyzed through 1.5% agarose gels and visualized using a UV transilluminator after ethidium bromide staining (Maniatis et al., 1982).

Cloning of *C. belcheri*-Specific RAPD Fragments

Three RAPD bands constituting a 650-bp fragment from OPB01 and 835-bp and 600-bp fragments from OPA08 were cloned using either a T-A cloning method (Hoelzel and Green, 1992) or a *Bam*HI sticky-end adapter method (Vincent et al., 1993). A 650-bp fragment was excised and recovered from the gel using a gel extraction kit (Qiaquick, Qiagen Ltd.). The purified DNA was reamplified using an original primer, OPB01, and digested with proteinase K (50 μ g/ml in the presence of 0.5% SDS) at 65°C for 1 hour followed by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. DNA was directly ligated to pGEM-T easy vector using the conditions recommended by the manufacturer (Promega).

Alternatively, gel-purified 835-bp and 600-bp fragments were reamplified by the primer OPB08 containing a *Bam*HI restriction site (CGGGATCCCGGTCCACACGG). Each of reamplified fragments was purified as above before restriction with *Bam*HI and purified by phenol-chloroform extraction. Approximately 100 ng of DNA was cloned into a *Bam*HI cloning site of 50 ng of dephosphorylated pUC18 (Pharmacia). One-tenth volume of each ligation reaction was electrotransformed to *Escherichia coli* XL-1 BLUE (Dower et al., 1988). Recombinant clones were selected by a *lac Z'* system following standard protocols (Brown, 1991).

Primer Design, Sensitivity, and Species-Specific Tests

Three recombinant clones (pPACB1, pPACB2, and pPACB3) exhibiting 650-bp, 835-bp, and 600-bp inserts were sequenced for both directions using an automatic sequencer (ABI377, PE Applied Biosystems). A pair of primers was designed from each fragment using OLIGO 4.0. After the optimal PCR conditions were calibrated, sensitivity to detect target DNA for each pair of primers was examined against varying concentrations of *C. belcheri* template (16.25 pg to 25 ng). Species-specific PCR was performed using reaction components identical to those of RAPD-PCR except a single RAPD primer was replaced by the primers for pPACB1, pPACB2, and pPACB3, each to 0.4 μ M final concentration. The reaction was carried out for 25 cycles composed of a 94°C denaturation step for 45 seconds, a 62°C

Table 1. Species-Specific Markers of Oysters (Genera *Crassostrea* and *Sacrosstrea*) in Thailand Based on RAPD Analysis Using Primers OPA09, OPB01, and OPB08

Species	RAPD markers (bp)	Primer
<i>C. belcheri</i>	1650, 1550, 835, 600	OPB08
	2100, 1400, 1250, 650	OPB01
	250	OPA09
<i>C. iredalei</i>	1250, 450	OPB08
	700	OPB01
	1150	OPA09
<i>S. cucullata</i>	750	OPB08

annealing step for 30 seconds, and a 72°C extension step for 45 seconds. The final extension was performed at the same temperature for 5 minutes. The resulting product was electrophoretically analyzed as described above. For species-specific examination, only pPACB1 primers were used to investigate the presence of a 536-bp fragment in all individuals previously examined by RAPD analysis using the same conditions as were used for the sensitivity test.

RESULTS AND DISCUSSION

RAPD-PCR has been widely used for population genetic studies of several organisms (Garcia et al., 1994; Tyler-Walters and Hawkins, 1995; Jacobsen et al., 1996; Heipel et al., 1998; Tassanakajon et al., 1998). This method has also been used for identification of molecular genetic markers in various applications including determination of mode of reproduction in the bivalve mollusk *Lasaea rubra* (Tyler-Walters and Hawkins, 1995), differentiation of two species of the freshwater mussels *Pleurobema clava* and *P. sintixia* (White et al., 1996), and generation of microsatellite markers in the blacklip abalone *Haliotis rubra* (Huang and Hanna, 1998).

Using RAPD analysis, we observed several species-specific bands in wild individuals of commercially cultured oyster species (*C. belcheri*, *C. iredalei*, and *S. cucullata*) but not in *S. mytiloides* and *S. forskali* (Table 1 and Figure 2). We did not observe any population-specific marker in 3 commercially cultured oyster species. Although the sample of *C. belcheri* used in this study was relatively small, wild specimens were collected from 4 different geographic loca-

tions on different coastal sides of peninsular Thailand. Accordingly, these *C. belcheri*-specific markers did not originate from artifacts or experimental errors.

In the present study, totals of 9, 4, and 1 species-specific fragments were observed in *C. belcheri*, *C. iredalei*, and *S. cucullata*, respectively (Table 1). In addition, several RAPD bands were specifically observed in *S. commercialis* and *P. viridis* across all investigated primers (data not shown).

RAPD-PCR is, however, sensitive to reaction conditions. This technique also requires high-quality DNA template for reliable and consistent results, which may not be possible for field specimens. This may cause significant false-negative results from investigated samples that actually are *C. belcheri*. Accordingly, we did not directly apply these markers for broodstock selection and species identification of larvae in *C. belcheri*.

To eliminate this problem, we converted *C. belcheri*-specific RAPD fragments to sequence-characterized amplified region (SCAR) markers (Weising et al., 1995). We did not attempt to develop SCAR markers from any of 5 *C. belcheri*-amplified fragments exhibiting sizes greater than 1000 bp (1650-bp and 1550-bp fragments from OPB08; and 2100-bp, 1400-bp, and 1250-bp fragments from OPB01) or from that of 250 bp generated from OPA09, owing to difficulties arising from sequencing of large RAPD fragments and the lesser possibility of designing suitable primers from a 250-bp fragment.

Three *C. belcheri*-specific RAPD fragments (a 650-bp band from OPB01 and 835-bp and 600-bp bands from OPB08) were cloned and sequenced. The actual molecular lengths of pPACB1 (Figure 3), pPACB2, and pPACB3 were 637 bp, 811 bp, and 563 bp, respectively. Comparisons of these sequences with those previously deposited in GenBank did not reveal significant similarity with any sequence. A pair of primers containing each insert was designed and used to amplify *C. belcheri* total DNA (Table 2). The sizes of PCR products were identical to those expected from their DNA sequences (536, 600, and 500 bp, respectively). Heterozygotes were not observed in investigated *C. belcheri* individuals when analyzed with these primer sets, implying the retention in a dominant segregated fashion of the original RAPD species-specific markers.

Primer sensitivity was tested by PCR amplification using homologous DNA template between 16.25 pg and 25 ng. Generally, there was good correlation between the amount of DNA template and intensity of a PCR product of all primer sets. The sensitivity of detection reached approxi-

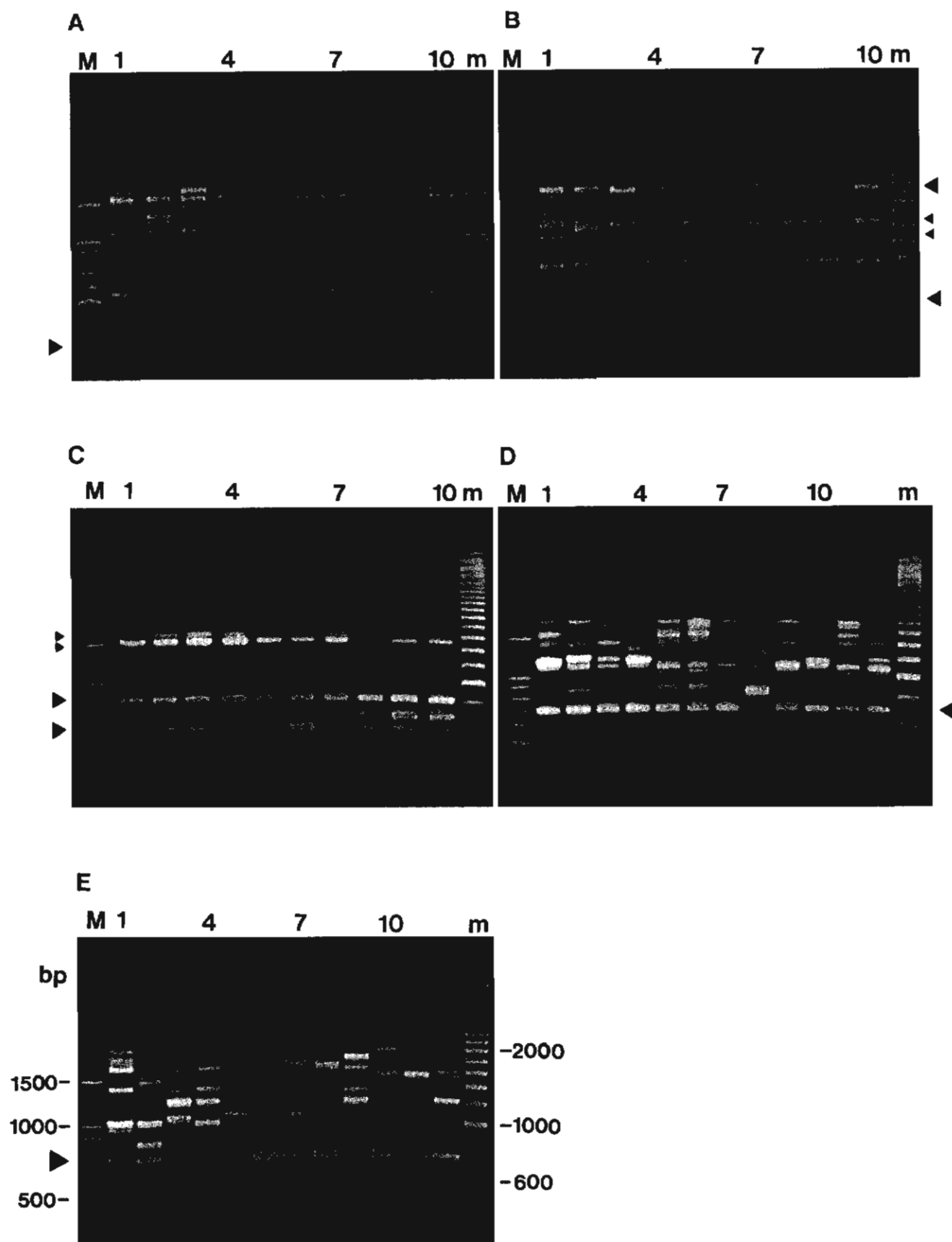


Figure 2. Species-specific RAPD markers resulted from amplification of total DNA of *C. belcheri* with OPA09 (A), OPB01 (B), and OPB08 (C), and that of *C. iredalei* (D) and *S. cucullata* (E) with OPB01 and OPB08, respectively. Arrowheads indicate species-specific RAPD bands described in Table 1. Lanes M are 100-bp ladders; lanes m, 200-bp ladders.

ATGTAATTC AACACGACAA AATCAGTGT GATTAAAAAT ATATTGTTT 50
 TTACGGCGTT GCGCTAATGC TGGCAGCCT **TCTAGCAATC** **GTCTGCATTG** 100
 CAAATCGTCC AAAAATTCAT GCTCTGCACC GCCTTCTAAC TGTGCATAAG 150
 AAACGAGTTC CATAAATAT TAAAAATATT TCAAGATTTT TATTCCATT 200
 ATTCAACTTA ATIGTGTACA AAAAATCCAA CTCTGTCTCC CTGATTATTA 250
 ACAACTCATT GCATAAGAAT AAATTGCTT AATCAAGAAA TGGCGGATGA 300
 ATACGATAAT GTGTAAAAA ATTACCCAAA TATTATTTTC GTTTATCGCC 350
 TATATTTTAT TTGGAGACCA TGCCCGACGG AAATAAAATT TAACACTTAA 400
 ATTCAATTGT TATTGGGCAC GGCTCTCCAA AATAATGTAA GCGATAAACG 450
 TATCTAGTGT TTTTGTIGCA ATAGGTAAAC ATGATATAGA TACGGCAGAT 500
 CAATTTCATG ACGTACTGTG GATTCATACC ATGACTATTA GATAGAAAAT 550
 TCAAAATTAAT GATACTATA TAAAGAAAA TGTCTTGTTC **ACGCTGTAAA** 600
pPACB1-R
ACTTTGATGC ATTGTGTATG TGAATATCAT ACCGAGA 637

Figure 3. Sequence of pPACB1 cloned from a species-specific RAPD fragment in *C. belcheri*. The location and sequence of a *C. belcheri*-specific forward primer (pPACB1-F) and those complementary to a reverse primer (pPACB1-R) appear in boldface and are underlined.

Table 2. Sequences of Oligonucleotide Primers Designed from RAPD-Amplified Specific DNA Fragments of *C. belcheri*

Clone	Primer sequence*
pPACB1	F: 5'-CAGCCTCTAGCAATCGTCT-3' R: 5'-GCATCAAAGTTTACAGCGTT-3'
pPACB2	F: 5'-CACTCGCACACAACCGTCC-3' R: 5'-AAAGTGAAAAACAGCGAATC-3'
pPACB3	F: 5'-CTAAATGAAAACTCCGCAAA-3' R: 5'-AACAACGCTTCTTAACACATA-3'

*F indicates forward; R, reverse.

mately 30 pg of DNA template for each pair of primers (Figure 4). The sensitivity level allows the possibility to use these SCAR markers to study dispersal and recruitment processes of *C. belcheri* over vast geographic areas in Thailand.

Only a pPACB1 primer pair was chosen for the specificity test in 5 local oyster species, the Australian oyster *S. commercialis*, and the mussel *P. viridis*. A positive 536-bp band was found in all *C. belcheri* individuals but not in the other species (Figure 5). The results eliminated the possibility that a 650-bp fragment in *C. belcheri* and a 700-bp fragment in *C. iredalei* were homologous.

Oysters can display ecomorphology (Littlewood, 1994). Moreover, interspecific hybridization among different oys-

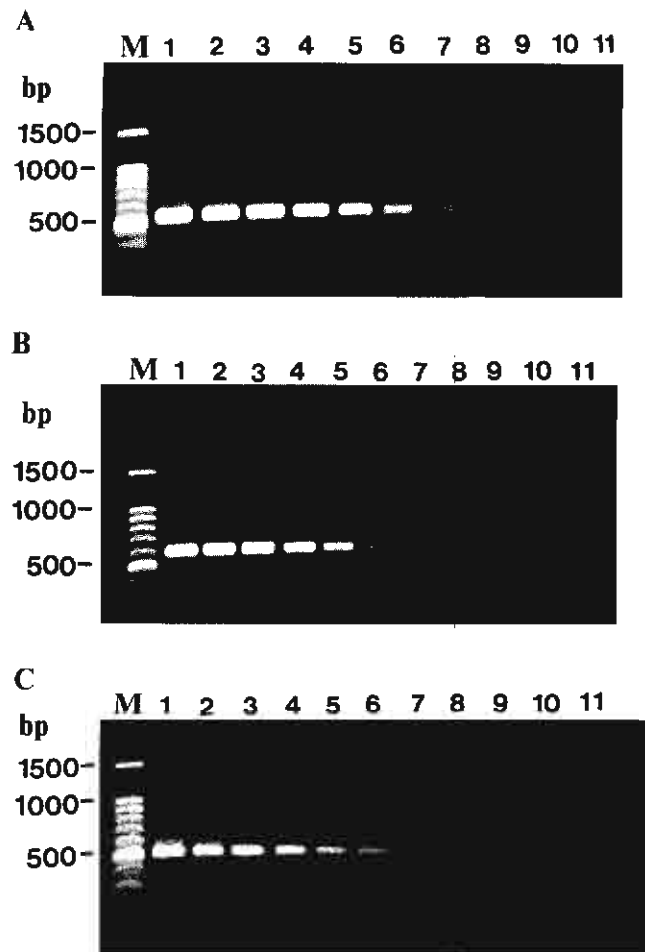


Figure 4. Sensitivity of pPACB1 (A), pPACB2 (B), and pPACB3 (C) primer sets was examined. PCR was carried out in the presence of serial dilution of *C. belcheri* DNA template (25 ng, 12.5 ng, 6.25 ng, 3.125 ng, 1 ng, 500 pg, 250 pg, 100 pg, 65 pg, 32.5 pg, and 16.25 pg, corresponding to lanes 1–11, respectively) and electrophoretically analyzed using ethidium bromide-stained 1.0% agarose gels. A 100-bp ladder (lanes M) was used as a marker.

ter species (e.g., between *C. virginica* and *C. rhizophorae*) could generate viable and fertile progeny exhibiting variation of shell morphology and scar pigmentation (Hedgecock and Okazaki, 1984). This further complicates taxonomic identification of oysters based primarily on morphology. Development of species-specific markers of each oyster species would allow direct examination of the correct larvae and broodstock species and avoid the use of a part of the species complexes for aquaculture (Banks et al., 1993; Littlewood, 1994).

Intergeneric hybridization between female *C. iredalei* and male *S. cucullata* generated viable progeny under laboratory conditions (Charoensit, 1995). Using *C. iredalei*-specific RAPD fragments, we could confirm the existence of

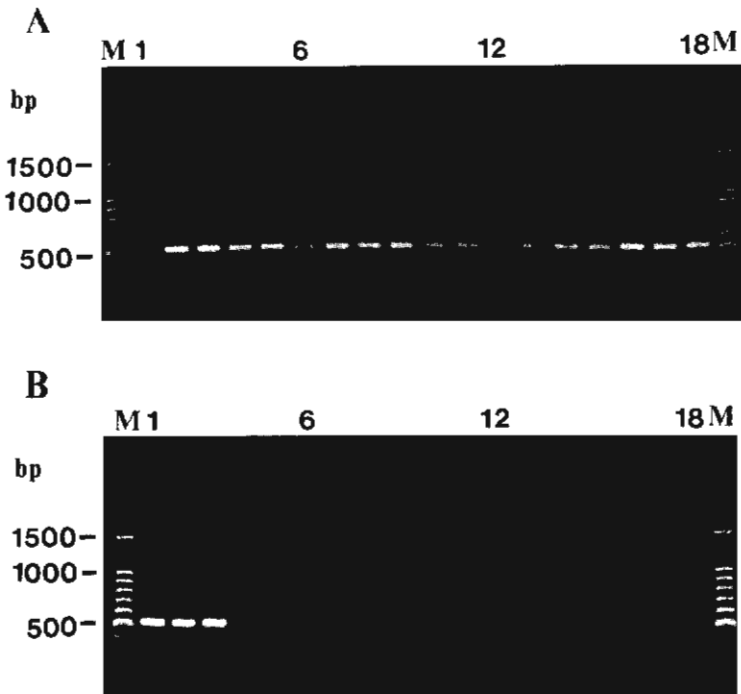


Figure 5. Agarose gel electrophoresis showing results from amplification of total DNA of *C. belcheri* (A, lanes 2–18 and B, lanes 1–3), *C. iredalei* (B, lanes 4–6), *S. cucullata* (B, lanes 7–9), *S. mytiloides* (B, lanes 10–12), *S. forskali* (B, lanes 13 and 14), *S. commercialis* (B, lanes 15–16), and *P. viridis* (B, lanes 17 and 18), for determination of pPACB1 primer specificity. Lane 1 in panel A is a negative control (without DNA template). A 100-bp ladder (lanes M) was used as a DNA marker.

introgressive hybridization of wild specimens, which were morphologically identified to be *C. iredalei*-like oysters. This indicated that other SCAR markers may be further developed and used for taxonomic identification and determination of interspecific hybridization of commercially cultured oysters in Thailand.

Although RAPD-PCR is sensitive to several reaction factors, it is quite useful, when used with caution, for several applications in marine organisms. We have employed this method to study population differentiation of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand (Tassanakajon et al., 1997), identify a region-specific marker of *P. monodon* originating from the west of Malaysian Peninsula (Tassanakajon et al., 1998), and generate a molecular diagnostic key of 3 mud crab species (*Scylla serrata*, *S. oceanica*, and *S. transquebarica*) in eastern Thailand (Klinbunga et al., 2000).

In the present study, we demonstrated the successful use of RAPD analysis to generate species-specific markers of 3 economically important oyster species in Thailand. When combined with cloning and sequencing techniques, more reproducible genetic markers were generated. Moreover, the RAPD primers OPA09, OPB01, and OPB08 used in this study yielded highly polymorphic patterns in *S. cucullata*, *S. forskali*, and *S. mytiloides*; as a result, they have potential for use in stock identification and population differentiation analysis of oysters in Thailand.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mr. Somchai Bussarawit, Mr. Piyapong Chotipuntu, Mr. Teerapong Duangdee, and several others who cannot be named here for helping us during collection of specimens in peninsular Thailand. Our sincere appreciation goes to National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), and Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for providing the necessary facilities for our experiments. This work is financially supported by Thailand Research Fund (TRF) project RDG4120018.

REFERENCES

- Awise, J.C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. London: Chapman and Hall.
- Banks, M.A., Hedgecock, D., and Waters, C. (1993). Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol Mar Biol Biotechnol* 2:129–136.
- Bell, J.L., and Grassle, J.P. (1998). A DNA probe for identification of larvae of commercial surfclam (*Spisula solidissima*). *Mol Mar Biol Biotechnol* 7:127–137.

- Boom, J.D.G., Boulding, E.G., and Beckenbach, A.T. (1994). Mitochondrial DNA variation in introduced populations of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in British Columbia. *Can J Fish Aquat Sci* 51:1608–1614.
- Brown, T.A. (1991). *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press.
- Buroker, N.E., Hershberger, W.K., and Chew, K.K. (1979). Population genetics of the family Ostreidae, II: interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Mar Biol* 54:171–184.
- Charoensit, P. (1995). Hybridization in commercial oysters. M.Sc. thesis, Chulalongkorn University, Thailand.
- Department of Fisheries. (1993). Fisheries Statistics of Thailand 1991. Bangkok Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperative.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127.
- Foltz, D.W., and Hu, Y-P. (1996). Genetics of scnDNA polymorphisms in juvenile oysters (*Crassostrea virginica*), part II: heterozygosity deficiency and gametic disequilibrium in natural population samples. *Mol Mar Biol Biotechnol* 5:130–137.
- Fritsch, P., Hanson, M.A., Spore, C.D., Pack, P.E., and Rieseberg, L.H. (1993). Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Mol Biol Reprod* 11:10–20.
- Garcia, D.K., Faggart, M.A., Rhoades, L., Alcivar-Warren, A.A., Wyban, J.A., Carr, W.H., Sweeney, J.N., and Ebert, K.M. (1994). Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:270–280.
- Hadrys, H., Balick, M., and Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol* 1:55–63.
- Hedgecock, D. (1995). The cupped oyster and the Pacific oyster. In: *Conservation of Fish and Shellfish Resources: Managing Diversity*, Thorpe, J., Gall, G., Lannan, J., and Nash, C. (eds.) London: Academic Press, 115–137.
- Hedgecock, D., and Okazaki, N.B. (1984). Genetic diversity within and between populations of American oysters (*Crassostrea*). *Malacologia* 25:535–549.
- Heipel, D.A., Bishop, J.D.D., Brand, A.R., and Thorpe, J.P. (1998). Population genetic differentiation of the great scallop *Pecten maximus* in western Britain investigated by randomly amplified polymorphic DNA. *Mar Ecol Prog Ser* 162:163–171.
- Hoelzel, A.R., and Green, A. (1992). Population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. In: *Molecular Genetic Analysis of Populations*, Hoelzel, A.R. (ed.). Oxford: Oxford University Press, 159–187.
- Hu, Y-P., and Foltz, D. (1996). Genetics of scnDNA polymorphisms in juvenile oysters (*Crassostrea virginica*), part I: characterizing the inheritance of polymorphisms in controlled crosses. *Mol Mar Biol Biotechnol* 5:123–129.
- Huang, B., and Hanna, P.J. (1998). Identification of three polymorphic microsatellite loci in blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach), and detection in other abalone species. *J Shellfish Res* 17:795–799.
- Jacobsen, R., Forbes, V.E., and Skovgaard, O. (1996). Genetic population structure of the prosobranch snail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) in Denmark using PCR-RAPD fingerprints. *Proc R Soc Lond B* 263:1065–1070.
- Jarayabhand, P., and Thavornyutikarn, M. (1995). Realized heritability estimation on growth rate of oyster, *Saccostrea cucullata* Born, 1778. *Aquaculture* 138:111–118.
- Jarayabhand, P., Rungsupha, S., Chaitanavisuti, N., and Kanjanamawin, P. (1985). A preliminary study on the induced spawning of oyster (*Crassostrea* sp.) in Thailand. In: *Proceedings of Living Aquatic Resources*. Bangkok: Chulalongkorn University, 272–285.
- Jarayabhand, P., Jareontia, S., Srisaard, C., and Menasveta, P. (1994). Experiments on larviculture of Thai oyster species. *Thai J Aquat Sci* 1:43–53.
- Klinbunga, S., Penman, D.J., and McAndrew, B.J. (1996). An improved protocol for total DNA isolation and visualisation of mtDNA RFLP (s) in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Thai J Aquat Sci* 3:36–41.
- Klinbunga, S., Boonyapakdee, A., and Pratoomchat, B. (2000). Genetic diversity and species diagnostic markers of mud crabs (Genus *Scylla*) in eastern Thailand determined by RAPD analysis. *Mar Biotechnol* 2:180–187.
- Linstrom, D.P. (1999). Molecular species identification of newly hatched Hawaiian amphidromous gobioid larvae. *Mar Biotechnol* 1:167–174.
- Littlewood, D.T.J. (1994). Molecular phylogenetics of cupped oysters based on partial 28S rDNA gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 3:221–239.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Okurama, B., Jones, C.S., and Noble, L.R. (1993). Randomly amplified polymorphic DNA analysis of clonal population structure

- and geographic variation in a freshwater bryozoan. *Proc R Soc Lond B* 253:147–154.
- Reeb, C.A., and Avise, J.C. (1990). A genetic discontinuity in a continuously distributed species: mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics* 124:397–406.
- Sahavachrin, S., Chindanond, A., Amornjaruchit, S., Nugranad, J., Silapagarn, K., Chawivarnskorn, V., Limsurat, S., Angell, C.L., McCoy, E.W., Mutaraasint, K., and Potaros, M. (1988). Hatcheries techniques for tropical bivalves molluscs. In: *Bivalve Mollusc Culture Research in Thailand*, McCoy, C.L., and Chongpepian, T. (eds.). ICLARM Technical Report 19. Department of Fisheries, Bangkok, Thailand, International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, and Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ), GmbH, Eschborn, Germany, 19–30.
- Small, M.P., and Chapman, R.W. (1997). Intraspecific variation in the 16S ribosomal gene of *Crassostrea virginica*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 6:189–196.
- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Rimphanitchayakit, V., Jarayabhand, P., and Boonsaeng, V. (1997). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Mol Mar Biol Biotechnol* 6:110–115.
- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., and Boonsaeng, V. (1998). Genetic structure in wild populations of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Mar Biotechnol* 6:249–254.
- Tyler-Walters, H., and Hawkins, A.R. (1995). The application of RAPD markers to the study of the bivalve mollusc *Lasaea rubra*. *J Mar Biol Assoc UK* 75:563–569.
- Vincent, J., Pestka, S.B., and Pestka, S. (1993). Cloning of polymerase chain reaction-generated DNA containing terminal restriction endonuclease recognition sites. *Methods Enzymol* 218:357–368.
- Visootviseth, P., Day, A., and Siwadune, T. (1998). Electrophoretic and morphometric analyses in species differentiation of small oysters. *Saccostrea* spp., in Thailand. *J Sci Soc Thailand* 24:24–36.
- Weising, K., Nybom, H., Wolf, K., and Meyer, W. (1995). *DNA Fingerprinting in Plant and Fungi*. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- Welsh, J., and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18:7213–7218.
- White, L.R., McPherson, B.A., and Stauffer, J.R. Jr. (1996). Molecular genetic identification tools for the unionoids of French Creek, Pennsylvania. *Malacologia* 38:181–202.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18:6531–6535.