

บทคัดย่อ

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป้าชื่อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ด้วยวิธี PCR-RFLP ของยีน 18S rDNA และ 16S rDNA ซึ่งจากการตัด 18S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I, *Taq* I และ *Hae* III และ 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III และ *Alu* I พบรูปแบบการตัด 12 และ 13 แบบตามลำดับ โดยพบ composite haplotypes ทั้งหมด 49 รูปแบบ และพบว่า composite haplotypes ของ 16S rDNA สามารถตรวจสอบชนิดของหอยเป้าชื่อ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้ยังสามารถใช้ composite haplotypes ของ 16S rDNA จำแนกหอยเป้าชื่อ *H. ovina* ที่มาจากทะเลอันดามัน (ABBB) และอ่าวไทย (AAAB และ AABB) ได้อีกด้วย

แผนภูมิ UPGMA ที่สร้างระหว่างระยะห่างทางพันธุกรรมของ composite haplotypes แสดงให้เห็นการแบ่งแยกของ gene pool หอยเป้าชื่อชนิดต่างๆ โดย *H. asinina* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *H. ovina* มากกว่า *H. varia* จากการวิเคราะห์ geographic heterogeneity และ F_{ST} พบโครงสร้างประชากรของหอยเป้าชื่อ *H. ovina* ที่มาจากทะเลอันดามันและอ่าวไทย ($P < 0.0001$) และพบความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *H. asinina* ที่มาจากฟิลิปปินส์และกลุ่มตัวอย่างอื่นๆ ที่ทำการศึกษา

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างของประชากรของ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ด้วยวิธี RAPD-PCR ซึ่งพบว่าหอยเป้าชื่อดังกล่าวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงในทั้ง 3 ชนิด โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมภายใน *H. varia* มีค่าสูงกว่า *H. ovina* และ *H. asinina* ตามลำดับ และไพรเมอร์ OPB01, UBC101, UBC195, UBC197 และ UBC271 แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *H. asinina* ธรรมชาติที่มาจากทะเลอันดามัน (HATRAW) และฝั่งอ่าวไทย (HACAME และ HASAME) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$)

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป้าชื่อ *H. asinina* ด้วยไมโครแซเทเทลไลต์นั้น ได้ทำการสร้างห้องสมุดยีน 3 แบบ ห้องสมุดแรกได้จากการตัดดีเอ็นเอของหอยเป้าชื่อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I ห้องสมุดยีนแบบที่สองได้จากการทำดีเอ็นเอของหอยให้ขาดด้วยการ vortex และ sonication ห้องสมุดยีนแบบที่สามได้จากการตัดดีเอ็นเอของหอยโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะร่วมกันสามชนิดคือ *Alu* I, *Rsa* I และ *Hinc* II เมื่อตรวจหาไมโครแซเทเทลไลต์ด้วยตัวตรวจสอบ (GT)₁₅ พบโคลนที่ให้ผลบวกเท่ากับ 0.2% 0.43% และ 1.46% ตามลำดับ โดยมีไมโครแซเทเทลไลต์ชนิด perfect, imperfect และ compound ในอัตราส่วนที่เท่ากัน จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไมโครแซเทเทลไลต์ที่ค้นพบจำนวน 33 ตำแหน่ง สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ได้ 10 คู่ เมื่อทดสอบความหลากหลายของไมโครแซเทเทลไลต์ทั้ง 10 ตำแหน่ง (Has1 - 10) จำนวนอัลลีลที่พบอยู่ในช่วง 3 - 26 อัลลีล ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่พบ (observed heterozygosity, H_O) และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่คาดคะเน (expected heterozygosity, H_E) มีค่าอยู่ในช่วง 0.24 - 0.93

ในการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรหอยเป้าฮื้อ *H. asinina* จำนวน 6 แหล่ง ซึ่งแบ่งเป็นจากธรรมชาติ 3 แหล่ง คือ หอยเป้าฮื้อจากทะเลอันดามันซึ่งเก็บตัวอย่างจากบริเวณเกาะตะลิง จังหวัดตรัง (HATRAW) หอยเป้าฮื้อจากอ่าวไทยซึ่งเก็บตัวอย่างจากบริเวณเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง (HASAME) และจากประเทศกัมพูชา (HACAME) และตัวอย่างหอยเป้าฮื้อจากโรงเพาะเลี้ยง 3 แห่ง ซึ่งมีพ่อแม่พันธุ์มาจากบริเวณเกาะเสม็ดจังหวัดระยอง (HASAMHE) จากประเทศกัมพูชา (HACAMHE) และจากประเทศฟิลิปปินส์ (HAPHIE) โดยใช้ไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาได้ 3 ตำแหน่ง คือ Has2, Has3 และ Has8 พบว่าค่าเฉลี่ยของ effective number of alleles (n_e) และเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o) ของตัวอย่างหอยเป้าฮื้อธรรมชาติจากอ่าวไทย (HASAME = 7.66, 0.78 และ 0.86 และ HACAME = 9.37, 0.62 และ 0.88) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงกว่าหอยเป้าฮื้อธรรมชาติจากทะเลอันดามัน (HATRAW = 6.04, 0.58 และ 0.62)

เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อตรวจสอบโครงสร้างประชากรของ *H. asinina* ไม่พบความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญของกลุ่มตัวอย่างหอยเป้าฮื้อภายในอ่าวไทย ($P > 0.0027$) แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างหอยเป้าฮื้อธรรมชาติจากอ่าวไทย (HASAME และ HACAME) และทะเลอันดามัน (HATRAW)

ทำการพัฒนาเครื่องหมายที่จำเพาะต่อชนิดของหอยเป้าฮื้อ โดยนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอของตัวแทนหอยเป้าฮื้อที่มี composite haplotype AAAA และ AAAB ซึ่งพบใน *H. asinina* AAAB, AABB และ ABAB ซึ่งพบใน *H. ovina* และ AABC, BABC, BABD, BABF และ BABG ซึ่งพบใน *H. varia* มาโคลน ลำดับนิวคลีโอไทด์ และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ ซึ่งสามารถพัฒนา species-specific PCR ใน *H. asinina* และ *H. varia* โดยมีความไวของการตรวจสอบประมาณ 25 pg และ 50 pg ของดีเอ็นเอต้นแบบจาก *H. asinina* และ *H. varia* ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์พันธุศาสตร์ประชากรของหอยเป้าฮื้อด้วยวิธี RAPD-PCR พบเครื่องหมาย RAPD ที่จำเพาะต่อชนิดจำนวน 15 เครื่องหมาย เครื่องหมาย RAPD ที่จำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างจำนวน 6 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย RAPD ขนาด 1650 bp ที่จำเพาะต่อ *H. ovina* ที่มาจากอ่าวไทย จึงทำการพัฒนาเครื่องหมาย SCARs โดยการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย RAPD ดังกล่าว ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 20 คู่ และทำการตรวจสอบความจำเพาะเบื้องต้น ($N = 12$ และ 4 สำหรับตรวจสอบ target species และ non-target species ตามลำดับ)

ซึ่งพบว่าไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ (CUHA1, CUHA2, CUHA4, CUHA11, CUHA12, CUHA13 และ CUHA14) แสดงความจำเพาะต่อ *H. asinina* ในขณะที่ CUHO3 และ CUHV1 แสดงความจำเพาะต่อ *H. ovina* และ *H. varia* ตามลำดับ จึงตรวจสอบความจำเพาะของ CUHA2, CUHA12, CUHA13, CUHO3 และ CUHV1 กับตัวอย่างจำนวนมาก ($N = 111, 73$ และ 32 สำหรับ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ตามลำดับ) ซึ่งผลการศึกษาพบความจำเพาะของเครื่องหมาย SCARs ที่พัฒนาขึ้นใน *H. asinina*

(CUHA2, CUHA12 และ CUHA13) และ *H. varia* (CUHV1) ซึ่งมีความไวของการตรวจสอบที่ดี (20 pg ของดีเอ็นเอต้นแบบจาก *H. asinina* และ *H. varia* สำหรับ CUHA12 และ CUHV1 และ 100 pg สำหรับCUHA2) เครื่องหมายSCARs ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์แบบต่างๆของ *H. asinina* ได้อย่างถูกต้อง

ABSTRACT

Genetic diversity of abalone in Thailand; *Haliotis asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* were analysed by PCR-RFLP of 18S and 16S rDNAs. Restriction analysis of 18S (nuclear) rDNA with *Alu* I, *Taq* I and *Hae* III and 16S (mitochondrial) rDNA with *Bam* HI, *Eco* RI, *Hae* III and *Alu* I gave 12 and 13 digestion patterns, respectively. A total of 49 composite haplotype were found. Composite haplotype of 16S rDNA could differentiate *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* unambiguously. In addition, differentiation of *H. ovina* from the Andaman Sea (ABBB) and the Gulf of Thailand (AAAB and AAB) could also be carried out by PCR-RFLP of 16S rDNA.

A UPGMA dendrogram constructed from genetic distance between pairs of composite haplotypes revealed reproductively isolated gene pools of these abalone and indicated that *H. asinina* and *H. ovina* are genetically closer than *H. varia*. Disregarding *H. varia* due to small sample sizes, geographic heterogeneity analysis and F_{ST} estimate indicated clear genetic differentiation between *H. ovina* originating from the Andaman Sea (west) and the Gulf of Thailand (east, $P < 0.0001$) whereas partial differentiation was observed between the Philippines and the remaining *H. asinina* samples ($P < 0.0021$).

Genetic diversity and population differentiation of the tropical abalone (*H. asinina*) were also analysed RAPD-PCR. Based on restriction analysis, a lack of population differentiation was observed between natural *H. asinina* samples in coastal Thai waters ($P > 0.0083$). Conversely, RAPD analysis using primers OPB11, UBC101, UBC195, UBC197 and UBC271 illustrated significant differentiation between natural *H. asinina* from the Andaman Sea (HATRAW) and the Gulf of Thailand (HASAME and HACAME) ($P < 0.0001$).

Three partial genomic libraries were constructed from *Alu* I-digested, vortexed/sonicated and mixed enzyme (*Alu* I, *Hinc* II and *Rsa* I) digested genomic DNA of *H. asinina* and yielded the percentage of microsatellite containing clones of 0.20%, 0.42% and 1.46%, respectively. Eleven clones each of perfect, imperfect and compound microsatellites were isolated. Ten locus-specific primer pairs (Has1 - Has10) were analyzed to evaluate their polymorphic levels.

The numbers of alleles per locus, observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity were 3 - 26 alleles, 0.27 - 0.85 and 0.24 - 0.93, respectively. Three microsatellite loci (Has2, Has3 and Has8) were further used for examination of genetic diversity and differentiation of natural *H. asinina* in coastal waters of Thailand. The effective number of alleles (n_e), H_o and H_e of HACAME (9.37, 0.62 and 0.88) and HASAME (7.66, 0.78 and 0.86) from the Gulf of Thailand were greater than those of HATRAW (6.04, 0.58 and 0.62).

from the Andaman Sea. Genetic heterogeneity and F_{ST} analyses indicated intraspecific population differentiation between natural *H. asinina* from the Gulf of Thailand (HASAME and HACAME) and the Andaman Sea (HATRAW) samples ($P < 0.0001$).

For development of species-specific markers, the amplified 16S rDNA of individuals representing composite haplotypes found in this study (AAAA, AAAE in *H. asinina*; AAAB, AABB and ABBA in *H. ovina* and AABC, BABC, BABD, BABF and BABG in *H. varia*) was cloned and sequenced. A neighbor-joining tree constructed from sequence divergence of 16S rDNA allocated those sequences according to species origins of abalone accurately. Species-specific PCR based on 16S rDNA polymorphism was successfully developed in *H. asinina* and *H. varia* but not in *H. ovina*. The sensitivity of detection was approximately 25 pg and 50 pg for DNA template of *H. asinina* and *H. varia*, respectively.

Species- and population-specific markers of abalone; *Haliotis asinina*, *H. ovina*, and *H. varia* in Thai waters were also identified based on RAPD analysis. Fifteen species-specific and six population-specific RAPD markers and a 1650 bp band (UBC195) restricted to *H. ovina* from the Gulf of Thailand (east) was found. All specific RAPD markers were cloned and sequenced.

Twenty pairs of primers were designed and specificity-tested ($N = 12$ and 4 for target and non-target species, respectively). Seven primer pairs (CUHA1, CUHA2, CUHA4, CUHA11, CUHA12, CUHA13 and CUHA14) were specifically amplified *H. asinina* DNA whereas a single pair of primers showed specificity with *H. ovina* (CUHO3) and *H. varia* (CUHV1), respectively.

Five primer pairs including CUHA2, CUHA12, CUHA13, CUHO3 and CUHV1 were further examined against 216 individuals of abalone ($N = 111$, 73 and 32, respectively). Results indicated species-specific nature of all except CUHO3 with the sensitivity of detection of 100 pg and 20 pg of the target DNA template for CUHA2 and CUHA12 and CUHV1, respectively. The species-origin of frozen, ethanol-preserved, dried and boiled *H. asinina* specimens could be successfully identified by CUHA2, CUHA12 and CUHA13.