

โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของหอยชักตีน  
(*Strombus canarium*) ตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน  
Population Genetic Structure of Wing Shell  
(*Strombus canarium*) along the Andaman Sea Coast

จุฑามาศ ศุภพันธ์<sup>1\*</sup> และ วีระเกียรติ ทรัพย์มี<sup>2</sup>

Juthamas Suppapan<sup>1\*</sup> and Verakiat Supmee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>หลักสูตรครุศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

<sup>2</sup>สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

<sup>1</sup> Master of Education in Science program, Faculty of Education, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University,

<sup>2</sup> Department of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya,

Received : 10 July 2016

Accepted : 23 September 2016

Published online : 10 October 2016

### บทคัดย่อ

หอยชักตีน (*Strombus canarium*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในภาคใต้ของประเทศไทย ปัจจุบันหอยชักตีนมีจำนวนลดลง เนื่องจากมีการจับเพื่อนำมาบริโภคจนเกินขีดความสามารถในการขยายพันธุ์ จำเป็นต้องมีการจัดการซึ่งต้องมีข้อมูลทางพันธุกรรมในการวางแผนจัดการ โดยการวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของหอยชักตีนตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน โดยวิเคราะห์จากความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียขนาด 497 คู่เบส จากยีน cytochrome oxidase subunit I เก็บตัวอย่างจาก 5 จังหวัด คือจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ จังหวัดภูเก็ต และจังหวัดพังงา จำนวนทั้งหมด 84 ตัว พบว่า มีแฮพลไทป์ 17 แฮพลไทป์ ค่า haplotype diversity และ nucleotide diversity มีค่า 0.762 และ 0.002 ตามลำดับ ค่าสถิติ Tajima's  $D$  และ  $F_u$   $F_S$  จากการทดสอบ neutrality test พบว่า ประชากรหอยชักตีนเคยมีการขยายขนาด ทดสอบ mismatch distribution พบว่า ยอมรับการเกิด sudden expansion model และน่าจะขยายขนาดมาประมาณ 100,000 ปี ในยุคไพลสโตซีน แผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ (MSN) พบว่า เป็นรูปแบบดาว (star topology) และไม่สามารถแบ่งประชากรตามสภาพภูมิศาสตร์ได้ ทดสอบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี AMOVA พบว่า ไม่มีโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเกิดขึ้น ทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างจังหวัดด้วยวิธี pairwise  $F_{ST}$  พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน การไม่เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรน่าจะเกิดจากประชากรหอยชักตีนมีความสามารถในการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมได้ดี ผลการศึกษานี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการจัดการหอยชักตีนในทะเลอันดามันได้

**คำสำคัญ:** ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ความหลากหลายทางพันธุกรรม ประวัติประชากร หอยชักตีน ทะเลอันดามัน

\*Corresponding author. E-mail : weedbeauty@yahoo.com

## Abstract

Wing shell (*Strombus canarium*) is an important commercial fishery product in Southern Thailand. Due to dramatic decreases in *S. canarium* populations, caused by overexploitation, an effective sustainable management strategy is needed. This plan needs to be based on detailed information of genetic features. In this study, population genetic structure and demographic history of the wing shell (*Strombus canarium*) living along the Andaman Sea coast was analyzed based on the variation of the nucleotide sequence (497 bp) of mitochondrial DNA in cytochrome oxidase subunit I. The mtDNA sequences of 84 individual collected from 5 sampling sites: Satun, Trang, Krabi, Phuket and Phang Nga province, were analyzed. In total, 17 haplotypes were identified. Estimated values of haplotype and nucleotide diversities were 0.762 and 0.002, respectively. Neutrality tests (Tajima's  $D$  and Fu's  $FS$  statistics) showed that Andaman populations of *S. canarium* had experienced expansion. In addition, the analysis of mismatch distribution accepted the sudden expansion model. The approximate time of the expansion was 100,000 years ago during the Pleistocene period. The topology of a minimum spanning network (MSN) was a star topology and did not indicate any distinct pattern of phylogeographic structure. An AMOVA analysis showed no genetic structure among populations. The analysis of pairwise differences ( $F_{ST}$ ) also showed no statistically significant difference between all possible regional combinations. Based on these results, an absence of a population structure of *S. canarium* on the Andaman Sea coast was possibly caused by a high level of gene flow. The results revealed by this study are necessary information contributing to efficient strategies to conserve this species in Andaman Sea.

**Keywords :** mitochondrial DNA, genetic diversity, demographic history, Wing shell, Andaman Sea

## บทนำ

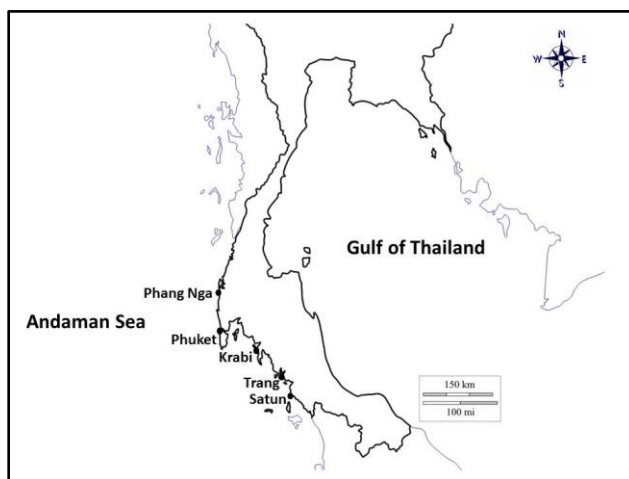
หอยชักตีน (*Strombus canarium*) เป็นหอยในกลุ่มหอยสังข์ที่อาศัยบริเวณพื้นที่ชายฝั่งบนโคลนและหญ้าทะเล (Cob *et al.*, 2009) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่นิยมนำมาบริโภคเป็นอาหารในหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Cob *et al.*, 2008) ในประเทศไทยพบแพร่กระจายมากบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน (Thongnunui *et al.*, 2010) ปัจจุบันหอยชักตีนมีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นจำนวนมาก ทำให้ขาดแคลนพันธุ์หอยที่จะเจริญเติบโตเป็นพ่อแม่พันธุ์ในธรรมชาติ จึงทำให้มีปริมาณลดลง (Soonsun *et al.*, 2007) ดังนั้นจึงมีการส่งเสริมเพื่อเพิ่มปริมาณ เช่น การเพาะพันธุ์เพื่อปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ รวมทั้งมีมาตรการอื่นมาควบคุม ซึ่งจำเป็นต้องใช้ความรู้หลายสาขามาร่วมกัน ความรู้ด้านโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเป็นข้อมูลสำคัญในการวางแผนจัดการประชากรหอยชักตีนในธรรมชาติ เนื่องจากตลอดแนวชายฝั่งทะเลอันดามันระยะทางยาวต่อเนื่อง 700 กิโลเมตร มีสภาพภูมิศาสตร์ต่างกันและมีพื้นที่แยกย่อยหลายพื้นที่ (Aungtonya, 2000) ซึ่งนับเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยชักตีน แต่พบว่าข้อมูลทางพันธุกรรมของหอยชักตีนที่อาศัยตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามันยังไม่เคยมีมาก่อน โดยการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์ทะเลตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน

ที่เคยมีรายงาน พบว่ามีเพียงการศึกษาในปูแสมก้ามขาว (*Episesarma versicolor*) (Supmee *et al.*, 2012) เท่านั้น ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของหอยชักตีนในทะเลอันดามัน โดยศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรีย เนื่องจากมีอัตราการกลายพันธุ์สูง เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากร โดยมีหลายรายงานการวิจัยที่มีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน cytochrome oxidase subunit I มาศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรในหอย เช่น หอย *Crepidatella dilatata* (Brante *et al.*, 2012), หอย *Bellamya aeruginosa* (Gu *et al.*, 2015) และหอย *Atrina pectinata* (Xue *et al.*, 2014) เป็นต้น นอกจากนี้ยีน cytochrome oxidase subunit I ยังมีการถ่ายทอดพันธุกรรมทางแม่ จึงสามารถใช้ประชากรจำนวนน้อยเพื่อศึกษาได้ (Boore, 1999) ผลการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพิจารณาการจัดการประชากรหอยชักตีนในทะเลอันดามันเพื่อคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรม

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างหอยชักตีนตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน ได้แก่ จังหวัดสตูล บริเวณอ่าวละงู, จังหวัดตรัง บริเวณอ่าวสิเกา, จังหวัดกระบี่ บริเวณอ่าวท่าเลน, จังหวัดภูเก็ต บริเวณท่าฉัตรไชย และจังหวัดพังงา บริเวณอ่าวทับละมุ รวมทั้งหมดจำนวน 84 ตัว (ภาพที่ 1, ตารางที่ 1) จากนั้นนำเนื้อหอยน้ำหนักประมาณ 30 มิลลิกรัม มาสกัด genomic DNA ด้วยชุดสกัด TIANamp Genomic DNA Kit (TIANGEN, TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD.) ตามวิธีและขั้นตอนที่แนบมากับชุดสกัดดีเอ็นเอ



ภาพที่ 1 แหล่งเก็บตัวอย่างหอยชักตีนตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน

### 2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ใช้ไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากยีน cytochrome oxidase subunit I คือ LCOI 5' -CGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G- 3' และ HCOI 5' -TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA- 3' (Latiolais *et al.*, 2006) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดพีซีอาร์ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Taq buffer 5

ไมโครลิตร, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 7.5 ไมโครลิตร, 2mMdNTPs mix 4 ไมโครลิตร, 10 $\mu$ M primer forward 2 ไมโครลิตร, 10 $\mu$ M primer reverse 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (ThermoSCIENTIFIC, USA) 0.5 ไมโครลิตร (2.5 unit), DNA template 5 ไมโครลิตร (50-100ng) และ ultrapure water 24 ไมโครลิตร โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ด้วยเครื่อง Major Cycler, CYCLER-25 (TAIWAN) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 1 เปอร์เซ็นต์ นำผลผลิตที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN, BIOTECH CORP.) ตามขั้นตอนและวิธีการที่แนบมากับชุดทำผลผลิตให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการ 1<sup>ST</sup> Base Laboratory, Malaysia

### 3. การจัดการข้อมูลและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

#### 3.1 การจัดการข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากหน่วยบริการจากฐานข้อมูล GenBank หมายเลข Accession: DQ525210 จากนั้นเชื่อมต่อขึ้นส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 5' และ 3' ของแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม CAP3 software (Huang & Madan, 1999) ทำการ alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W version 2.0.12 (Larkin *et al.*, 2007) แล้วตรวจสอบความถูกต้องของการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยสายตาอีกครั้ง

#### 3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยหาค่า nucleotide diversity ( $\pi$ ; Nei, 1987), haplotype diversity ( $h$ ; Nei, 1987) และค่า mean number of nucleotide differences ระหว่างแฮปโลไทป์ (haplotype) ทั้งหมดด้วยโปรแกรม DnaSP version 5.00 (Librado & Rozas, 2009)

### 4. การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

#### 4.1 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

วิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี Analysis of Molecular Variance (AMOVA) เพื่อเปรียบเทียบระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรโดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) โดยวิเคราะห์ค่า F-statistic ( $\Phi_{ST}$ ) ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations

#### 4.2 ระยะห่างทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรด้วยวิธี pairwise  $F_{ST}$  ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010)

### 5. การวิเคราะห์ประวัติประชากร

#### 5.1 ทดสอบ neutrality test

วิเคราะห์ค่า Tajima's  $D$  (Tajima, 1989) และ Fu's  $FS$  (Fu, 1997) เพื่อทดสอบการเบี่ยงเบนของประชากรจาก neutral evolution ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010)

## 5.2 ทดสอบ mismatch distribution

วิเคราะห์ mismatch distribution โดยใช้ค่าทดสอบ Harpending Raggedness index (Harpending, 1994) และ sum of squared deviations (SSD) เพื่อทดสอบ goodness-of-fit ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) ประเมินขนาดของประชากรด้วยพารามิเตอร์  $\theta_0$  และ  $\theta$ , เมื่อ  $\theta_0$  และ  $\theta$ , เท่ากับ  $2N\mu$  เมื่อ  $N$  คือค่า effective female population size

## 5.3 สร้างแผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ (Minimum Spanning Network, MSN)

สร้างแผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์โดยใช้ค่า mean number of pairwise differences ระหว่างแฮพลไทป์ ด้วยโปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations

## 5.4 ทหาระยะเวลาในการขยายขนาดประชากร

หาเวลาในการขยายขนาดประชากร ( $t$ ) โดยใช้สูตร  $t = \tau/2\mu$  เมื่อ  $\tau$  คือ expansion time และ  $2\mu = \mu \times \text{generation time} \times \text{number of bases}$  เมื่อค่า  $\mu$  คือค่า mutation rate และมีค่าเท่ากับ 2.4 % per million year (Chiu *et al.*, 2013)

## ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

## 1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างทั้งหมด 84 ตัว วิเคราะห์จากลำดับเบส 497 คู่เบส มีตำแหน่ง polymorphic sites 17 ตำแหน่ง มีแฮพลไทป์ทั้งหมด 17 แฮพลไทป์ ประกอบด้วยแฮพลไทป์ที่เป็น shared haplotype จำนวน 8 แฮพลไทป์ แบ่งเป็นแฮพลไทป์ที่ shared haplotype ระหว่างประชากร 5 แฮพลไทป์ และ shared haplotype ภายในประชากร 3 แฮพลไทป์ โดยแฮพลไทป์ SC03 และ SC05 เป็นแฮพลไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกจังหวัด (ตารางที่ 2) ทุกจังหวัดมี rare haplotype และมีจำนวนรวมทั้งหมด 9 แฮพลไทป์ โดยจังหวัดพังงามี rare haplotype มากที่สุด 4 แฮพลไทป์ สำหรับค่า haplotype diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.525 - 0.838 ส่วนค่า nucleotide diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.001 - 0.002 โดยค่า haplotype diversity ของประชากรรวมทั้งหมดมีค่า  $0.762 \pm 0.040$  และค่า nucleotide diversity ของประชากรรวมทั้งหมดมีค่า  $0.002 \pm 0.000$  ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมได้แก่ จำนวนแฮพลไทป์, จำนวน polymorphic sites, haplotype diversity ( $h$ ) และ nucleotide diversity ( $\pi$ ) ของแต่ละจังหวัดแสดงในตารางที่ 1

## ตารางที่ 1 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน cytochrome oxidase subunit I

ในไมโทคอนเดรียของหอยชักตีนที่อาศัยตามตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน

| Locality  | No. | No. haplotypes | No. polymorphic sites | Haplotype diversity ( $h$ ) (mean $\pm$ SD) | Nucleotide diversity ( $\pi$ ) (mean $\pm$ SD) |
|-----------|-----|----------------|-----------------------|---|--|
| Satun     | 16  | 5              | 4                     | $0.755 \pm 0.063$                           | $0.002 \pm 0.000$                              |
| Trang     | 16  | 4              | 3                     | $0.525 \pm 0.137$                           | $0.001 \pm 0.000$                              |
| Krabi     | 18  | 6              | 5                     | $0.562 \pm 0.134$                           | $0.001 \pm 0.000$                              |
| Phuket    | 17  | 6              | 6                     | $0.787 \pm 0.075$                           | $0.002 \pm 0.000$                              |
| Phang Nga | 17  | 8              | 7                     | $0.838 \pm 0.067$                           | $0.002 \pm 0.000$                              |
| Total     | 84  | 17             | 17                    | $0.762 \pm 0.040$                           | $0.002 \pm 0.000$                              |

ตารางที่ 2 การกระจายของรูปแบบไมโทคอนเดรียแฮปโลไทป์ในหอยชักตีนจากแต่ละจังหวัดตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน

| Haplotype    | Satun     | Trang     | Krabi     | Phuket    | Phang Nga | Total     |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| SC01         | 4         | -         | 1         | -         | -         | 5         |
| SC02         | 1         | -         | -         | -         | -         | 1         |
| SC03         | 6         | 11        | 12        | 4         | 4         | 37        |
| SC04         | 1         | -         | 2         | 7         | -         | 10        |
| SC05         | 4         | 2         | 1         | 2         | 6         | 15        |
| SC06         | -         | 2         | -         | -         | -         | 2         |
| SC07         | -         | 1         | -         | -         | -         | 1         |
| SC08         | -         | -         | -         | 2         | -         | 2         |
| SC09         | -         | -         | -         | 1         | -         | 1         |
| SC10         | -         | -         | -         | 1         | -         | 1         |
| SC11         | -         | -         | -         | -         | 2         | 2         |
| SC12         | -         | -         | -         | -         | 1         | 1         |
| SC13         | -         | -         | 1         | -         | 1         | 2         |
| SC14         | -         | -         | -         | -         | 1         | 1         |
| SC15         | -         | -         | -         | -         | 1         | 1         |
| SC16         | -         | -         | -         | -         | 1         | 1         |
| SC17         | -         | -         | 1         | -         | -         | 1         |
| <b>Total</b> | <b>16</b> | <b>16</b> | <b>18</b> | <b>17</b> | <b>17</b> | <b>84</b> |

## 2. โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร พบว่าประชากรหอยชักตีนในทะเลอันดามันไม่มีโครงสร้างประชากรย่อย โดยมีค่า  $\Phi_{ST} = 0.089$  ( $p = 0.100$ ) ประชากรมีความแปรปรวนภายในกลุ่ม 91.04 เปอร์เซ็นต์ และความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากร 8.96 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ผลการวิเคราะห์ค่า pairwise  $F_{ST}$  พบว่าประชากรแต่ละจังหวัดไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 3** ผลการวิเคราะห์โครงสร้างประชากร และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มหอยชักตีน  
ทดสอบด้วยวิธี AMOVA

| Source of variation | df | Sum of squares | Variance components | Percentage of variation | $\Phi_{ST}$ (p-value)            |
|---------------------|----|----------------|---------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Among populations   | 4  | 5.228          | 0.048Va             | 8.96                    | $\Phi_{ST}=0.089$<br>(p = 0.100) |
| Within populations  | 79 | 38.927         | 0.492Vb             | 91.04                   |                                  |
| Total               | 83 | 44.155         | 0.541               |                         |                                  |

**ตารางที่ 4** ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มของหอยชักตีน จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 497 คู่เบส  
ของไมโทคอนเดรียจากยีน cytochrome oxidase subunit I ทดสอบด้วยวิธี pairwise  $F_{ST}$

|          | Satun            | Trang            | Krabi            | Phuket           | Phang Nga |
|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------|
| Satun    | -                |                  |                  |                  |           |
| Trang    | 0.043<br>(0.094) | -                |                  |                  |           |
| Krabi    | 0.044<br>(0.080) | 0.014<br>(0.094) | -                |                  |           |
| Phuket   | 0.061<br>(0.110) | 0.071<br>(0.061) | 0.069<br>(0.238) | -                |           |
| PhangNga | 0.117<br>(0.118) | 0.138<br>(0.272) | 0.150<br>(0.373) | 0.106<br>(0.067) | -         |

หมายเหตุ : ค่าในวงเล็บคือค่า  $F_{ST}$  p-value

### 3. ประวัติประชากร

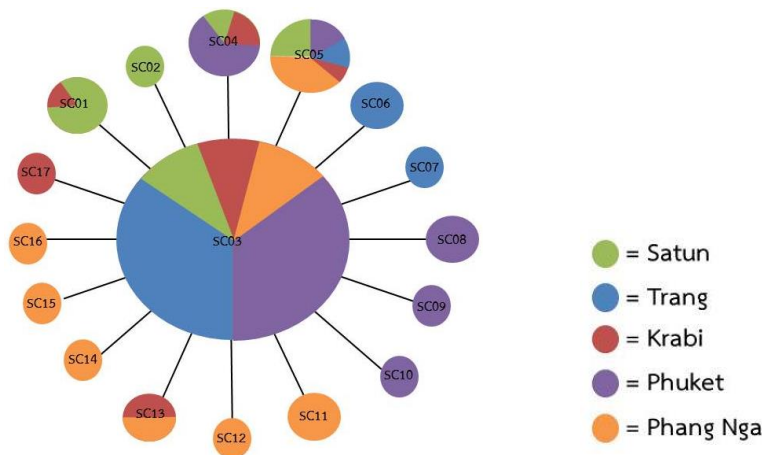
จากการวิเคราะห์ประวัติประชากร พบว่าประชากรเบี่ยงเบนไปจาก neutral population โดยมีค่า  $D$  statistic เท่ากับ -1.986 ( $p=0.002$ ) ส่วนค่า  $FS$  statistic มีค่า -14.122 ( $p=0.000$ ) และทั้งสองค่าสถิติมีค่าติดลบในทุกจังหวัด (ตารางที่ 5) การทดสอบ mismatch distribution พบว่ามีการกระจายตัวแบบ unimodal โดยมีค่า Raggedness index เท่ากับ 0.165 ( $p=0.312$ ) และยอมรับการเกิด sudden expansion model โดยมีค่า  $SSD$  เท่ากับ 0.024 ( $p=0.205$ ) ค่าพารามิเตอร์  $\theta_1$  ของประชากรรวม มีค่า 99,999.000 และ  $\theta_0$  ของประชากรรวม มีค่า 0.005 และพบว่าทุกจังหวัดมีค่า  $\theta_1$  มากกว่า  $\theta_0$  (ตารางที่ 5) ระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรพบว่าการขยายขนาดมา 103,454 ปีที่ผ่านมา แผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ พบว่าไม่แบ่งกลุ่มประชากรตามสภาพภูมิศาสตร์ และมีรูปร่างแบบดาว (star topology) โดยมีแฮพลไทป์ SC03 เป็น dominant haplotype เชื่อมต่อกับแฮพลไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกจังหวัดด้วยการกลายพันธุ์ 1 ครั้ง (ภาพที่ 2)

**ตารางที่ 5** ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากรและการประมาณช่วงเวลาที่เกิดการขยายขนาดประชากรของหอยชักตีน ที่อาศัยตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามันโดยอาศัยข้อมูลไมโทคอนเดรียจากยีน cytochrome oxidase subunit I

| Locality     | Tajima's $D$              | Fu' s $FS$                 | $\tau^a$     | $\theta_0^b$ | $\theta_1^c$      | $SSD^d$                  | Raggedness               | Expansion time (year ago) |
|--------------|---------------------------|----------------------------|--------------|--------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Satun        | -0.403<br>(0.382)         | -1.302<br>(0.115)          | 1.621        | 0.000        | 99,999.000        | 0.025<br>(0.119)         | 0.201<br>(0.078)         | 135,898                   |
| Trang        | -1.001<br>(0.217)         | -1.450<br>(0.057)          | 1.514        | 0.000        | 99,999.000        | 0.016<br>(0.244)         | 0.158<br>(0.345)         | 126,928                   |
| Krabi        | -1.742<br>(0.020)         | -3.850<br>(0.077)          | 1.335        | 0.000        | 99,999.000        | 0.015<br>(0.353)         | 0.153<br>(0.395)         | 111,921                   |
| Phuket       | -0.880<br>(0.111)         | -1.750<br>(0.114)          | 0.845        | 0.000        | 99,999.000        | 0.010<br>(0.075)         | 0.093<br>(0.064)         | 70,841                    |
| Phang Nga    | -1.246<br>(0.212)         | -4.295<br>(0.001)          | 0.711        | 0.000        | 99,999.000        | 0.035<br>(0.202)         | 0.181<br>(0.279)         | 59,607                    |
| <b>Total</b> | <b>-1.986<br/>(0.002)</b> | <b>-14.122<br/>(0.000)</b> | <b>1.234</b> | <b>0.005</b> | <b>99,999.000</b> | <b>0.024<br/>(0.205)</b> | <b>0.165<br/>(0.312)</b> | <b>103,454</b>            |

ค่าในวงเล็บคือค่า  $p$ -value; <sup>a</sup>time in number of generation; <sup>b</sup>จำนวนประชากรก่อนการขยายขนาด( $\theta_0=2N_0\mu$ );

<sup>c</sup>จำนวนประชากรหลังการขยายขนาด ( $\theta_1=2N_1\mu$ ); <sup>d</sup> sum of squared deviations



**ภาพที่ 2** ความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ของหอยชักตีนที่สุ่มขึ้นมาศึกษาตามชายฝั่งทะเลอันดามัน สร้างขึ้นโดยใช้ข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์ 497 คู่เบส ของไมโทคอนเดรียจากยีน cytochrome oxidase subunit I : ขนาดวงกลมแสดงตามสัดส่วนของจำนวนสมาชิกในแต่ละแฮพลไทป์, เส้นที่เชื่อมระหว่างแฮพลไทป์ คือการเกิดการกลายพันธุ์จำนวนหนึ่งครั้ง



## วิจารณ์ผลการวิจัย

### 1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ผลการศึกษาพบว่าประชากรหอยชักตีนในทะเลอันดามันมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในประชากรถึง 91.04 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เมื่อพิจารณาจากค่า haplotype diversity พบว่าจังหวัดพังงามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด แต่จังหวัดตรังและจังหวัดกระบี่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ซึ่งควรมีมาตรการในการจัดการเพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม จากรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่า ทุกจังหวัดมีค่า haplotype diversity สูงกว่าค่า nucleotide diversity ซึ่งรูปแบบดังกล่าวพบได้ในประชากรที่มีการขยายขนาดโดยเกิดจากประชากรมีการสะสมการกลายพันธุ์รูปแบบใหม่ในระหว่างที่มีการขยายขนาดอย่างรวดเร็ว (Watterson, 1984) และสามารถพบรูปแบบความหลากหลายดังกล่าวได้ในสัตว์ทะเลหลายชนิด เช่น ปูม้า (*Portunus trituberculatus*) (Xu et al., 2009), ปลาตะกรับ (*Scatophagus argus*) (Supmee, 2015) และปลากะบอก (*Liza subviridis*) (Suppapan, 2015) เป็นต้น การศึกษาดังนี้พบว่ามีการ share haplotype ระหว่างจังหวัดจำนวน 5 แฮพลไทป์ ในขณะที่อีก 12 แฮพลไทป์ พบเฉพาะในแต่ละจังหวัด ซึ่งเรียกว่า private allele โดยสามารถใช้ private allele เป็นดัชนีในการระบุกลุ่มทางพันธุกรรมของแต่ละจังหวัดได้ (Xu et al., 2009)

### 2. โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการตรวจสอบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี AMOVA พบว่าไม่เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร และไม่มี ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร เมื่อทดสอบด้วยวิธี pairwise  $F_{ST}$  โดยปัจจัยที่ทำให้ไม่เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์ทะเลส่วนใหญ่ เกิดจากความสามารถในการแพร่กระจายของตัวอ่อนได้ในระยะทางไกล (Kyle & Boulding, 2000) มีรายงานว่าตัวอ่อนหอยสังข์ Queen conch (*S. gigas*) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับหอยชักตีนสามารถเคลื่อนที่ตามกระแสน้ำได้ไกลกว่า 900 กิโลเมตรโดยใช้เวลาสามสัปดาห์ (Davis et al., 1993) ในขณะที่ตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามันระยะทางยาวประมาณ 700 กิโลเมตร ไม่มีสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์และมีกระแสน้ำไหลหมุนเวียนตลอดแนวชายฝั่งตามทิศทางของลมมรสุมตลอดทั้งปี (Sinsakul, 2000) อีกทั้งระยะตัวอ่อนของหอยชักตีนใช้เวลาประมาณ 20 วัน (Cob et al., 2009) จึงน่าจะเป็นปัจจัยที่ทำให้การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (gene flow) ระหว่างประชากรเกิดขึ้นได้ง่าย อีกสาเหตุที่ทำให้ไม่เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรในทะเลอันดามัน น่าจะเกิดจากประชากรหอยชักตีนเคยมีการขยายขนาด ทำให้มีการแพร่กระจายของประชากรในพื้นที่กว้าง ซึ่งอาจเป็นอีกปัจจัยที่เสริมให้เกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมได้ง่ายเช่นกัน ผลการศึกษาดังนี้ยังสอดคล้องกับการไม่เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปูแสมก้ามขาวในทะเลอันดามัน (Supmee et al., 2012) อีกด้วย จากการที่ประชากรหอยชักตีนในทะเลอันดามันไม่เกิดโครงสร้างประชากรย่อย ดังนั้นแนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมอาจทำได้โดยการใช้พ่อแม่พันธุ์จากในหลายพื้นที่ของฝั่งทะเลอันดามันปล่อยลงสู่แหล่งธรรมชาติในทะเลอันดามันด้วยกันเพื่อเป็นการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม

### 3. ประวัติประชากร

จากการศึกษาประวัติประชากรพบว่าประชากรหอยชักตีนในทะเลอันดามันเคยมีการขยายขนาดประชากรสอดคล้องกับผลการศึกษา 4 วิธี ได้แก่ 1) การทดสอบ Tajima's  $D$  test และ Fu's  $FS$  test พบว่า มีค่าติดลบซึ่งแสดงว่าประชากรเบี่ยงเบนไปจาก neutral population สำหรับค่า  $D$  statistic ที่มีค่าติดลบ บ่งบอกว่าประชากรกำลังถูกคัดเลือกโดย

การคัดการกลายพันธุ์ที่ไม่เหมาะสมทิ้งไป (purifying selection) หรืออาจมีการขยายขนาดประชากรเกิดขึ้น (Yang, 2006) อีกทั้งค่า  $FS$  statistic ซึ่งเป็นค่าสถิติที่ใช้ทดสอบการขยายขนาดประชากรสำหรับเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เป็น นอนรีคอมบิเนชัน (Ramirez-Soriano *et al.*, 2008) พบว่ามีค่าติดลบด้วยเช่นกัน จึงเป็นการยืนยันว่าประชากรหอยชักตีน เคยมีการขยายขนาด 2) การทดสอบ mismatch distribution พบว่ามีรูปแบบการกระจายตัวแบบ unimodal และยอมรับการ เกิด sudden expansion model จึงเป็นการยืนยันว่าเคยมีการขยายขนาดประชากรของหอยชักตีนในทะเลอันดามัน 3) แผนผัง ความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์เป็นรูปแบบดาว ซึ่งพบได้ในประชากรที่เคยมีการขยายขนาดประชากร (Slatkin & Hudson, 1991) อีกทั้งไม่สามารถแบ่งกลุ่มประชากรตามจังหวัดได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการไม่เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร 4) ค่าพารามิเตอร์  $\theta_1$  มีค่ามากกว่า  $\theta_0$  ในทุกประชากรแสดงว่ามีประชากรเพศเมียที่มีความสามารถในการสืบพันธุ์เพิ่มขึ้น ซึ่งบ่งบอกว่าประชากรเคยมีการขยายขนาด โดยระยะเวลาในการขยายขนาดเริ่มมาเมื่อประมาณ 100,000 ปี ซึ่งอยู่ใน ยุคไพลสโตซีน (Pleistocene) และมีรายงานว่าในยุคนี้มีสัตว์ทะเลหลายชนิดเริ่มมีการขยายขนาดประชากรด้วยเช่นกัน (Planes *et al.*, 2001) เมื่อพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์  $\tau$  พบว่าทิศทางการขยายขนาดประชากรน่าจะเริ่มต้นจากทะเล อันดามันตอนล่างสู่ทะเลอันดามันตอนบน สอดคล้องกับทิศทางการไหลของกระแสน้ำในทะเลอันดามันที่เริ่มต้นจากช่องแคบ มะละกาสู่ทะเลอันดามันตอนบนในช่วงฤดูมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (Pongparadon *et al.*, 2015) ซึ่งตรงกับช่วงฤดูวางไข่ ของหอยชักตีนในทะเลอันดามัน (Thongnunui *et al.*, 2010)

### สรุปผลการวิจัย

การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของหอยชักตีนที่สุ่มขึ้นมาจากแต่ละจังหวัดตามแนว ชายฝั่งทะเลอันดามัน โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรียขนาด 497 คู่เบส พบว่าไม่มีโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของหอยชักตีนในทะเลอันดามัน และเมื่อวิเคราะห์ประวัติประชากร พบว่าประชากรหอยชักตีนในทะเลอันดามันเคยมีการขยายขนาดประชากรโดยมีทิศทางจากทะเลอันดามันตอนล่างสู่ทะเล อันดามันตอนบน ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนพิจารณาในการจัดการทรัพยากรหอยชักตีนในทะเล อันดามันได้ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมอื่น เช่น เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งมีอัตราการกลายพันธุ์สูง ในการพิจารณาเพื่อกำหนดแนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยชักตีน ในทะเลอันดามันควบคู่ไปด้วยกัน

### เอกสารอ้างอิง

- Aungtonya, C., Thaipal, S. & Tendal, O. (2000). A preliminary report on the Thai-Danish bioshelf surveys (1996-2000) of the west coast of Thailand, Andaman Sea. *Phuket Marine Biological Center Research Bulletin*, 63, 53-76.
- Boore, J. L. (1999). Survey and summary animal mitochondria genome. *Nucleic acids research*, 27(8), 1767-1780.
- Brante, A., Fernández, M. & Viard, F. (2012). Phylogeography and biogeography concordance in the marine Gastropod *Crepidatella dilatata* (Calyptreaeidae) along the southeastern Pacific coast. *Journal of Heredity*, 103 (5), 630-637.

- Chiu, Y., Bor, H., Tan, M., Lin, H. & Jean, C. (2013). Phylogeography and genetic differentiation among populations of the Moon Turban Snail *Lunella granulata* Gmelin, 1791 (Gastropoda: Turbinidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 9062-9079.
- Cob, Z. C., Arshad, A., Idris, M. H., Bujang, J. S. & Ghaffar, M. A. (2008). Sexual polymorphism in a population of *Strombus canarium* Linnaeus, 1758 (Mollusca: Gastropoda) at Merambong Shoal, Malaysia. *Zoological Studies*, 47(3), 318-325.
- Cob, Z. C., Arshad, A., Ghaffar, M. A., Bujang, J. S., & Muda, W. L. W. (2009). Development and growth of larvae of the Dog Conch, *Strombus canarium* (Mollusca: Gastropoda), in the laboratory. *Zoological Studies*, 48 (1), 1-11.
- Davis, M., Bolton, C.A. & Stoner, A.W. (1993). A comparison of larval development, growth, and shell morphology in three Caribbean *Strombus* species. *Veliger*, 36, 236-244.
- Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Fu, F. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 14, 915-925.
- Gu, Q H., Husemann, M., Ding, B., Luo, Z & Xiong, B. X. (2015). Population genetic structure of *Bellamya aeruginosa* (Mollusca: Gastropoda: Viviparidae) in China: weak divergence across large geographic distances. *Ecology and Evolution*, 5(21), 4906-4919.
- Harpending, R. C. (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66, 591-600.
- Huang, X. & Madan, A. (1999). CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9, 868-877.
- Kyle, C. J. & Boulding, E.G. (2000). Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina spp.*) with and without pelagic larval dispersal. *Marine Biology*, 137, 835-845.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. (2007). Sequence analysis Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics Applications Note*, 23 (21), 2947-2948.
- Latiolais, J.M., Taylor, M.S., Roy, K. & Hellberg, M.E. (2006). A molecular phylogenetic analysis of strombid gastropod morphological diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41, 436-444.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York : Columbia University Press.

- Planes, S., Doherty, P.J. & Bernardi, G. (2001). Strong genetic divergence among populations of a marine fish with limited dispersal, *Acanthochromis polyacanthus*, within the great barrier reef and the coral sea. *Evolution*, 55, 2263-2273.
- Pongparadon, S., Zuccarello, G. C., Phang, S., Kawai, H., Hanyudaand, T. & Prathep, A. (2015). Diversity of Halimeda (Chlorophyta) from the Thai-Malay Peninsula. *Phycologia*, 54 (4), 349-366.
- Ramirez-Soriano A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J. F. & Navarro, A. (2008). Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*, 179, 555-567.
- Sinsakul, S. (2000). Late Quaternary geology of the Lower Central Plain, Thailand. *Journal of Southeast Asian Earth Science*, 18, 415-426.
- Slatkin, M. & Hudson, R. R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129, 555-562.
- Supmee, V., Ngernsiri, L., Sriboonlert, A., Wonnapijit, P. & Sangthong, P. (2012) Population genetic analysis of Violet vinegar crab (*Episesarma versicolor*) along the Andaman sea coast of Thailand, *Zoological Studies*, 51(7), 1040-1050.
- Supmee, V. (2015). Population genetic structure and demographic history of Spotted scat (*Scatophagus argus*) in Southern of Thailand. *Phranakhon Rajabhat Research Journal*, 10 (2), 38-56. (in Thai)
- Soonsun, P., Detsathit, S., Chairut, P. & Jirawuttho, S. (2007). Studies on Spawning Stimulation, Embryonic and Larval Development of Dog Conch (*Strombus canarium* Linnaeus, 1758). *Technical Paper No. 8/2007*. Krabi Coastal Fisheries Research and Development Center, Coastal Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries. (in Thai)
- Suppapan, J. (2015). Population genetic structure of Greenback Mullet (*Liza subviridis*) in Gulf of Thailand : Implication for conservation. *Phranakhon Rajabhat Research Journal*, 10 (1), 118-130. (in Thai)
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
- Thongnunui, P., Tanyaros, S., Sudtongkong, C., Songrak, A., Sroytong, A., Janyong, S., Anantasuk, R., Intacharoen, P. & Kongprom. (2009). Status and Management Concept for Sustainability of Hard Clam, *Meretrix casta* and Wing Shell, *Strombus canarium* in the Coastal Area of Trang Province. *Annual Research Report (2008 - 2009)*. Faculty of Fishery Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya. (in Thai)
- Watterson, G. A. (1984). Allele frequencies after a bottleneck. *Theoretical Population Biology*, 26, 387-407.

- Xu, Q., Liu, R. & Liu, Y. (2009). Genetic population structure of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the East China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 371, 121-129.
- Xue D.X., Wang, H. Y., Zhang, T. & Liu, J.X. (2014). Population Genetic Structure and Demographic History of *Atrina pectinata* Based on Mitochondrial DNA and Microsatellite Markers. *PLoS ONE*. 9(4), e95436. doi:10.1371/journal.pone.0095436.
- Yang, Z. (2006). *Computational molecular evolution*. Oxford University Press, New York.