



รายงานการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน

โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของหอยชักตีน (*Strombus canarium*)

ในภาคใต้ของประเทศไทย

Population genetic structure of Dog Conch (*Strombus canarium*)

in Southern of Thailand

จุฑามาศ ศุภพันธ์
วีระเกียรติ ทรัพย์มี
แจ่มจันทร์ เพชรศิริ
อภิรักษ์ สงรักษ์

รายงานการวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2559

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของหอยชักตีน (*Strombus canarium*) ในภาคใต้ ของประเทศไทย

บทคัดย่อ

ศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของหอยชักตีน (*Strombus canarium*) ในภาคใต้ของประเทศไทย วิเคราะห์จากความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรีย จากยีน cytochrome oxidase subunit I (COI gene) เก็บตัวอย่างจาก 9 จังหวัด คือสตูล ตรัง กระบี่ ภูเก็ต พังงา ระนอง ปัตตานี สุราษฎร์ธานี และชุมพร จำนวนทั้งหมด 140 ตัว พบว่ามีจำนวนแฮพลไทป์ทั้งหมด 24 แฮพลไทป์ ประกอบไปด้วย shared haplotype 11 แฮพลไทป์ และ rare haplotype 13 แฮพลไทป์ การที่มีจำนวน rare haplotype จำนวนมาก แสดงว่าประชากรหอยชักตีนมีจำนวนเพศเมียที่มีความสามารถในการขยายพันธุ์เป็นจำนวนมาก ค่า haplotype diversity และ nucleotide diversity มีค่า 0.746 และ 0.003 ตามลำดับ จากการทดสอบ neutrality test พบว่าค่า Tajima's D และ Fu' F_s มีค่า -1.843 และ -15.815 และมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งเบี่ยงเบนไปจากสมมติฐาน (neutral population) แสดงว่าประชากรหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยเคยมีการขยายขนาดมาก่อน โดยจากการทดสอบ mismatch distribution พบว่าประชากรน่าจะมีการขยายขนาดมาประมาณ 98,979 ปีที่ผ่านมาในยุคไพลสโตซีน การทดสอบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี AMOVA พบว่าประชากรหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยมีโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเกิดขึ้นโดยแบ่งเป็นประชากรฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งทะเลอ่าวไทย ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการจัดการหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยได้

Population genetic structure of Dog Conch (*Strombus canarium*) in Southern of Thailand

Abstracts

Population genetic structure and demographic history of the Dog Conch (*Strombus canarium*) living along the southern of Thailand coast was analysed based on the variation of the nucleotide sequence of mitochondrial DNA in cytochrome oxidase subunit I (*COI* gene). The mtDNA sequences of 140 individual collecting from 9 sampling sites: Satun, Trang, Krabi, Phuket, Phang Nga, Ranong, Pattani, Surat Thani and Chumporn province, were analyzed. A total of 24 haplotypes, consisting of 11 shared and 13 rare haplotypes, were identified. An excess of rare haplotypes indicated that the female effective population size of *S. canarium* living in the Thailand coast is large. Estimated values of haplotype diversity and nucleotide diversity were 0.746 and 0.003, respectively. The results of neutrality tests, both Tajima's D and Fu's F_S statistics, yielded negative values (-1.843 and -15.815, respectively) and statistically significant deviation from the neutrality, indicating that the *S. canarium* living in the Thailand coast had experienced population expansion. Mismatch distribution analysis indicated that a possible expansion that would occur 98,979 years ago during Pleistocene glaciations period. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed the genetic structure of the *S. canarium* population living in southern Thailand into Andaman sea population and Gulf of Thailand population. This study are necessary information contributing to efficient strategies to conserve this species in southern Thailand.

(ค)

คำนิยม

การวิจัยในครั้งนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2559 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่อนุเคราะห์เครื่องมือในการศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุลตลอดโครงการ ขอขอบคุณชาวประมงทุกท่านที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างในทุกพื้นที่

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณหอยชักตีนทุกตัวที่เป็นตัวอย่างในการทำการศึกษานี้

จุฑามาศ ศุภพันธ์

วีระเกียรติ ทรัพย์มี

แจ่มจันทร์ เพชรศิริ

อภิรักษ์ สงรักษ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(ก)
Abstracts	(ข)
คำนิยม	(ค)
สารบัญ	(ง)
สารบัญตาราง	(ฉ)
สารบัญภาพ	(ช)
สารบัญภาคผนวก	(ฌ)
สารบัญภาพภาคผนวก	(ญ)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	2
2.1 ที่มาของโครงการวิจัย	2
2.2 ลักษณะทางอนุกรมวิธานของหอยชักตีน	2
2.3 การแพร่กระจายของหอยชักตีน	3
2.4 ชีววิทยาของหอยชักตีน	3
2.5 ความสำคัญทางเศรษฐกิจของหอยชักตีน	4
2.6 ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในสัตว์	5
2.7 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม	6
2.8 การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	7
2.9 การศึกษาประวัติประชากร	7
2.10 การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในสัตว์ทะเล	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	10
3.1. การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ	10
3.2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย	11
3.3. การจัดการข้อมูลและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม	11
3.4. การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	12
3.5. การวิเคราะห์ประวัติประชากร	12

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	14
4.1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม	14
4.2. โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	16
4.3. ประวัติประชากร	17
บทที่ 5 วิจัยผลการวิจัย	24
5.1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม	24
5.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	24
5.3 ประวัติประชากร	25
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	35
ภาพภาคผนวก	41

สารบัญตาราง

TABLE		หน้า
1	Collecting localities, code of collecting site, number of individuals per sampling site (<i>N</i>) and summary statistics of genetic variability for <i>S. canarium</i> along the Southern coast of Thailand	14
2	Haplotype distributions of <i>S. canarium</i> from 9 localities along the Southern coast of Thailand	15
3	Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) of <i>S. canarium</i>	16
4	Population pairwise F_{ST} values of <i>S. canarium</i>	17
5	Parameter indices of mismatch distribution analysis and neutrality test of <i>S. canarium</i>	18

สารบัญภาพ

FIGURE		หน้า
1	<i>Strombus canarium</i>	3
2	The mitochondrial DNA	5
3	The collecting localities for <i>S. canarium</i> along the Southern coast of Thailand	10
4	The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of <i>S. canarium</i> in Satun province	19
5	The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of <i>S. canarium</i> in Trang province	19
6	The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of <i>S. canarium</i> in Krabi province	20
7	The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of <i>S. canarium</i> in Phuket province	20
8	The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of <i>S. canarium</i> in Phang Nga province	21
9	The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of <i>S. canarium</i> in Ranong province	21
10	The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of <i>S. canarium</i> in Pattani province	22

สารบัญภาพ (ต่อ)

FIGURE		หน้า
11	The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of <i>S. canarium</i> in Surat Thani province	22
12	The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of <i>S. canarium</i> in Chumporn province	23
13	The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of <i>S. canarium</i> along the Southern coast of Thailand	23

สารบัญภาคผนวก

ภาคผนวกที่

1

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละแฮปโลไทป์ของหอยชักตีนที่สุ่มมา
จากแนวชายฝั่งทะเลภาคใต้

36

สารบัญญภาพภาคผนวก

ภาพภาคผนวกที่		หน้า
1	การจัดการตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ	42
2	การเพิ่มปริมาณและการตรวจสอบดีเอ็นเอ	43
3	การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์และการส่งตัวอย่างเพื่อหา ลำดับนิวคลีโอไทด์	44

บทที่ 1

บทนำ

หอยชักตีน (*Strombus canarium*) เป็นหอยในกลุ่มหอยสังข์ที่อาศัยบริเวณพื้นทรายปนโคลนและหญ้าทะเล (Cob *et al.*, 2009) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่นิยมนำมาบริโภคเป็นอาหารในหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Cob *et al.*, 2008) ในประเทศไทยพบแพร่กระจายมากบริเวณชายฝั่งในภาคใต้ของประเทศไทย (ประเสริฐ ทองหนู่น้อย และคณะ, 2553) ปัจจุบันหอยชักตีนมีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นจำนวนมาก ทำให้ขาดแคลนพันธุ์หอยที่จะเจริญเติบโตเป็นพ่อแม่พันธุ์ในธรรมชาติจึงทำให้มีปริมาณลดลง (พัชรี ชู่นั่น และคณะ, 2550) ดังนั้นจึงมีการส่งเสริมเพื่อเพิ่มปริมาณ เช่น การเพาะพันธุ์เพื่อปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ รวมทั้งมีมาตรการอื่นมาควบคุม ซึ่งจำเป็นต้องใช้ความรู้หลายสาขามาบูรณาการร่วมกัน ความรู้ด้านโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเป็นข้อมูลสำคัญในการวางแผนจัดการประชากรหอยชักตีนในธรรมชาติ เนื่องจากตลอดแนวชายฝั่งทะเลในภาคใต้ของประเทศไทยมีสภาพภูมิศาสตร์ต่างกันและมีพื้นที่แยกย่อยหลายพื้นที่อีกทั้งระหว่างทะเลฝั่งตะวันตกและตะวันออกถูกแบ่งกันด้วยคาบสมุทรหลาย (Aungtonya, 2000) ซึ่งนับเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยชักตีนแต่พบว่าข้อมูลทางพันธุกรรมของหอยชักตีนที่อาศัยตามแนวชายฝั่งทะเลในภาคใต้ยังไม่เคยมีมาก่อน ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยโดยศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรีย เนื่องจากมีอัตราการกลายพันธุ์สูง เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากร โดยมีหลายรายงานการวิจัยที่มีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน cytochrome oxidase subunit I มาศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรในหอย เช่น หอย *Crepidula dilatata* (Brante *et al.*, 2012), หอย *Bellamyia aeruginosa* (Gu *et al.*, 2015) และหอย *Atrina pectinata* (Xue *et al.*, 2014) เป็นต้น นอกจากนี้ยีน cytochrome oxidase subunit I ยังมีการถ่ายทอดพันธุกรรมทางแม่ จึงสามารถใช้ประชากรจำนวนน้อยเพื่อศึกษาได้ (Boore, 1999) ผลการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพิจารณาการจัดการประชากรหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยเพื่อคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรม

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของหอยชักตีน (*S. canarium*) ในภาคใต้ของประเทศไทย
2. เพื่อวิเคราะห์ประวัติประชากรของหอยชักตีน (*S. canarium*) ในภาคใต้ของประเทศไทย

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร

2.1 ที่มาของโครงการวิจัย

ปัจจุบันมีการตื่นตัวในการรักษาความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ในธรรมชาติเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากในอดีตที่ผ่านมามนุษย์มีการพัฒนาด้านต่างๆเป็นระยะเวลายาวนาน โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะให้ได้ผลลัพธ์สูงสุดแต่ให้ความสำคัญต่อผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยมาก จึงทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ยั่งยืน จะเห็นได้จากตัวอย่างของการประมงที่เริ่มจับสัตว์น้ำได้น้อยลงหรือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ประสบกับปัญหาต่างๆ มากมาย เช่น โรคระบาดหรือสัตว์น้ำที่เลี้ยงมีขนาดไม่โตเหมือนในอดีตที่ผ่านมา

จากความตอนหนึ่งในพระราชดำรัสของพระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช พระราชทานแก่สมาชิกกลุ่มเกษตรกรทั่วประเทศ ณ โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดาเมื่อวันที่ 14 พฤษภาคม 2523 ว่า

“...ทรัพยากรด้านประมงจะต้องจัดเป็นระเบียบ ความสำคัญไม่ได้อยู่ที่ว่า ปล่อยพันธุ์ปลาให้ดีหรือเลี้ยงปลาให้เติบโต ความสำคัญอยู่ที่ด้านบริหารการจับปลาเพื่อให้ประชาชนได้ประโยชน์จริงๆ...”

จากความในพระราชดำรัสดังกล่าวนำมาสู่แนวคิดในงานวิจัยเนื่องจากการบริหารจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำอย่างยั่งยืนนั้นนอกจากจะต้องมีการจัดการทางการประมงที่ดีแล้ว ข้อมูลที่จำเป็นมากในการจัดการก็คือข้อมูลทางพันธุกรรมของสัตว์น้ำซึ่งจำเป็นที่จะต้องใช้พิจารณาประกอบในการจัดการเพื่อให้เหมาะสมกับแหล่งพันธุกรรมของสัตว์น้ำแต่ละท้องถิ่นเพื่อให้คงซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้ แต่พบว่าข้อมูลทางพันธุกรรมของหอยชักตีนซึ่งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดหนึ่งในภาคใต้ของประเทศไทยได้แก่ ข้อมูลทางโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรและข้อมูลประวัติโครงสร้างประชากรยังไม่เคยมีมาก่อน ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าวิจัยมุ่งเน้นเพื่อศึกษาข้อมูลทางโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและข้อมูลประวัติโครงสร้างประชากรของหอยชักตีนในธรรมชาติ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียจากยีน cytochrome oxidase subunit I เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม ซึ่งนักเพาะพันธุ์และนักอนุรักษสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการจัดการประชากรหอยชักตีนในธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพและยังคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดการที่ยั่งยืนต่อไป

2.2 ลักษณะทางอนุกรมวิธานของหอยชักตีน

หอยชักตีนหรือมีชื่อเรียกอื่นว่าหอยสังข์กระโดดมีชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า Dog Conch หรือ Wing Shell และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Strombus canarium* มีการจำแนกทางอนุกรมวิธานดังนี้ (FIGURE 1)

Phylum	Mollusca
Class	Gastropoda
Superfamily	Stromboidea
Family	Strombidae
Genus	<i>Strombus</i>
Species	<i>Strombus canarium</i>

ลักษณะทั่วไปของหอยชักตีนจะมีเปลือกหนาเปลือกด้านนอกมีสีน้ำตาลอมขาวถึงเหลืองอ่อนหรือสีเทา ผิวด้านนอกเรียบ ก้นหอยเป็นเกลียว 6-7 เกลียว ส่วนของปากกว้างและมีปีกยื่นออกมา ขนาดทั่วไปยาว 5.6 – 6.5 เซนติเมตร ขนาดใหญ่สุดอาจยาวได้ถึง 10 เซนติเมตร

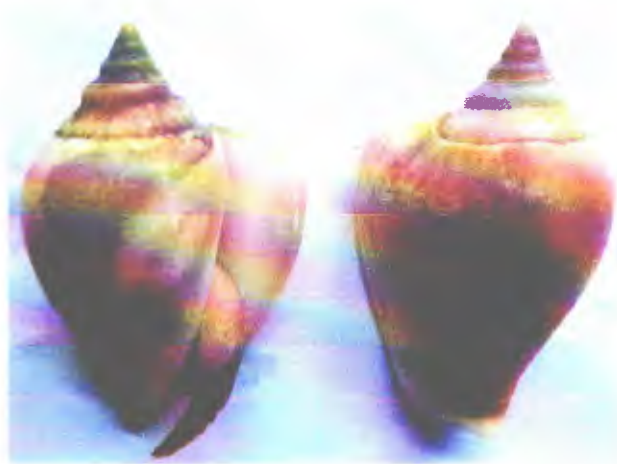


FIGURE 1. *Strombus canarium*

2.3 การแพร่กระจายของหอยชักตีน

หอยชักตีน *Strombus canarium* เป็นหอยฝาเดียวที่จัดอยู่ในครอบครัว Strombidae พบแพร่กระจายทั่วไปในทะเลเขต Indo-West Pacific ตั้งแต่ประเทศอินเดีย ศรีลังกาไปทางตะวันตกสุดถึงเมลานีเซีย เหนือสุดถึงประเทศญี่ปุ่นและใต้สุดถึงควีนสแลนด์และนิวคาลิโดเนีย ในธรรมชาติหอยชักตีนจะอาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งทะเลที่มีพื้นทะเลเป็นดินทรายปนโคลนระยะห่างจากฝั่งประมาณ 50-1,000 เมตร ในประเทศไทยพบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณที่มีหญ้าทะเลทั้งฝั่งอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน (ประเสริฐ ทองหนู้ย และคณะ, 2553)

2.4 ชีววิทยาของหอยชักตีน

การสืบพันธุ์เป็นแบบผสมภายในโดยมีเพศผู้และเพศเมียแยกกัน ไข่จะพัฒนาใช้ระยะเวลาประมาณ 4-5 วันจึงฟักออกเป็นตัวลูกหอย ซึ่งจะดำรงชีวิตว่ายน้ำกรองกินแพลงก์ตอนพืชเล็กๆเป็นอาหารอยู่ประมาณ 14-21 วัน จึงพัฒนาเข้าสู่ระยะลงพื้นเปลี่ยนการดำรงชีวิตเป็นขุดกินตะไคร่

สาหร่ายหรืออินทรีย์สารต่างๆถูกหอยที่ได้จากการเพาะพันธุ์จะเจริญเติบโตขนาดความยาวเปลือก 0.5-1 เซนติเมตร ภายในระยะเวลาประมาณ 1-2 เดือน เป็นหอยฝาเดียวที่ทนต่อสภาพแวดล้อมสูง เปลือกค่อนข้างหนาเป็นรูปกรวยยาวประกอบด้วยสารหินปูนหนาผิวเปลือกนอกส่วนใหญ่ไม่เรียบขอบปากเปลือกหนาและยื่นออกไปคล้ายปีก ขอบปากด้านหน้าเว้าเข้า สีลำตัวจะเป็นสีน้ำตาลอมดำ ปกติหอยชักตีนจะฝังตัวอยู่ใต้พื้นทรายปนโคลนออกหากินในเวลากลางวันโดยโผล่ขึ้นมาจากพื้นทะเล หอยชักตีนจะยื่นส่วนเท้าออกมาใช้สำหรับเคลื่อนที่มีหนวด 1 คู่และมีตาอยู่บนหนวด ตาของหอยชักตีนใช้สำหรับรับรู้เกี่ยวกับแสงสว่างเท่านั้น หอยชักตีนจะกินพวกเนื้อปลา และซากสัตว์ (ปลา หอย กุ้ง) ที่ตายแล้ว (detritus) โดยจะยื่นงวงยาว (proboscis) ออกมาจากช่องปากซึ่งอยู่ระหว่างคู่หนวด ไปดูดอาหารเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารเพื่อย่อยและดูดซึมไปใช้ต่อไปหอยชักตีนจะมีส่วนที่เป็นลักษณะเป็นท่อสำหรับการดูดน้ำทะเลเข้าสู่ภายในตัวเรียกว่า ไชพอนเพื่อให้น้ำทะเลผ่านเหงือกและรับออกซิเจนเข้าไปเผาผลาญอาหารให้เกิดพลังงานนำไปใช้ในกระบวนการต่างๆภายในร่างกาย (พัชร ชุ่นสั้น และคณะ, 2550)

2.5 ความสำคัญทางเศรษฐกิจของหอยชักตีน

หอยชักตีนเป็นหอยฝาเดียวที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเนื่องจากมีรสชาติอร่อย ราคาจำหน่ายโดยในร้านอาหารทางภาคใต้มีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 150 - 200 บาทหอยชักตีนส่วนใหญ่จะมีจำหน่ายมากในภาคใต้เนื่องจากมีความต้องการสูงโดยเฉพาะในแหล่งท่องเที่ยวซึ่งในบางฤดูกาลในท้องตลาดภาคใต้ก็ยังขาดแคลนหอยชักตีนอีกทั้งเปลือกของหอยชักตีนสามารถนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องประดับได้อีกมากมายซึ่งจะเห็นได้จากแหล่งท่องเที่ยวทางทะเลต่างๆที่มีการจำหน่ายอยู่ทั่วไป จากข้อมูลสถิติผลผลิตสัตว์ทะเลประเภทหอยและอื่นๆประจำปี 2541 โดยกองเศรษฐกิจการประมง กรมประมง ได้จัดให้หอยชักตีนจัดเป็นหอยเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย อีกทั้งหอยชักตีนยังจัดอยู่ในฐานข้อมูลของ FAO อีกด้วย ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาแนวโน้มการจับหอยชักตีนได้ลดลงเนื่องจากมีปริมาณความต้องการสูงขึ้นจึงทำให้มีปริมาณการจับเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วยอีกทั้งมีการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ทำลายล้างเช่น การลากหอยหรือการดำโดยใช้เครื่องมือจนเสี่ยงที่หอยชักตีนจะเกิดการสูญพันธุ์ จึงได้มีโครงการเพาะขยายพันธุ์และประสบความสำเร็จโดยศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการจัดการเหล่านี้ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับแหล่งพันธุกรรมของหอยชักตีนในแต่ละแหล่งที่อยู่ ดังนั้นหากมีการจัดการโดยทราบข้อมูลเกี่ยวกับแหล่งพันธุกรรมของหอยชักตีนจะทำให้การเพาะขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น

2.7 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นส่วนหนึ่งของความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ซึ่งประกอบด้วยความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ความหลากหลายของชนิด (species diversity) และความหลากหลายทางนิเวศวิทยา (ecological diversity) ความหลากหลายทางพันธุกรรมหมายถึงความผันแปรของยีนหรือหน่วยของพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรเกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนและการรวมตัวกันใหม่ (rearrangement) ของยีนหรือโครโมโซมในระหว่างการแบ่งตัวแบบไมโอซิสรวมทั้งการกลาย ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเกิดขึ้นเมื่อสมาชิกในประชากรมีการแยกตัวออกจากประชากรเดิมและเริ่มแยกกลุ่มผสมพันธุ์ ลดการถ่ายเทยีนระหว่างประชากรทำให้ความถี่ของแอลลีลเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งถ้ามีการถ่ายเทของยีนมากประชากรก็มีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ถ้ามีการถ่ายเทของยีนน้อย หรือไม่มีเลยประชากรก็จะแตกต่างกันมากจนในระยะเวลาหนึ่งประชากรที่แยกจากกันจะมีวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างประชากรและนำไปสู่การวิวัฒนาการเกิดเป็นชนิดพันธุ์ใหม่ (speciation)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อความอยู่รอดของชนิดพันธุ์ (species) โดยสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ จะไม่สามารถปรับตัวได้หากสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปก็จะนำไปสู่การสูญพันธุ์ นอกจากนี้ความหลากหลายที่ต่ำหากเป็นผลมาจากจำนวนพ่อแม่พันธุ์ทางพันธุกรรม (effective population size, N_e) น้อยจะนำไปสู่การผสมเลือดชิด ซึ่งมีผลให้ลักษณะที่จำเป็นต่อการอยู่รอดเสื่อมถอยลง การอนุรักษ์จึงจำเป็นต้องรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากรไว้ ซึ่งจะทำให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่อมีข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเป้าหมาย (Frankham *et al.*, 2002)

กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมภายในประชากร

ประชากรในธรรมชาติมักมีพฤติกรรมที่เบี่ยงเบนไปจากประชากรทางทฤษฎี เนื่องจากเกิดกระบวนการทางพันธุกรรมต่างๆ กระบวนการสำคัญที่เกี่ยวข้องมีดังนี้คือ

1) การขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) คือการที่ความถี่ของแอลลีลเปลี่ยนแปลงไปอย่างไม่มีทิศทาง เกิดจากการที่มีพันธุกรรมเพียงบางส่วนเท่านั้นที่ได้ถ่ายทอดไปสู่ชั่วอายุต่อไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง 2 ประการ คือ (1) พันธุกรรมของรุ่นลูกแตกต่างจากรุ่นพ่อแม่ (2) ประชากรจะสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยแอลลีลจำนวนหนึ่งจะสูญหายไปโดยเฉพาะแอลลีลที่มีความถี่ต่ำ ดังนั้นจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งจะลดลงเมื่อเทียบกับประชากรธรรมชาติ กระบวนการขาดช่วงทางพันธุกรรมมักเกิดขึ้นกับประชากรขนาดเล็กมากกว่าประชากรขนาดใหญ่

2) การถ่ายเทยีนระหว่างประชากร (gene flow) เกิดจากสมาชิกของประชากรหนึ่งไปผสมพันธุ์กับอีกประชากรหนึ่ง หากสิ่งมีชีวิต 2 กลุ่มมีการถ่ายเทยีนในระดับที่สูง ความแตกต่างระหว่างประชากร 2 กลุ่ม ก็จะน้อยลงจนกระทั่งเป็นประชากรเดียว หากระดับการถ่ายเทยีนระหว่างกลุ่มต่ำ ทั้งสองกลุ่มก็อาจจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรม ปัจจัยที่ขัดขวางการถ่ายเทยีนระหว่างกลุ่ม อาจ

รวมถึงปัจจัยทางกายภาพ เช่น สภาพภูมิประเทศหรือสิ่งก่อสร้าง และปัจจัยทางชีววิทยา เช่น ความจำเพาะต่อแหล่งวางไข่ หรือการมีฤดูกาลวางไข่ต่างกัน

3) การเกิดสภาวะคอขวด (demographic bottlenecks) เกิดจากการที่แต่ละจีโนไทป์มีโอกาสถูกคัดเลือกออกจากประชากรได้ไม่เท่ากัน การคัดเลือกในประชากรสัตว์น้ำธรรมชาติสามารถเกิดได้จากสภาวะธรรมชาติ เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำหรือจากการกระทำของมนุษย์ เช่น การใช้เครื่องมือที่จำเพาะต่อสัตว์ลักษณะหนึ่ง การคัดเลือกอาจทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเท่าเดิมหรือลดลงขึ้นอยู่กับลักษณะจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซโกตหรือเฮเทอโรไซโกตที่ถูกคัดออกจากประชากร ผลของการคัดเลือกต่อลักษณะปริมาณคือการเปลี่ยนค่าเฉลี่ยของลักษณะของประชากรรุ่นถัดไป (วันศุกร์ เสนานาญ และจิราภรณ์ ไตรศักดิ์, 2551)

2.8 การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งอาจเกิดจากการปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม การอพยพหรือการกลายพันธุ์ (Ayala, 1982; Slatkin, 1987) รูปแบบโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรจะบ่งบอกถึงความสามารถในการอยู่รอดที่สิ่งมีชีวิตสามารถปรับตัวให้เหมาะสมกับแหล่งที่อยู่ต่างๆโดยแสดงออกในรูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมกับกลุ่มประชากร โดยการเกิดโครงสร้างประชากรเกิดจากการที่มีการขัดขวางความสามารถในการส่งถ่ายยีนในกลุ่มประชากรเช่นการขัดขวางการเกิด gene flow อันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น ปัจจัยทางสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ หรือความสามารถในการสืบพันธุ์ วิธีการวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรนั้นมีหลายวิธีเช่น การเปรียบเทียบค่า Heterozygosity หรือการเปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรม สำหรับการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นนิยมใช้วิธีการเปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยวิธี Analysis of molecular variance (AMOVA) โดย AMOVA จะทำการประมาณการความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยตรงจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยคำนวณในรูปแบบของ squared-distances matrix จากการเปรียบเทียบระหว่างคู่ของแฮพโลไทป์โดยจะคำนวณออกมาเป็นความแปรปรวนออกมาแล้วแสดงค่าในรูปแบบของค่า F -statistic analogs ตามระดับของการแบ่งกลุ่มประชากรตรวจสอบ (Excoffier and Lischer, 2010)

2.9 การศึกษาประวัติประชากร

การศึกษาประวัติประชากรเป็นการศึกษาถึงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของ effective population size ในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถที่จะนำมาสร้างเป็นโมเดลของรูปแบบของการกลายพันธุ์เพื่อใช้คาดคะเนการเปลี่ยนแปลงที่ผ่านมาได้เช่น การตรวจสอบการขยายขนาดของประชากรโดยการศึกษาย้อนกลับด้วยวิธีการทาง coalescent เพื่อคาดคะเนประชากรก่อนและหลังการขยายตัว (Tajima, 1989 ; Rogers and Harpending, 1992) อีกวิธีหนึ่ง

ซึ่งนิยมใช้ในการตรวจสอบประวัติประชากรคือการศึกษา Neutrality tests (Tajima's D and Fu's F statistics) โดยวิธีนี้เป็นการตรวจสอบประชากรที่มีการเบี่ยงเบนไปจากประชากรที่เป็น neutral population ซึ่งเป็นประชากรที่มีการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนอันเนื่องมาจากปัจจัยของการเกิดการกลายพันธุ์และ genetic drift เท่านั้น และยังสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ population size ได้อีกด้วย (Mousset *et al.*, 2004) โดยในการตรวจสอบด้วยวิธี Tajima's D test และ Fu's F_s test หากมีค่าติดลบ แสดงว่าประชากรเคย ผ่านการถูกคัดเลือกแบบ purifying selection หรือเคยเกิด population expansion มาก่อน โดยค่า Fu's F_s จะมีความสามารถในการตรวจสอบการเกิด population expansion ได้สูงหากมีค่าติดลบ (Fu, 1997) การตรวจสอบประวัติประชากรอีกวิธีที่นิยมคือการศึกษาการตรวจสอบด้วยวิธี Mismatch distribution โดยวิธี Mismatch distribution เป็นการตรวจสอบการแพร่กระจายของความถี่เมื่อเปรียบเทียบเป็นรายคู่ของจำนวนของการกลายพันธุ์ โดยแสดงออกมาในรูปแบบของพารามิเตอร์ ได้แก่ θ_0 , θ_1 (ก่อนและหลัง population growth) และค่า τ (ระยะเวลาในการกลายพันธุ์) และยังแสดงผลในรูปแบบของกราฟการกระจายได้ (Rogers and Harpending, 1992) โดยหากกราฟเป็นรูปแบบ smooth unimodal distributions แสดงว่ามีการสะสมของการเกิดการกลายพันธุ์มาเรื่อยๆ แสดงว่าประชากรน่าจะเริ่มมีการขยายขนาดมาเมื่อไม่นานมานี้ แต่ถ้าหากว่ารูปแบบของกราฟเป็นแบบ ragged multimodal distributions แสดงว่าประชากรมีการขาดหายของการกลายพันธุ์มานานการลักษณะของกราฟเป็นเพียงการกลายพันธุ์เพื่อรักษาความสมดุลในประชากรเท่านั้นซึ่งแสดงว่าประชากรมีขนาดที่คงที่และเป็นประชากรที่เป็น constant population size (Cassone and Boulding, 2006)

2.10 การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในสัตว์ทะเล

การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์ทะเลสามารถที่จะทำให้เข้าใจในกลไกของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Tudela *et al.*, 1999) ซึ่งสามารถนำข้อมูลไปใช้ในการวางแผนจัดการทรัพยากรได้ (Roldan *et al.*, 2000) สาเหตุของการเกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์ทะเลมีหลายปัจจัยเช่น ปัจจัยทางฟิสิกส์ทางทะเล ได้แก่ กระแสน้ำ น้ำขึ้นน้ำลง พายุ เป็นต้น ปัจจัยทางชีววิทยา เช่น การเคลื่อนที่ของตัวอ่อน กลยุทธ์ในการสืบพันธุ์ เป็นต้น (Roman and Palumbi, 2004) การเกิดการแยกของโครงสร้างประชากรของสัตว์ทะเลอาจเกิดจากการที่มีระยะห่างระหว่างประชากรมากเกินไปหรือมีปัจจัยทางภูมิศาสตร์มาขวางกั้นทำให้ไม่สามารถเกิด gene flow ระหว่างกันได้ หรือเกิดจากการที่มีการจำกัดของแหล่งที่อยู่โดยจะเลือกเฉพาะแหล่งที่อยู่ที่เหมาะสมเท่านั้น (Bowen *et al.*, 2001; Guarnieo *et al.*, 2002; Carmill *et al.*, 2003; Bernal-Ramirez *et al.*, 2003; Hoffman *et al.*, 2005)

การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรหอยชักตีนนั้นไม่เคยมีรายงานมาก่อนแต่มีรายงานในกลุ่มหอยที่ใกล้เคียงคือในหอย Queen conch (*Strombus gigas*) โดยการศึกษาของ Perez- Enriquez *et al.* (2011) ซึ่งได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอย Queen conch (*Strombus gigas*) บริเวณหมู่เกาะแคริบเบียนและที่อ่าวเม็กซิโกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และ cytb ผลการศึกษาพบว่าหอย Queen conch ที่อาศัยในแถบบริเวณดังกล่าวเคยผ่าน

ปรากฏการณ์คอขวดมาก่อนและพบว่าไม่มีโครงสร้างประชากรเกิดขึ้น อีกการศึกษาเป็นการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ของหอย Queen conch ในบริเวณตะวันตกเฉียงใต้ของหมู่เกาะแคริบเบียนและตลอดชายฝั่งของเขตไหล่ทวีป Columbian พบว่าบริเวณดังกล่าวมีความแตกต่างของโครงสร้างประชากรเกิดขึ้น (Marquez *et al.* 2012) ส่วนอีกบริเวณที่มีการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของหอย Queen conch คือ ตลอดแหลมยูคาธานโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์พบว่าบริเวณดังกล่าวไม่มีการแยกกลุ่มประชากรซึ่งอาจเกิดจากการที่มี gene flow สูงจึงสามารถจัดการบริหารทรัพยากรร่วมกันได้ (Bustillos *et al.* 2011) สำหรับเครื่องหมายพันธุกรรมอื่นที่มีการศึกษาในหอย Queen conch คือ ตำแหน่งของ polymorphic enzyme loci ของประชากรหอย 17 บริเวณรอบหมู่เกาะแคริบเบียนพบว่าบริเวณดังกล่าวมีการเกิด gene flow ค่อนข้างสูงจึงไม่มีการแบ่งแยกกลุ่มประชากรยกเว้นบริเวณ Bermuda ที่มีความแตกต่างของโครงสร้างประชากรกับกลุ่มอื่น (Mitton *et al.* 1989)

สำหรับในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานด้านพันธุศาสตร์ประชากรของหอยชักตีนมาก่อนเช่นเดียวกัน แต่มีรายงานการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์น้ำชายฝั่งอื่นๆได้แก่ การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) ในทะเลฝั่งอ่าวไทยและอันดามันโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ผลการศึกษาพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาช่อนทะเลทั้งสองฝั่งใกล้เคียงกันและไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรทั้งสองฝั่งซึ่งคาดว่ากรณีที่ไม่มี ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรน่าจะเกิดจากการที่มีการผสมกันเองภายในกลุ่ม (inbreeding) (Phinchongsakuldit *et al.*, 2013) การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของม้าน้ำ (*Hippocampus kuda*) ในประเทศไทยโดยเก็บตัวอย่างจากทะเลฝั่งอ่าวไทยและอันดามันโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณคอนโทรลรีเจียน ผลการศึกษาพบว่ามีการเกิดโครงสร้างประชากรเกิดขึ้นและยังพบว่าทั้งสองฝั่งทะเลมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงจึงควรมีการจัดการแยกกันในแต่ละฝั่งทะเล (Panithanarak *et al.*, 2010) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากระรัง (*Epinephelus coioides*) ในทะเลไทยและอินโดนีเซียโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ในประเทศไทยเก็บตัวอย่างที่จังหวัดนครศรีธรรมราชและตรัง ผลการศึกษาพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยและพบว่าโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรในจังหวัดนครศรีธรรมราชแตกต่างจากประชากรในแหล่งอื่น (Antoro *et al.*, 2006)

ปัจจุบันการศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมและการศึกษาโครงสร้างประชากรในสัตว์ทะเลมีการศึกษาโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเริ่มเป็นที่นิยมมากขึ้น และจากการที่ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ประชากรของหอยชักตีนในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากยีน cytochrome oxidase subunit I เพื่อศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของหอยชักตีนโดยมุ่งศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยซึ่งเป็นแหล่งประมงแหล่งใหญ่ โดยข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการพิจารณาในการจัดการและการประมงหอยชักตีนเพื่อคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรม

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างหอยชักตีนตามแนวชายฝั่งทะเลในภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดสตูล, จังหวัดตรัง, จังหวัดกระบี่, จังหวัดภูเก็ต, จังหวัดพังงา, จังหวัดระนอง, จังหวัดปัตตานี, จังหวัดสุราษฎร์ธานี, และจังหวัดชุมพร รวมทั้งหมดจำนวน 140 ตัว (FIGURE 3, TABLE 1) จากนั้นนำเนื้อหอยน้ำหนักประมาณ 30 มิลลิกรัม มาสกัด genomic DNA ด้วยชุดสกัด TIANamp Genomic DNA Kit (TIANGEN, TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD.) ตามวิธีและขั้นตอนที่แนบมากับชุดสกัดดีเอ็นเอ



FIGURE 3. The collecting localities for *S. canarium* along the Southern coast of Thailand and the localities abbreviated in the parentheses: Satun (ST); Trang (TG); Krabi (KB); Phuket (PK); Phang Nga (PN); Ranong (RN); Pattani (PT); Surat Thani (SR); Chumporn (CP)

3.2 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) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดพีซีอาร์ ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X *Taq* buffer 5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 7.5 ไมโครลิตร, 2mM dNTPs mix 4 ไมโครลิตร, 10 μ M primer forward 2 ไมโครลิตร, 10 μ 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 และอุณหภูมิ 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 1ST Base Laboratory, Malaysia

3.3 การจัดการข้อมูลและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

3.3.1 การจัดการข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

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

3.3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

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

3.4 การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

3.4.1 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

วิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี analysis of molecular variance (AMOVA) เพื่อเปรียบเทียบระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรโดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations วิเคราะห์ค่า F -statistic ได้แก่ Φ_{CT} , Φ_{SC} และ Φ_{ST} ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยทำการวิเคราะห์เป็น 2 แบบ ได้แก่

การวิเคราะห์แบบที่ 1 แบ่งประชากรเป็น 10 กลุ่มประชากรตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง (single region) ได้แก่จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ จังหวัดภูเก็ต จังหวัดพังงา จังหวัดระนอง จังหวัดปัตตานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี และจังหวัดชุมพร

การวิเคราะห์แบบที่ 2 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มชายฝั่งทะเลอันดามัน ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ จังหวัดภูเก็ต จังหวัดพังงา และจังหวัดระนอง และกลุ่มชายฝั่งทะเลอ่าวไทย ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดปัตตานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี และจังหวัดชุมพร

3.4.2 ระยะห่างทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรด้วยวิธี pairwise F_S ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010)

3.5 การวิเคราะห์ประวัติประชากร

3.5.1 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 and Lischer, 2010)

3.5.2 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 and Lischer, 2010) ประเมินขนาดของประชากรด้วยพารามิเตอร์ θ_0 และ θ_1 เมื่อ θ_0 และ θ_1 เท่ากับ $2N\mu$ เมื่อ N คือค่า effective female population size

3.5.3 ทหารยะเวลาในการขยายขนาดประชากร

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

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างทั้งหมด 140 ตัว วิเคราะห์จากลำดับเบส 490 คู่เบส มีตำแหน่ง polymorphic sites 24 ตำแหน่ง มีแฮพลไทป์ทั้งหมด 24 แฮพลไทป์ประกอบไปด้วยแฮพลไทป์ที่เป็น shared haplotype จำนวน 11 แฮพลไทป์ แบ่งเป็นแฮพลไทป์ที่ shared haplotype ระหว่างประชากร 9 แฮพลไทป์ และ shared haplotype ภายในประชากร 2 แฮพลไทป์ โดยแฮพลไทป์ H02 เป็นแฮพลไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกจังหวัด (TABLE 2) โดยมีจังหวัดที่มี rare haplotype จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสตูล 2 แฮพลไทป์, จังหวัดตรัง 1 แฮพลไทป์, จังหวัดพังงา 3 แฮพลไทป์, จังหวัดระนอง 1 แฮพลไทป์, จังหวัดปัตตานี 3 แฮพลไทป์ และจังหวัดสุราษฎร์ธานี 3 แฮพลไทป์ จำนวนรวมทั้งหมด 13 แฮพลไทป์ สำหรับค่า haplotype diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.600-0.819 ส่วนค่า nucleotide diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.001-0.007 โดยค่า haplotype diversity ของประชากรรวมทั้งหมดมีค่า 0.746 ± 0.035 และค่า nucleotide diversity ของประชากรรวมทั้งหมดมีค่า 0.003 ± 0.000 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมได้แก่ จำนวนแฮพลไทป์, จำนวน polymorphic sites, haplotype diversity (h) และ nucleotide diversity (π) ของแต่ละจังหวัดแสดงใน TABLE 1

TABLE 1. Collecting localities, code of collecting site, number of individuals per sampling site (N) and summary statistics of genetic variability for *S. canarium* along the Southern coast of Thailand

Locality	Code	N	No. haplotypes	No. polymorphic sites	Haplotype diversity (h) (mean \pm SD)	Nucleotide diversity (π) (mean \pm SD)
Satun	ST	15	7	4	0.819 ± 0.082	0.004 ± 0.001
Trang	TG	14	6	3	0.813 ± 0.074	0.007 ± 0.002
Krabi	KB	14	3	5	0.484 ± 0.142	0.005 ± 0.002
Phuket	PK	15	4	3	0.686 ± 0.104	0.001 ± 0.000
Phang Nga	PN	17	8	7	0.816 ± 0.082	0.000 ± 0.001
Ranong	RN	16	5	4	0.600 ± 0.127	0.001 ± 0.000
Pattani	PT	16	7	8	0.825 ± 0.066	0.003 ± 0.000
Surat Thani	SR	18	7	6	0.817 ± 0.060	0.002 ± 0.000
Chumporn	CP	15	6	5	0.571 ± 0.149	0.001 ± 0.000
Total		140	24	27	0.746 ± 0.035	0.003 ± 0.000

TABLE 2. Haplotype distributions of *S. canarium* from 9 localities along the Southern coast of Thailand

Haplotype	ST	TG	KB	PK	PN	RN	PT	SR	CP	Total
H01	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H02	6	5	10	8	7	10	5	5	10	66
H03	2	-	-	3	1	3	2	6	1	18
H04	3	4	-	-	3	1	5	-	1	17
H05	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H06	1	-	-	-	-	1	-	-	-	2
H07	1	2	-	-	-	-	-	-	-	3
H08	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
H09	-	1	2	-	-	-	-	1	1	5
H10	-	1	2	-	1	-	-	-	-	4
H11	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H12	-	-	-	2	2	-	-	-	1	5
H13	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H14	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H15	-	-	-	2	-	-	-	-	-	2
H16	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
H17	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
H18	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
H19	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
H20	-	-	-	-	-	-	1	-	1	2
H21	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
H22	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
H23	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
H24	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Total	15	14	14	15	17	16	16	18	15	140

4.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเมื่อวิเคราะห์แบบที่ 1 โดยแบ่งกลุ่มประชากรตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง พบว่าประชากรหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยมีโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเกิดขึ้น โดยมีค่า $\Phi_{ST} = 0.052$ ($p = 0.006$) ประชากรมีความแปรปรวนภายในกลุ่ม 94.72 เปอร์เซ็นต์ และความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากร 5.28 เปอร์เซ็นต์ (TABLE 3) และเมื่อวิเคราะห์แบบที่ 2 โดยแบ่งกลุ่มประชากรเป็นกลุ่มชายฝั่งทะเลอันดามันและกลุ่มชายฝั่งทะเลอ่าวไทย พบว่า ประชากรหอยชักตีนระหว่างกลุ่มชายฝั่งทะเลอันดามันและกลุ่มชายฝั่งทะเลอ่าวไทยมีโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเกิดขึ้น โดยมีค่า $\Phi_{CT} = 0.015$ ($p = 0.018$) ประชากรมีความแปรปรวนภายในกลุ่ม 94.00 เปอร์เซ็นต์ มีความแปรปรวนระหว่างประชากรภายในกลุ่มเดียวกัน 4.45 เปอร์เซ็นต์ และความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากร 1.55 เปอร์เซ็นต์ (TABLE 3) ผลการวิเคราะห์ค่า pairwise F_{ST} พบว่าประชากรแต่ละจังหวัดมีความแตกต่างทางพันธุกรรมดังนี้ จังหวัดสตูลกับกลุ่มจังหวัดปัตตานี จังหวัดสงขลาและจังหวัดสุราษฎร์ธานี, จังหวัดตรังกับกลุ่มจังหวัดปัตตานี จังหวัดสงขลาและจังหวัดสุราษฎร์ธานี, จังหวัดกระบี่กับกลุ่มจังหวัดปัตตานี จังหวัดสงขลาและจังหวัดสุราษฎร์ธานี, จังหวัดภูเก็ตกับกลุ่มจังหวัดปัตตานี จังหวัดสงขลาและจังหวัดสุราษฎร์ธานี, จังหวัดระนองกับกลุ่มจังหวัดปัตตานี จังหวัดสงขลาและจังหวัดสุราษฎร์ธานี (TABLE 4)

TABLE 3. Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) of *S. canarium*

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	p-value
1) Single region					
Among populations	8	12.658	0.047 Va	5.28	$\Phi_{ST} = 0.052^*$ ($p=0.006$)
Within populations	131	111.035	0.048 Vb	94.72	
Total	139	123.693			
2) Andaman sea and Gulf of Thailand					
Among groups	1	2.380	0.013 Va	1.55	$\Phi_{CT} = 0.015^*$ ($p=0.018$)
Among populations within groups	7	10.278	0.040 Vb	4.45	$\Phi_{SC} = 0.045^*$ ($p=0.033$)
Within populations	131	111.035	0.847 Vc	94.00	$\Phi_{ST} = 0.059^*$ ($p=0.004$)
Total	139	123.693			

* significant differentiation ($p < 0.05$)

TABLE 4. Population pairwise F_{ST} values of *S. canarium*

	ST	TG	KB	PK	PN	RN	PT	SR	CP
ST									
TG	0.001 (0.394)								
KB	0.022 (0.221)	-0.029 (0.403)							
PK	0.067 (0.029)	0.145 (0.104)	0.086 (0.204)						
PN	-0.025 (0.634)	0.020 (0.242)	-0.007 (0.276)	0.016 (0.212)					
RN	0.029 (0.134)	0.135 (0.086)	0.082 (0.056)	-0.002 (0.414)	0.010 (0.239)				
PT	-0.019* (0.021)	0.094* (0.048)	0.098* (0.001)	0.049* (0.049)	-0.005* (0.044)	0.021* (0.031)	-		
SR	0.090* (0.007)	0.169* (0.004)	0.117* (0.003)	0.042* (0.025)	0.080* (0.004)	0.033* (0.040)	0.080 (0.060)	-	
CP	0.035* (0.038)	0.118* (0.027)	0.055* (0.002)	0.004* (0.044)	-0.011* (0.024)	-0.012* (0.026)	0.020 (0.232)	0.087 (0.079)	-

*significant differentiation ($p < 0.05$)

p values in parentheses

4.3 ประวัติประชากร

จากการวิเคราะห์ประวัติประชากร พบว่าประชากรเบียงเบนไปจาก neutral population โดยมีค่า D statistic เท่ากับ -1.843 ($p = 0.006$) ส่วนค่า FS statistic มีค่า -15.815 ($p = 0.000$) และทั้งสองค่าสถิติมีค่าติดลบในทุกจังหวัด (TABLE 5) การทดสอบ mismatch distribution พบว่ามีการกระจายตัวแบบ unimodal โดยกราฟการกระจายตัวแสดงใน FIGURE 4-13 ค่า Raggedness index มีค่าเท่ากับ 0.110 ($p = 0.100$) และยอมรับการเกิด sudden expansion model โดยมีค่า SSD เท่ากับ 0.013 ($p = 0.062$) ค่าพารามิเตอร์ θ_1 ของประชากรรวม มีค่า 99,999.000 และ θ_0 ของประชากรรวม มีค่า 0.024 และพบว่าทุกจังหวัดมีค่า θ_1 มากกว่า θ_0 (TABLE 5) ระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรพบว่าการขยายขนาดมา 98,979 ปีที่ผ่านมา

TABLE 5. Parameter indices of mismatch distribution analysis and neutrality test of *S. canarium*

Locality	Tajima's <i>D</i>	Fu' s <i>FS</i>	τ^a	θ_0^b	θ_1^c	<i>SSD</i> ^d	Rag	Expansion time (year ago)
ST	-1.603 (0.044)	-1.632 (0.129)	1.395	0.000	99999.000	0.020 (0.024)	0.116 (0.327)	118,367
TG	-0.004 (0.053)	-0.709 (0.659)	1.230	0.000	99999.000	0.094 (0.218)	0.137 (0.402)	104,591
KB	-0.627 (0.290)	-3.481 (0.950)	1.023	0.000	99999.000	0.300 (0.100)	0.217 (0.975)	86,989
PK	-0.272 (0.409)	-0.723 (0.184)	1.062	0.000	99999.000	0.030 (0.099)	0.190 (0.058)	90,306
PN	-1.935 (0.011)	-2.583 (0.047)	0.976	0.000	99999.000	0.037 (0.131)	0.216 (0.091)	82,993
RN	-1.311 (0.096)	-2.363 (0.010)	0.880	0.000	99999.000	0.020 (0.164)	0.180 (0.195)	74,829
PT	-1.312 (0.096)	-2.568 (0.099)	1.664	0.000	99999.000	0.004 (0.682)	0.070 (0.054)	141,496
SR	-0.948 (0.196)	-2.999 (0.008)	1.460	0.000	99999.000	0.027 (0.098)	0.164 (0.089)	124,149
CP	-1.910 (0.009)	-4.166 (0.000)	0.828	0.000	99999.000	0.016 (0.287)	0.156 (0.358)	70,408
Total	-1.843 (0.006)	-15.815 (0.000)	1.164	0.024	99999.000	0.013 (0.062)	0.110 (0.100)	98,979

*significant differentiation ($p < 0.05$)

^atime in number of generation

^bpreexpansion population size ($\theta_0 = 2N_0\mu$)

^cpostexpansion population size ($\theta_1 = 2N_1\mu$)

^dsum of squared deviations

p values in parentheses

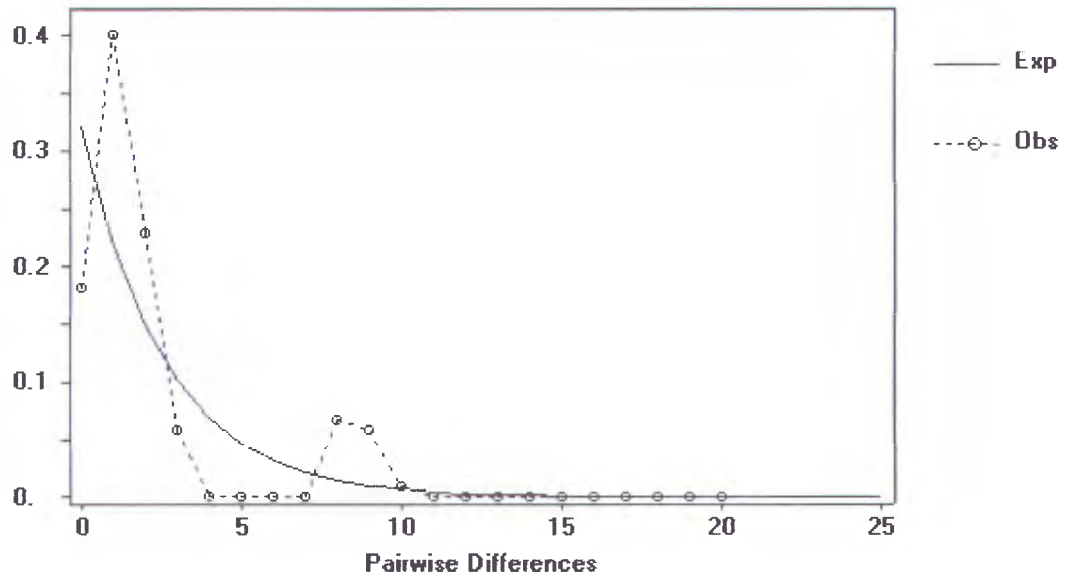


FIGURE 4. The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of *S. canarium* in Satun province

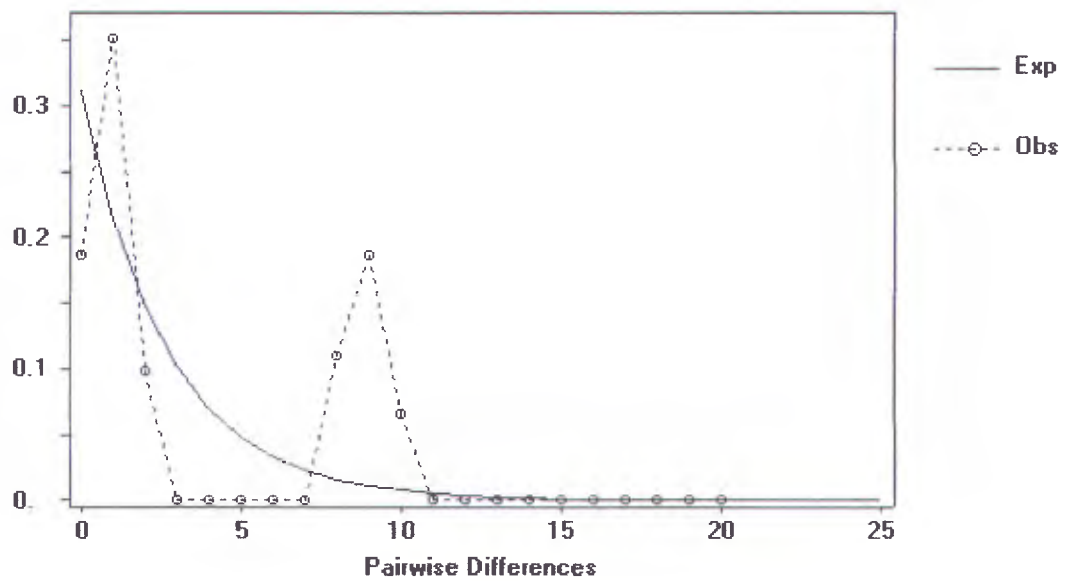


FIGURE 5. The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of *S. canarium* in Trang province

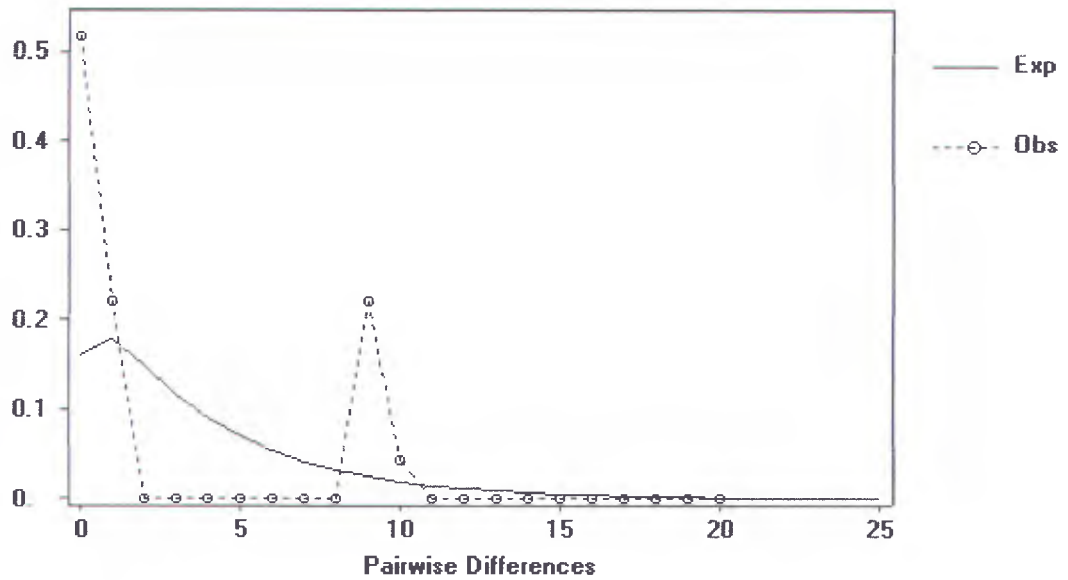


FIGURE 6. The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of *S. canarium* in Krabi province

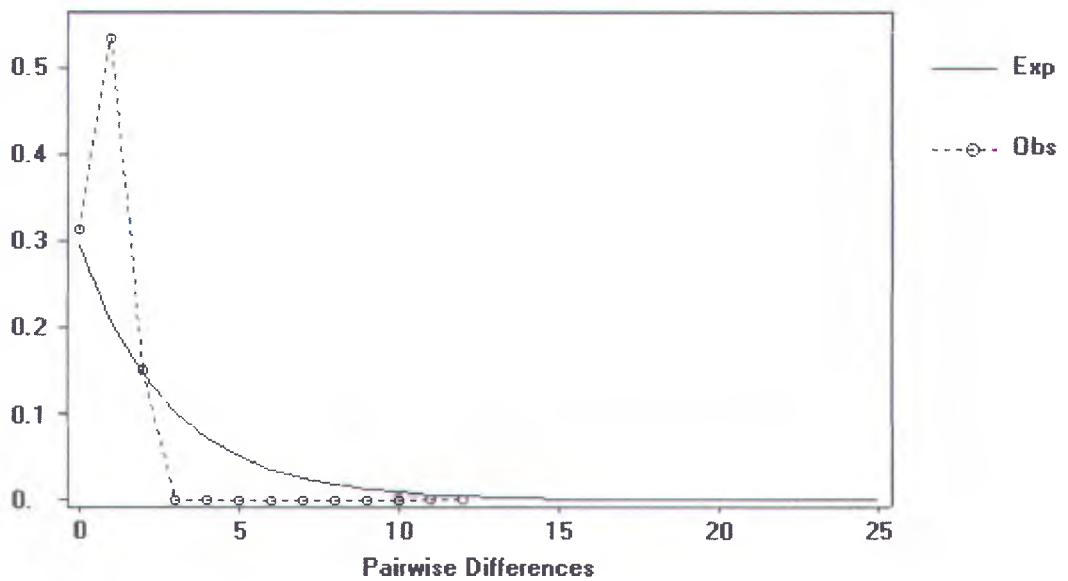


FIGURE 7. The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of *S. canarium* in Phuket province

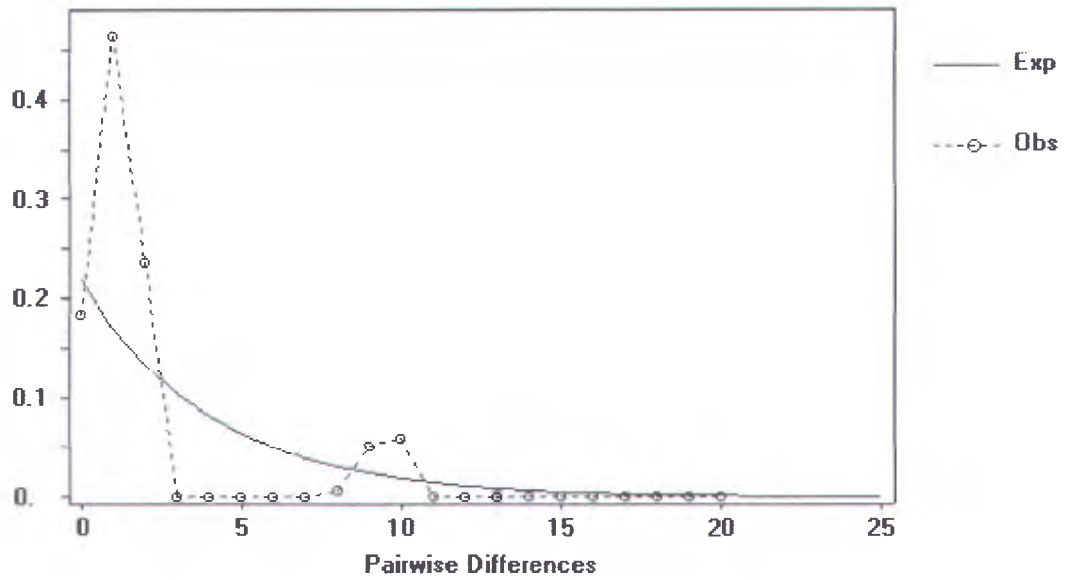


FIGURE 8. The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of *S. canarium* in Phang Nga province

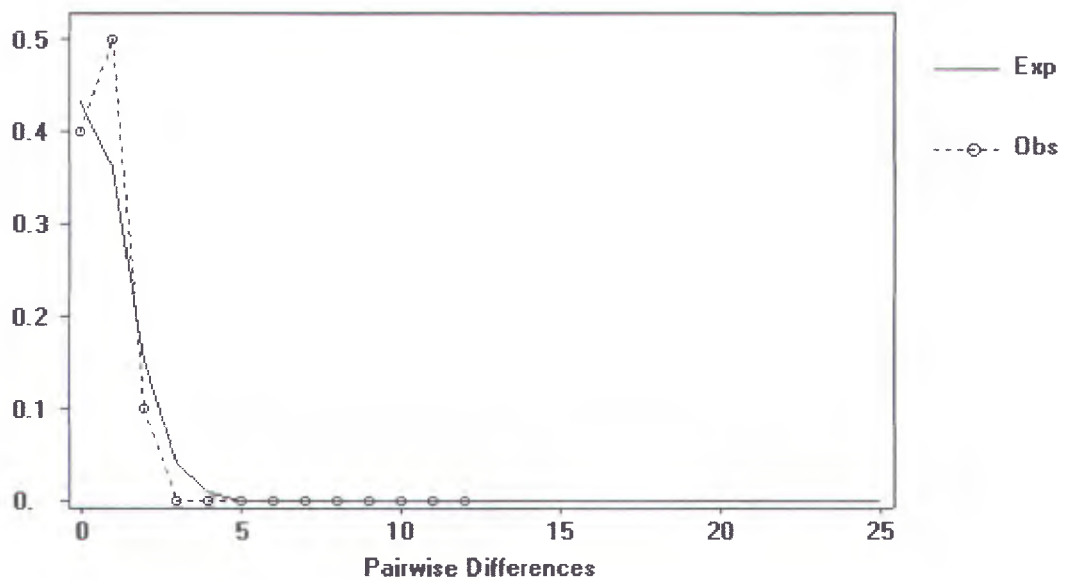


FIGURE 9. The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of *S. canarium* in Ranong province

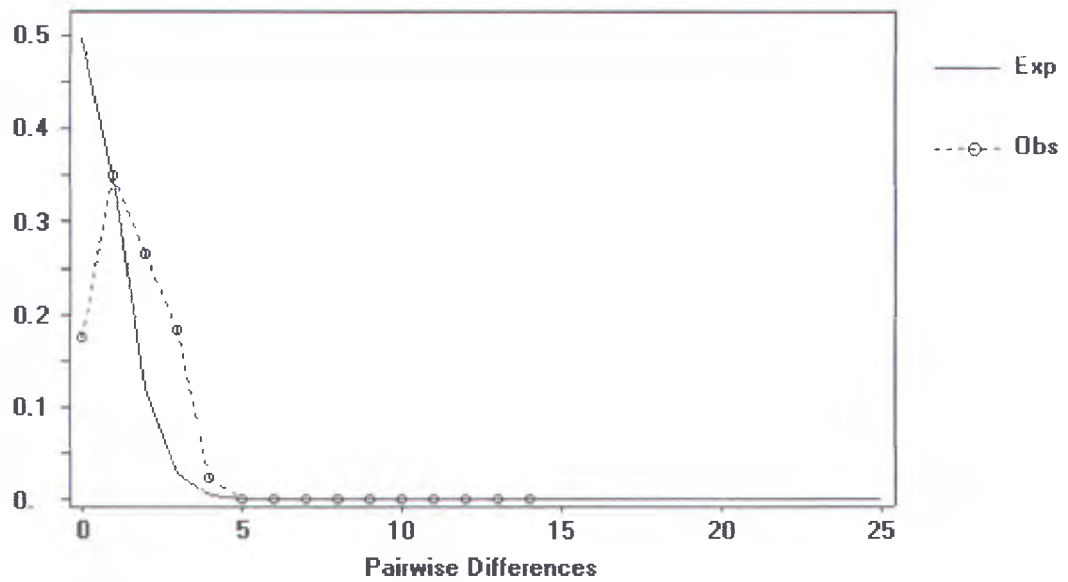


FIGURE 10. The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of *S. canarium* in Pattani province

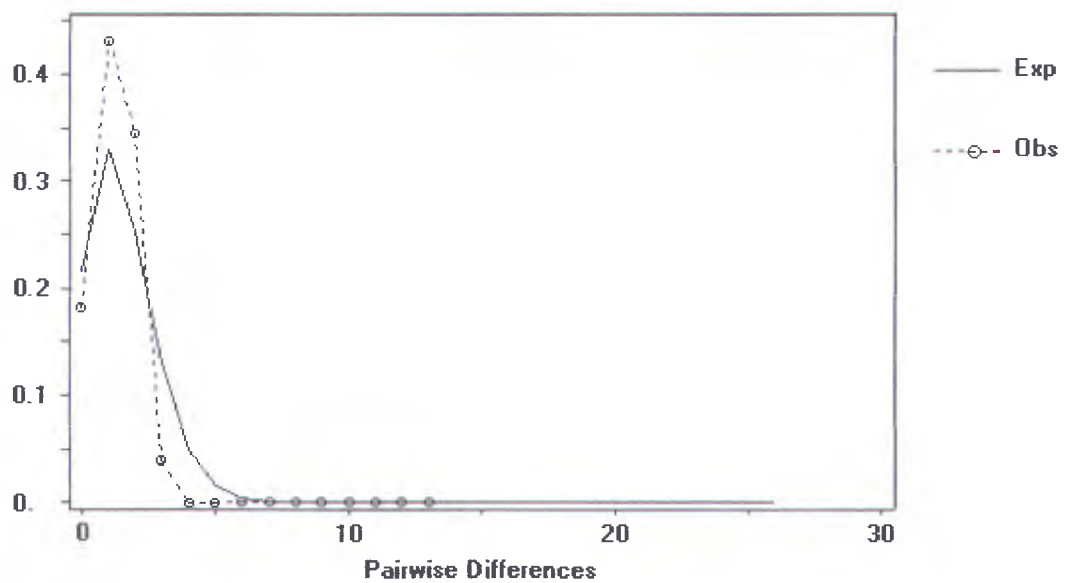


FIGURE 11. The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of *S. canarium* in Surat Thani province

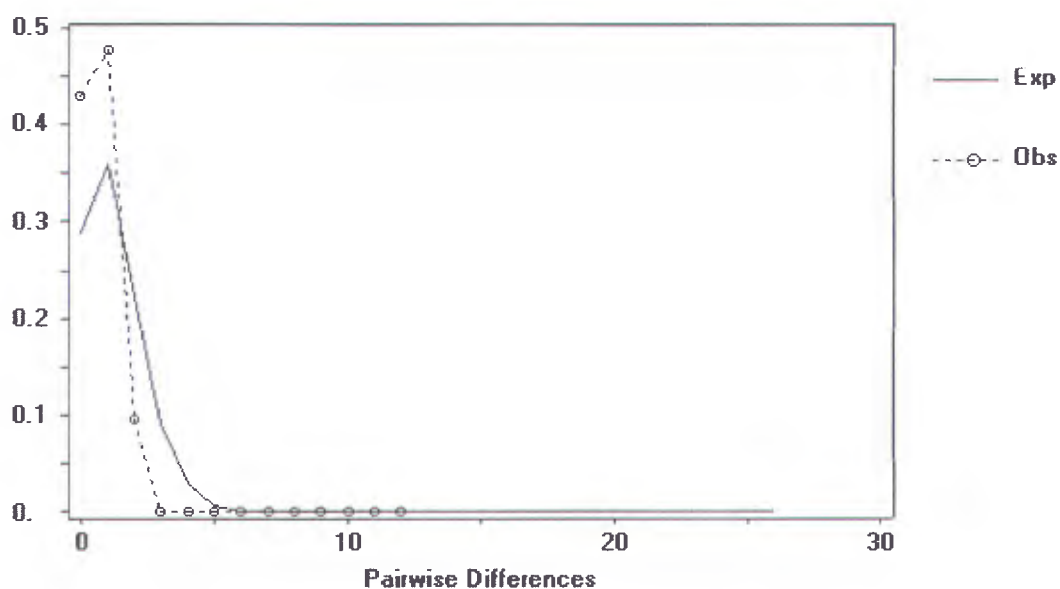


FIGURE 12. The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of *S. canarium* in Chumporn province

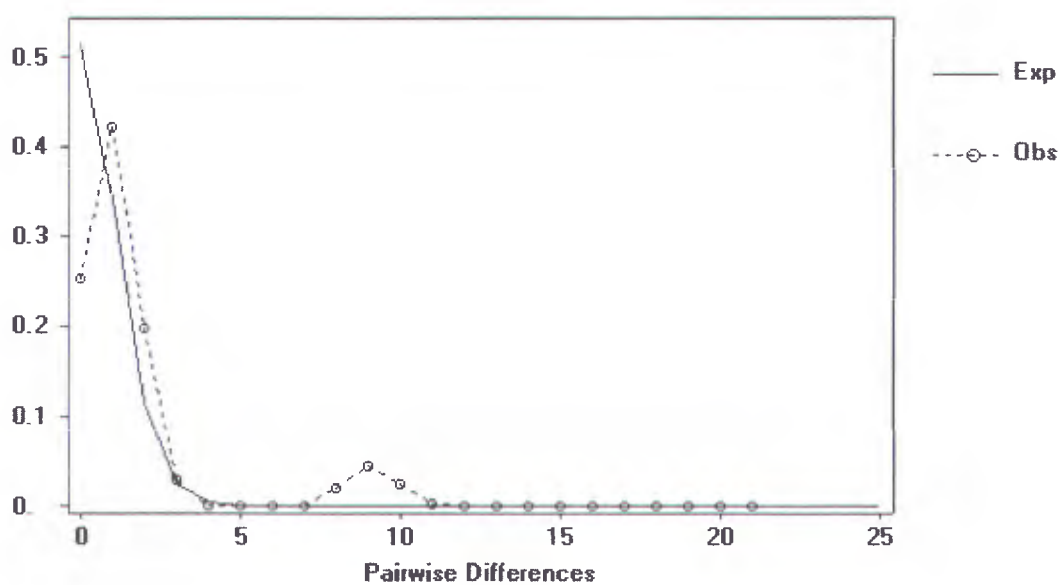


FIGURE 13. The observed pairwise differences (dotted line) and the expected mismatch distribution (thin line) under sudden population expansion model of *S. canarium* along the Southern coast of Thailand

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ผลการศึกษาพบว่าประชากรหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในประชากรมากกว่า 94 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เมื่อพิจารณาจากค่า haplotype diversity พบว่าจังหวัดปัตตานีมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด ส่วนจังหวัดกระบี่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำที่สุด ซึ่งควรมีมาตรการในการจัดการเพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม จากรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่า ทุกจังหวัดมีค่า haplotype diversity สูงกว่าค่า nucleotide diversity ซึ่งรูปแบบดังกล่าวพบได้ในประชากรที่มีการขยายขนาดโดยเกิดจากประชากรที่มีการสะสมการกลายพันธุ์รูปแบบใหม่ในระหว่างที่มีการขยายขนาดอย่างรวดเร็ว (Watterson, 1984) และสามารถพบรูปแบบความหลากหลายดังกล่าวได้ในสัตว์ทะเลหลายชนิด เช่น ปูม้า (*Portunus trituberculatus*) (Xu et al., 2009), ปลาตะเกียบ (*Scatophagus argus*) (วีระเกียรติ ทรัพย์มี, 2558) และปลากระบอก (*Liza subviridis*) (จุฑามาศ ศุภพันธ์, 2558) เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการ share haplotype ระหว่างจังหวัดจำนวน 9 แอพอไลโทป์ ในขณะที่อีก 15 แอพอไลโทป์ พบเฉพาะในแต่ละจังหวัด ซึ่งเรียกว่า private allele โดยสามารถใช้ private allele เป็นดัชนีในการระบุกลุ่มทางพันธุกรรมของแต่ละจังหวัดได้ (Xu et al., 2009)

5.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่าประชากรหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยมีความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยเฉพาะประชากรจากจังหวัดในทะเลอันดามันมีความแตกต่างกับประชากรในอ่าวไทยแสดงว่าปัจจัยทางภูมิศาสตร์ของภาคใต้ระหว่างทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามันที่ถูกแบ่งแยกด้วยคาบสมุทรลาอูมีผลในการขัดขวางการผสมพันธุ์ระหว่างประชากรซึ่งเป็นการขัดขวางการแลกเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างประชากรทั้งสองฝั่งทะเล ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรสัตว์น้ำในทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามันสามารถพบได้ เช่น ใน กุ้ง shovel-nosed lobster (*Thenus indicus*) (Iamsuwansuk and Denduangboripant, 2011), หอย Asian moon scallop (*Amusium pleuronectes*) (Mahidol et al., 2007) และ ม้าน้ำ spotted seahorse (*Hippocampus kuda*) (Panithanarak et al., 2010) สำหรับผลการวิเคราะห์ค่า pairwise F_{ST} พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างจังหวัดในกลุ่มทะเลฝั่งอันดามันและกลุ่มทะเลฝั่งอ่าวไทย ซึ่งเป็นการยืนยันผลการทดสอบด้วยวิธี AMOVA ว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรหอยชักตีนในทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามันจากการที่ประชากรหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยเกิดเป็นโครงสร้างพันธุกรรมประชากรย่อยดังนั้นแนวทางในการอนุรักษ์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมอาจทำได้โดยการใช้พ่อแม่พันธุ์จากในหลายพื้นที่ของฝั่งทะเลเดียวกัน ปล่อยลงสู่แหล่งธรรมชาติเพื่อเป็นการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม

5.3 ประวัติประชากร

จากการศึกษาประวัติประชากรพบว่าประชากรหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยเคยมีการขยายขนาดประชากร สอดคล้องกับผลการศึกษา 4 วิธีได้แก่ 1) การทดสอบ Tajima's D test และ Fu's FS test พบว่ามีค่าติดลบซึ่งแสดงว่าประชากรเบี่ยงเบนไปจาก neutral population สำหรับค่า D statistic ที่มีค่าติดลบบ่งบอกว่าประชากรกำลังถูกคัดเลือกโดยการคัดการกลายพันธุ์ที่ไม่เหมาะสมทิ้งไป (purifying selection) หรืออาจมีการขยายขนาดประชากรเกิดขึ้น (Yang, 2006) อีกทั้งค่า FS statistic ซึ่งเป็นค่าสถิติที่ใช้ทดสอบการขยายขนาดประชากรสำหรับเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เป็นนอกรีคอมบิเนชัน (Ramirez-Soriano *et al.*, 2008) พบว่ามีค่าติดลบด้วยเช่นกัน จึงเป็นการยืนยันว่าประชากรหอยชักตีนเคยมีการขยายขนาด 2) การทดสอบ mismatch distribution พบว่ามีรูปแบบการกระจายตัวแบบ unimodal และยอมรับการเกิด sudden expansion model จึงเป็นการยืนยันว่าเคยมีการขยายขนาดประชากรของหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทย 3) ค่าพารามิเตอร์ θ มีค่ามากกว่า θ_0 ในทุกประชากรแสดงว่ามีประชากรเพศเมียที่มีความสามารถในการสืบพันธุ์เพิ่มขึ้น บ่งบอกว่าประชากรเคยมีการขยายขนาด โดยระยะเวลาในการขยายขนาดเริ่มมาเมื่อประมาณ 100,000 ปี ซึ่งอยู่ในยุคไพลสโตซีน (Pleistocene) และมีรายงานว่าในยุคนี้มีสัตว์ทะเลหลายชนิดเริ่มมีการขยายขนาดประชากรด้วยเช่นกัน (Planes *et al.*, 2001) เมื่อพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ τ ในทะเลฝั่งอันดามันพบว่าทิศทางการขยายขนาดประชากรน่าจะเริ่มต้นจากทะเลอันดามันตอนล่างสู่ทะเลอันดามันตอนบน สอดคล้องกับทิศทางการไหลของกระแสน้ำในทะเลอันดามันที่เริ่มต้นจากช่องแคบมะละกาสู่ทะเลอันดามันตอนบนในช่วงฤดูมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (Pongparadon *et al.*, 2015) ซึ่งตรงกับช่วงฤดูวางไข่ของหอยชักตีนในทะเลอันดามัน (ประเสริฐ ทองหนู่น้อย และคณะ, 2553) และเมื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์ τ ในฝั่งทะเลอ่าวไทย พบว่าทิศทางการขยายขนาดประชากรน่าจะเริ่มต้นจากทะเลอ่าวไทยตอนล่างสู่อ่าวไทยตอนบน ตามทิศทางการไหลของกระแสน้ำในช่วงฤดูมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (Nakthon, 1992)

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของหอยชักตีนที่สุ่มขึ้นมา จากแต่ละจังหวัดตามแนวชายฝั่งทะเลภาคใต้ของประเทศไทยโดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน cytochrome oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรียขนาด 490 คู่เบส พบว่ามีโครงสร้าง พันธุศาสตร์ประชากรของหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยโดยแบ่งเป็นประชากรฝั่งทะเลอันดา มันและประชากรฝั่งทะเลอ่าวไทย เมื่อวิเคราะห์ประวัติประชากร พบว่าประชากรหอยชักตีนในทะเล ภาคใต้ของประเทศไทยเคยมีการขยายขนาดประชากร ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการ วางแผนพิจารณาในการจัดการทรัพยากรหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยได้ แต่อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมอื่นเช่นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ซึ่งมีอัตราการกลายพันธุ์สูงในการพิจารณาเพื่อกำหนดแนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ของหอยชักตีนในภาคใต้ของประเทศไทยควบคู่ไปด้วยกัน

เอกสารอ้างอิง

- จุฑามาศ ศุภพันธ์. 2558. โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลากระบอก (*Liza subviridis*) ในอ่าวไทย และแนวทางในการอนุรักษ์. *วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 10 (1): 118-130.
- ประเสริฐ ทองหนู่น้อย, สุวัจน์ ธีรุต, ชาญยุทธ สุดทองคง, อภิรักษ์ สงรักษ์, อำนาจ สร้อยทอง, สิทธิโชค จันทร์ย่อง, รัตนาพร อนันตสุข, ประสาร อินทเจริญและ อำนวย คงพรพรหม. 2553. *สภาวะทรัพยากรหอยตลับและหอยชักตีน และแนวทางการจัดการเพื่อความยั่งยืนในพื้นที่ชายฝั่ง จังหวัดตรัง*. รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2551 – 2552.
- พัชรี ชุ่นสั้น, สามารณ เดชสถิตย์, พิกุล ไชยรัตน์ และ สมศักดิ์ จิระวัฑโฒ. 2550. การศึกษาการกระตุ้นการวางไข่ พัฒนาการของคัพภะและลูกหอยวัยอ่อนของหอยชักตีน (*Strombus canarium* Linnaeus, 1758). *เอกสารวิชาการฉบับที่ 8 /2550*, ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่, กรมประมง
- วันศุกร์ เสนานานู และจิราภรณ์ ไตรศักดิ์. 2551. *การประยุกต์ใช้พันธุศาสตร์ประชากรในการจัดการทรัพยากรประมง*. พันธุศาสตร์ประชากรเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และกองทุนสนับสนุนการทำวิจัย. กรุงเทพฯ.
- วีระเกียรติ ทรัพย์มี. 2558. โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของปลาตะกรับ (*Scatophagus argus*) ในภาคใต้ของประเทศไทย. *วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 10 (2) : 38 – 56.
- Antoro, S., U. Na-Nakorn and W. Koedprang. 2006. Study of genetic diversity of Orange- Spotted Grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers. *Marine Biotechnology*. 8: 17 -26.
- Avise, J.C. 1994. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Chapman and Hall, New York.
- Avise, J.C., G.S. Helfman, N.C. saunders and L.S. Hales. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 4350-4354.

- Ayala, F.J. 1982. *Population and Evolutionary Genetics: A Primer*. The Benjamin Cummings Pub. Co. Inc, California.
- Aungtonya, C., Thaipal, S. and 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.
- Bernal-Ramirez, J.H., G.J. Adcock, L. Hauser, G.R. Carvalho and P.J. Smith. 2003. Temporal stability of genetic population structure in the New Zealand snapper, *Pagrus auratus*, and relationship to coastal currents. *Mar. Biol.* 142: 567-574.
- Bowen, B.W., A.L. Bass, L.A. Rocha, W.S. Grant and D.R. Robertson. 2001. Phylogeography of the trumpetfishes (*Aulostomus*): ring species complex on a global scale. *Evolution*. 55: 1029-1039.
- Boore, J. L. 1999. Survey and summary animal mitochondria genome. *Nucleic acids research*. 27(8) : 1767-1780.
- Brante, A., Fernández, M. and Viard, F. 2012. Phylogeography and biogeography concordance in the marine Gastropod *Crepidatella dilatata* (Calyptraeidae) along the southeastern Pacific coast. *Journal of Heredity*. 103 (5): 630-637.
- Brown, W.M., E.M. Prager, A. Wang and A.C. Wilson. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates, tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18: 225-239.
- Bustillos, Z., R. Rodriguez-Canul, R. Garcia de Leon and J. Francisco. 2011. Genetic diversity in two populations of the snail *Strombus gigas* (Gastropoda: Strombidae) from Yucatan, Mexico, using microsatellite. *Revista de Biología Tropical* . 59 (3) : 1127-1134.
- Camill, P., C.E. Umbanhowar, R. Teed, C.E. Geiss, J. Aldinger, L. Dvorak, J. Kenning, J. Limmer and K. Walkup. 2003. Late-glacial and Holocene climatic effects on fire and vegetation dynamics at the prairie-forest ecotone in south-central Minnesota. *Journal of Ecology*. 91: 822-836.

- Cassone, B.J. and E.G. Boulding. 2006. Genetic structure and phylogeography of the lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes*, along the northeastern and western Pacific coasts. *Marine Biology*. 149: 213-226.
- Chiu, Y., Bor, H., Tan, M., Lin, H. and 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. and 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., and 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. and Stoner, A.W. 1993. A comparison of larval development, growth, and shell morphology in three Caribbean *Strombus* species. *Veliger*. 36: 236-244.
- Douzery, E. and E. Randi. 1997. The mitochondrial control region of Cervidae evolutionary patterns and phylogenetic content. *Mol. Biol. Evol.* 14: 1154-1166.
- Excoffier, L. and Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10 : 564-567.
- Frankham, R., Briscoe, D. A. and Ballou, J. D. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, New York, New York, USA.

- Fu, F.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147: 915-925.
- Ghivizzani, S., L.D. MacKay, C.S. Madsen, P.J. Laipis and W.W. Hauswirth. 1993. Transcribed heteroplasmic repeated sequences in the porcine mitochondrial DNA D-loop region. *J. Mol. Evol.* 37: 36-47.
- Gu, Q H., Husemann, M., Ding, B., Luo, Z and Xiong, B. X. 2015. Population genetic structure of *Bellamyaae ruginosa* (Mollusca: Gastropoda: Viviparidae) in China: weak divergence across large geographic distances. *Ecology and Evolution*. 5(21): 4906-4919.
- Guarniero, I., S. Franzellitti, N. Ungaro, S. Tommasini, C. Piccinetti and F. Tinti. 2002. Control region haplotype variation in the central Mediterranean common sole indicates geographical isolation and population structuring in Italian stocks. *J. Fish. Biol.* 60: 1459-1474.
- Guo, E., X. Li, Y. Liu, Y. Cheng and C.X. Wu. 2011. Genetic variation and population structure of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) inferred from mitochondrial control region. *Mol. Biol. Rep.* doi 10.1007/s11033-011-08823.
- Harpending, R. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*. 66: 591-600.
- Hoffman, E.A., N. Kolm, A. Berglund, J.R. Arguello and A.G. Jones. 2005. Genetic structure in the coral-reef-associated Banggai cardinal fish, *Pterapogon kauderni*. *Mol. Ecol.* 14: 1367-1375.
- Huang, X. and Madan, A. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Research*. 9: 868-877.
- Klinbunga, S., K. Khetpu, B. Khamnamtong and P. Menasveta. 2007. Genetic heterogeneity of the blue swimming crab (*Portunus pelagicus*) in Thailand determined by AFLP analysis. *Biochem. Genet.* 45: 725-736.

- Kyle, C. J. and 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. and Higgins, D.G. 2007. Sequence analysis ClustalW and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics Applications Note*. 23 (21): 2947-2948.
- Latiolais, J.M., Taylor, M.S., Roy, K. and Hellberg, M.E. 2006. A molecular phylogenetic analysis of strombid gastropod morphological diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 41: 436-444.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.
- Marquez, E., R. M. Landinez-Garcia, S. P. Ospina- Guerrero, J. A. Segura, M. Prada, E. Castro, J. Correa and C. Borda. 2012. Genetic Analysis of Queen Conch *Strombus gigas* from the Southwest Caribbean. In, **Proceedings of the 65th Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, November 5 – 9, 2012 Santa Marta, Colombia.
- Mitton J. B., C. J. Berg and K. S. Orr. 1989. Population Structure, Larval Dispersal, and Gene Flow in the Queen Conch, *Strombus gigas*, of the Caribbean. *Biol. Bull.* 177: 356-362.
- Mousset, S., N. Derome and M. Veuille. 2004. A neutrality test based on the mismatch distribution. *Mol. Biol. Evol.* 21 724-731.
- Nakthon, N. 1992. *Marine Territory of Thailand and Neighbouring Countries*. MSc.Thesis. Hydrograph Department. Royal Thai navy. Thailand.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York : Columbia University Press.

- Panithanarak, T. R. Karuwancharoen., U. Na-Nakorn. and T. T.T, Nguyen. 2010. Population genetics of the Spotted Seahorse (*Hippocampus kuda*) in Thai waters: Implications for Conservation. *Zoological Studies*. 49(4): 564-576
- Perez-Enriquez, R., F. J. Garcia-Rodriguez, G. Mendoza-Carrion and C. Padilla. 2011. Geographical variation in the genetic diversity and composition of the endangered Queen Conch *Strombus gigas* (Mesogastropoda: Strombidae) from Yucatán, México. *Rev. Biol. Trop.* 59 (3): 1115-1126.
- Phinchongsakuldit, J., P. Chaipakdee., J. F. Collins., M. Jaroensutasinee. and J. F. Y. Brookfield. 2013. Population genetics of cobia (*Rachycentron canadum*) in the Gulf of Thailand and Andaman Sea: fisheries management implications. *Aquacult Int.* 21:197–217.
- Planes, S., Doherty, P.J. and Bernardi, G. 2001. Strong genetic divergence among populations of a marine fish with limit 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., Hanyuda and, T. and 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. and Navarro, A. 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*. 179: 555-567.
- Rogers, A.R. and Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the Distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552-569.
- Roldan, M.I., M. Perrotta, R.G. Cortey and C. Pla. 2000. Molecular and morphologic approaches to discrimination of variability patterns in chub mackerel, *Scomber japonicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 253: 63-74.

- Roman, J. and S. R. Palumbi. 2004. A global invader at home : population structure of the green crab, *Crcinus maenas*, in Europe. *Molecular Ecology*. 13: 2891-2898.
- Sinsakul, S. 2000. Late Quaternary geology of the Lower Central Plain, Thailand. *Journal of Southeast Asian. Earth Science*. 18: 415-426.
- Slatkin, M. 1987. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*. 39(1): 53-65.
- Slatkin, M. and 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. and 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.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585-595.
- Tudela, S., J.L. Garcya-Marynn and C. Pla. 1999. Genetic structure of the European anchovy, *Engraulis crasicolus*, in the north-west Mediterranean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 234: 95-109.
- Watterson, G. A. 1984. Allele frequencies after a bottleneck. *Theoretical Population Biology*. 26: 387-407.
- Xu, Q., Liu, R. and 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. and 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.

ภาคผนวก

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละแฮปโลไทป์ของหอยชักตีนที่สุ่มมาจากแนวชายฝั่งทะเลภาคใต้

>H01

ATCAGTTAAAAGCATTTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAATTAACCTGCACCTAAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTTCATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

>H02

ATCAGTTAAAAGCATTTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAATTAACCTGCACCTAAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTTCATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

>H03

ATCAGTTAAAAGCATTTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAATTAACCTGCACCTAAAAATAGAAGGTACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTTCATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

>H04

ATCAGTTAAAAGCATTTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAATTAACCTGCACCTAAAAATAGAAGTTACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTTCATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

>H05

ATCAGTTAAAAGCATTTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAATTAACCTGCACCTAAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGCTCATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

>H06

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAACAGGTAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGATCATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

>H07

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAACAGGTAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTTATATTAGCGGAACTAACCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

>H08

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAACAGGTAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTATAACAAAAGCGTGAGCAGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

>H09

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAACAGGTAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCAGATTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

>H10

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAACAGGTAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

>H11

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
 TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
 AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
 AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
 GCTTTCGATAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
 TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
 TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
 ATCATCTCCCAATA

>H12

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
 TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
 AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
 AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
 GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
 TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
 TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
 ATCATCTCCCAATA

>H13

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
 TTTTCCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
 AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
 AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
 GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
 TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
 TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
 ATCATCTCCCAATA

>H14

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
 TTTTCCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
 AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
 AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
 GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
 TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
 TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
 ATCATCTCCCAATA

>H15

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
 TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
 AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
 AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGTTATACTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
 GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
 TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCCAGTTTCCAAAGCCACCAAT
 TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
 ATCATCTCCCAATA

>H16

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
 TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
 AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
 AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATCTACTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
 GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
 TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCAAGTTTCCAAAGCCACCAAT
 TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
 ATCATCTCCCAATA

>H17

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAATCAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
 TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
 AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
 AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
 GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
 TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCAAGTTTCCAAAGCCACCAAT
 TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
 ATCATCTCCCAATA

>H18

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
 TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
 AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
 AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
 GCTTTCGATAGCAGCAGATGAAAGTATTAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
 TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCAAGTTTCCAAAGCCACCAAT
 TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
 ATCATCTCCCAATA

>H19

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
 TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
 AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
 AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATAAACTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
 GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
 TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCAAGTTTCCAAAGCCACCAAT
 TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
 ATCATCTCCCAATA

>H20

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAAACAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
 TTTTCCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
 AGTAATAAAAATTAAGTGCACCTAAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
 AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
 GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCTTATATTATT
 TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCAAGTTTCCAAAGCCACCAAT
 TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
 ATCATCTCCCAATA

>H21

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAACAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTCCCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAATTAAGTGCACCTAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGCAAGTAATCAAATCCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCAAGTTTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

>H22

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAACAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAATTAAGTGCACCTAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGTTATAGTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCAAGTTTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

>H23

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAAACAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAATTAAGTGCACCTAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATCTACTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAAAGTAAGGCAGGAGGAAGTAATCAAATCCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCAAGTTTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

>H24

ATCAGTTAAAAGCATTGTAATAGCTCCAGCTAAATCAGGTAAAGAAAGTAATAAGAGCACAGCAGTAAT
TTTTACCGATCAAACAAATAAAGGAAGACGTTCAAATTGTATCCCTCGTCATCGCATATTAATAATTGT
AGTAATAAAATTAAGTGCACCTAAAATAGAAGATACACCAGCTAAGTGTAATGAAAAAATAGCCAGATC
AACTGAGCCTCCAGCATGAGCTAAATTTCCAGCTAGCGGAGGATATACTGTTTCATCCTGTACCAACTCC
GCTTTCGACAGCAGCAGATGAAAGTAATAATAGTAAGGCAGGAGGAAGAAATCAAATCCTTATATTATT
TAATCGAGGAAAAGGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGCGGAACTAACCAAGTTTCCAAAGCCACCAAT
TATTATAGGCATAACTAAGAAAAAAATTATAACAAAAGCGTGAGCTGTAACAATTACATTGTATAATTG
ATCATCTCCCAATA

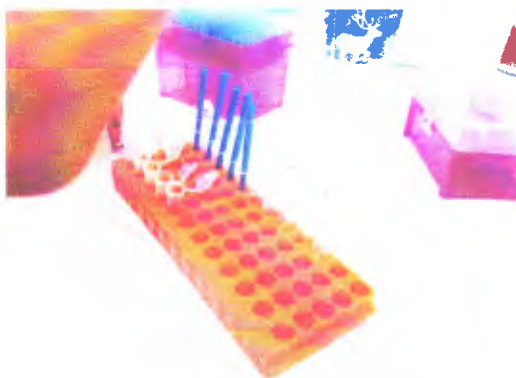
ภาพภาคผนวก



การบ่มเนื้อหอยสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ



ตัวอย่างเนื้อในหลอดทดลอง



การสกัดดีเอ็นเอ



การบดเนื้อเชื้อ

ภาพภาคผนวกที่ 1 การจัดการตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ



เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม



การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม



การแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า



การย้อมสีดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

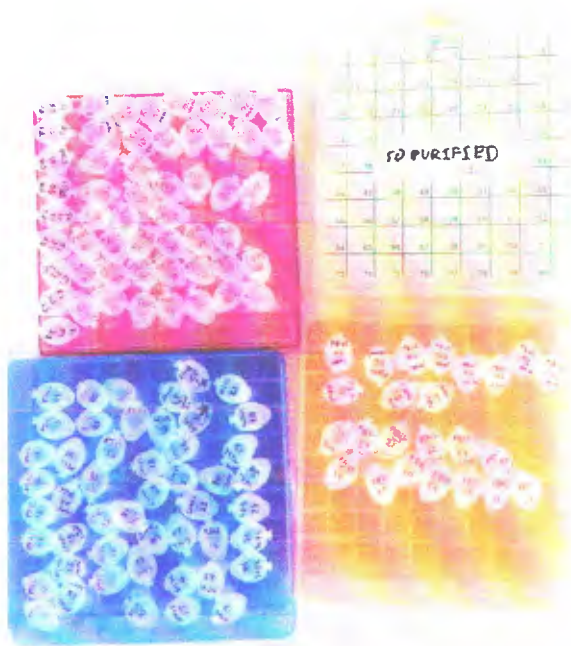


เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอ

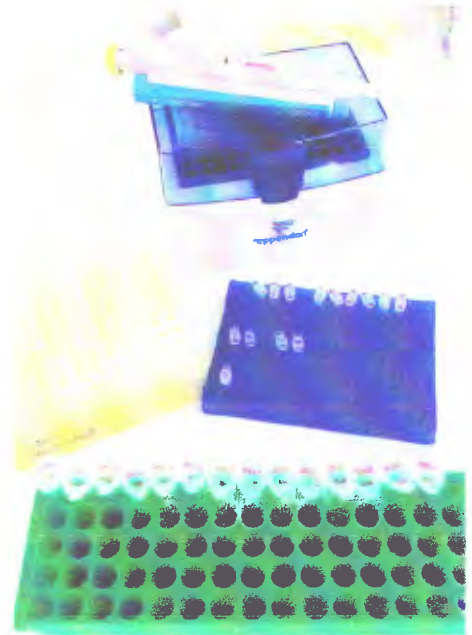


ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส

ภาพภาคผนวกที่ 2 การเพิ่มปริมาณและการตรวจสอบดีเอ็นเอ



ตัวอย่างดีเอ็นเอที่รอการทำให้บริสุทธิ์



การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์



การเตรียมตัวอย่างเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์



ตัวอย่างดีเอ็นเอที่พร้อมส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์



ผลลำดับนิวคลีโอไทด์อ่านโดยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor

ภาพภาคผนวกที่ 3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์และการส่งตัวอย่างเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์