ธนพันธุ์ ปัทมานนท์ : ลักษณะความแตกต่างของเปลือกและความแปรผันทางพันธุกรรมของหอยทากยักษ์แอฟริกา *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) ที่พบในประเทศไทย (SHELL MORPHOLOGICAL DIFFERENCES AND GENETIC VARIATION OF THE GIANT AFRICAN SNAIL *ACHATINA FULICA* (BOWDICH, 1822) IN THAILAND) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.พอล เจ โกรดิ, 226 หน้า.
ISBN 974-533-435-9

เก็บตัวอย่างหอยทากยักษ์แอฟริกา (*Achatina fulica*) (Gastropoda: Achatinidae) จำนวน 215 ตัว จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย 9 แห่ง และประเทศมาเลเซีย 1 แห่ง รวม 10 แห่ง ทำการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยวิธี polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) กับยีน cytochrome oxidase subunit I (COI_{710}) ที่มีความยาว 710 ลำดับเบส วิธี single strand conformational polymorphism (SSCP) กับยีน COI_{215} ที่มีความยาว 215 ลำดับเบส และยีน PMX และวิธี randomly amplified polymorphism DNA (RAPD) ผลการวิเคราะห์ด้วย 3 วิธีแรก พบว่า หอยทากยักษ์แอฟริกาในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรม แต่ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด ได้แก่ OPA02 OPA17 OPB11 และ OPZ09 ให้แถบ ดีเอ็นเอ ทั้งสิ้น 22 รูปแบบ โดยมีแถบดีเอ็นเอ ทั้งหมด จำนวน 117 แถบ ที่มีความยาว 200-1,700 ลำดับเบส โดยมีจำนวน 72 แถบ คิดเป็นร้อยละ 61.54 ที่ให้ผลเป็น polymorphic ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เฉลี่ยของทุกไพรเมอร์ มีค่าระหว่าง 0.0317-0.1378. พบแถบดีเอ็นเอ 14 แถบ จากการวิเคราะห์ด้วย ไพรเมอร์ OPB11 ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) ในกลุ่มตัวอย่างหอยทั้งหมดที่ทำการศึกษา เมื่อพิจารณาในระดับกลุ่มประชากร พบว่าไพรเมอร์ OPB11 ให้ผลว่า หอยทากที่จังหวัดสงขลามีความแตกต่างจากหอยทากจากแหล่งอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.001) ซึ่งผลนี้ ชี้ให้เห็นว่า gene pool ของหอยทากยักษ์แอฟริกาในประเทศไทยได้มีการแบ่งแยกการผสมพันธุ์แล้ว ผลจากการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ neighbor-joining ด้วยข้อมูลของ RAPD สามารถอธิบายเส้นทางการกระจายของหอยทากยักษ์แอฟริกาในประเทศไทยได้ โดยผลชี้ให้เห็นว่าหอยทากยักษ์แอฟริกาได้ถูกนำเข้าจากประเทศมาเลเซียมาที่ จังหวัดสงขลาเป็นแห่งแรก ก่อนที่จะกระจายไปส่วนอื่นของประเทศไทย และหอยทากยักษ์แอฟริกา ที่จังหวัดนครราชสีมา อาจถูกนำมาโดยตรงจากประเทศมาเลเซีย

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวเนื่องกับความเครียดโดยวิธี RNA arbitrary primed polymerase chain reaction (RAP-PCR) ในหอยทดลองสามกลุ่ม คือ กลุ่มหอยปกติ กลุ่มกึ่งจำศีลฤดูร้อน (partial aestivation) และกลุ่มจำศีลฤดูร้อน (full aestivation) ได้ทำการโคลน

(clone) และหาลำดับเบสจากแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกต่างกัน จำนวน 7 แถบ มีเพียง 3 แถบ ที่ตั้งชื่อว่า AFRAP2/228410 AFRAP9/138350 และ AFRAP9/138470 ที่สามารถนำมาศึกษาระดับการแสดงออกของยีนได้ นอกจากนั้นยังศึกษาระดับการแสดงออกของยีน achacin (ยีนสร้างโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น antibacterial peptide) ผลการศึกษาด้วยวิธี semiquantitative PCR พบระดับของการแสดงออกที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างหอยปกติ หอยกึ่งจำศีลฤดูร้อนและหอยจำศีลฤดูร้อน ($P<0.05$) การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวเนื่องกับความเครียด ในหอยทากยักษ์แอฟริกา อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของหอย และอาจเป็นสาเหตุของการตาย เมื่อหอยอยู่ในสภาวะจำศีลฤดูร้อนต่อเนื่องเป็นเวลานาน

สาขาวิชาชีววิทยา
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนักศึกษา Tanapan Pattamm
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Paul J. Krause
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม S. Upatham
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Vitaya Lawhavinda

TANAPAN PATTAMARNON : SHELL MORPHOLOGICAL DIFFERENCES AND GENETIC VARIATION OF THE GIANT AFRICAN SNAIL *ACHATINA FULICA* (BOWDICH, 1822) IN THAILAND. THESIS ADVISOR : PAUL J. GROTE, Ph.D. 226 PP. ISBN 974-533-435-9

GENETIC VARIATION/ *ACHATINA FULICA*/ MORPHOMETRIC/ STRESS RELATED GENE EXPRESSION

The giant African snail, *Achatina fulica*, (Gastropoda: Achatinidae) was collected from 10 geographic locations in Thailand and Malaysia (N=215) and analyzed by morphometrics of the shell, polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of a 710 bp fragment of cytochrome oxidase subunit I (COI_{710}), single strand conformational polymorphism (SSCP) of COI_{215} and PMX and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Results from the first techniques revealed limited genetic diversity and a lack of genetic heterogeneity of *A. fulica* in Thailand. In contrast, RAPD-PCR using four primers (OPA02, OPA17, OPB11, and OPZ09) generated 117 scorable bands (200-1700 bp), 72 of which (61.54%) were polymorphic. Twenty-two RAPD patterns (4, 6, 6, and 6 patterns, respectively) were observed. The average genetic distance across all primers ranged from 0.0317-0.1378. Fourteen fragments generated from OPB11 illustrated significant genetic heterogeneity across all samples (P<0.01). At the population level, OPB11 revealed significant genetic differences between Songkhla and each of the remaining samples (P<0.001). This indicated that the *A. fulica* gene pool in Thailand is reproductively isolated. A neighbor-joining tree based on RAPD analysis implied a possible route of distribution of *A. fulica* in Thailand. Genetic heterogeneity and

phylogenetic analysis suggested that *A. fulica* may have been initially introduced to Songkhla before subsequent distribution to other places in Thailand anthropologically. In addition, the phylogenetic tree suggested that *A. fulica* in Nakhon Ratchasima may have been directly introduced from Malaysia.

Stress-related transcripts were isolated from normal, partially aestivated and fully aestivated *A. fulica*. RNA arbitrary prime polymerase chain reaction (RAP-PCR) was used to determine the expression levels. Seven differentially displayed RAP bands were cloned and sequenced, three of which (AFRAP2/228410, AFRAP9/138350 and AFRAP9/138470) were successfully amplified. Expression levels of these transcripts and an achacin gene (an antibacterial peptide previously reported in *A. fulica*) were semiquantitatively examined. Results indicated significant differences in expression levels of these transcripts between normal and stressed snails ($P<0.05$). Fluctuations of gene expression in response to stress conditions of *A. fulica* may cause serious physiological changes resulting in high mortality of snails if the aestivation process is prolonged.

School of Biology

Academic Year 2004

Student's Signature Tanapan Pattamm

Advisor's Signature Paul J. Grote

Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature Nitaya Kawbachinda