บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4980146

ชื่อโครงการ: ความหลากหลายของชนิดและเครื่องหมายพันธุกรรมปูแดงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย: ผศ.ดร.บังอร แถวโนนงิ้ว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม; ttbungorn@hotmail.com และ ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ; sirawut@biotech.or.th

ระยะเวลาโครงการ :1 ก.ค. 2549- 30 มิ.ย.2552

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อจัดจำแนกชนิดปูแดงที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและโกโนพอด พบว่าสามารถจัดจำแนกได้เฉพาะเพศผู้เท่านั้นคือ *P. thatphanom*, *P. mukdahan*, *P. sakonnakorn* และ *P. wanonniwat* และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP และ RAPD-PCR โดยสกัดดีเอ็นเอจากก้ามหนีบของปู จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ LSU2-4 แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม(คัดเลือกจาก 13 เอนไซม์) 3 ชนิด คือ *Dde*I, *Alu*I, และ *Taq*I ผลการตัดด้วย *Dde* I, *Alu* I และ *Taq* I พบรูปแบบการตัดของปูแดงทั้งหมดเป็นแบบ B (220, 200 และ 100 bp), A (320 และ 220 bp) and B (185,170 และ 165 bp) ตามลำดับ ซึ่งพบcomposite haplotype แบบเดียวคือ BAB เมื่อนำรูปแบบการตัดมาหาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.1 สามารถแบ่งกลุ่มปูออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มปูนา *Esanthelphusa* (ตัวเปรียบเทียบ) และกลุ่มปูแดง *Pudaengon* ทั้งสองกลุ่มมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.44 ส่วนปูแดง 4 ชนิด มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 1.00 ซึ่งสอดคล้องกับผลการหาลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกันมาก สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 114 แถบ ซึ่งมีขนาด 200-2230 bp ค่าความหลากสภาวะรูปแบบเมื่อใช้ 3 ไพรเมอร์ (OPB07, UBC122 และ UBC138) เท่ากับ 66.66, 66.66, 82.14, 95.23 และ100 เปอร์เซ็นต์ ใน *P. mukdahan*, *P. wanonniwat*, *P. sakonnakorn*, *P. thatphanom* และ *Esanthelphusa* spp. ตามลำดับ และพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดในปูแดงเมื่อนำไปหาลำดับเบสแล้วออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะชนิด แล้วทดสอบความจำเพาะพบว่ามีเพียง 2 ไพรเมอร์ คือ WN1_UBC122 และ NK12_OPB07 ที่จำเพาะต่อปูแดง *P. wanonniwat* และ ปูแดง *P. thatphanom* เท่านั้น ตามลำดับ นอกจากนี้สามารถสร้าง dendrogram จาก 3 ไพรเมอร์ เพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปูแดงพบว่า *P. sakonnakorn* และ *P. wanonniwat* มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.80 ส่วน *P. mukdahan* และ *P. thatphanom* มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.83 ซึ่งจากผลการทดลองนี้สามารถใช้ยืนยันการจัดจำแนกปูแดงได้

คำหลัก: ปูแดง เครื่องหมายพันธุกรรม

Abstract

Project Code : MRG4980146

Project Title : Species Diversity and Molecular Markers of *Pudaengon* spp. in North Eastern Thailand

Investigator: Assistant Professor Dr.Bungorn Thaewnon-ngiw; Department of Biology, Faculty of Science, Mahasara Kham University, Mahasara Kham; ttbungorn@hotmail.com and Dr.Sirawut Klinbunga; Marine Biotechnology Research Unit, BIOTEC, NSTDA, 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand; sirawut@biotech.or.th

Project Period : 1 July 2006- 30 June 2009

The genetic diversity and taxonomic identification of *Pudaengon* spp. in the Northeast of Thailand, were determined. Male crabs were used to classify the specimens to the species level using the characters of external morphology and gonopods. The species identified were *P. thatphanom*, *P. mukdahan*, *P. sakonnakorn* and *P.wanonniwat*. The genetic diversity of these four species was determined using restriction analysis of the large subunit of ribosomal DNA. DNA was extracted from the chelae of each crab and was amplified with the LSU 2-4 primers. The PCR products were digested with three restriction enzymes (*Dde* I, *Alu* I and *Taq* I) out of thirteen possible restriction enzymes that were screened. The results showed that all four *Pudaengon* species exhibited pattern B (220, 200 and 100 bp), A (320 and 220 bp) and B (185,170 and 165 bp), respectively. Only one composite haplotype (BAB) was found. When the UPGMA dendrogram of three enzymes was analyzed using NTSYSpc version2.10p and found that the similarity coefficient of all *Pudaengon* species was 1.00, which could be compared to *Esanthelphusa* sp. of 0.44. These results were supported by DNA sequence results which showed high similarity between the sequences. For RAPD study, three (OPB07, OPB15 and UBC122) oligonucleotide primers were selected out of fifteen that were screened. This result showed one hundred and fourteen reproducible and polymorphic bands (200-2230 bp in length). The percentages of polymorphic bands were 66.66, 66.66, 82.14, 95.23 and 100 % for *P. mukdahan*, *P. wanonniwat*, *P. sakonnakorn*, *P. thatphanom* and *Esanthelphusa* sp, respectively. The candidate species specific markers for some crabs from each primer were eluted from gel, amplified and sequenced. SCAR markers were designed and tested for species specificity. The expected product of two new primers (WN1_UBC122 and NK12_OPB07) was specifically found in only *P. wanonniwat* (N=20) and *P. thatphanom*, (N=20) respectively.The similarity coefficient between *P. sakonnakorn* with *P. wanonniwat* from dendrogram of three primers was 0.80 whereas *P. mukdahan* with *P. thatphanom* was 0.83. This molecular study confirmed the external morphology taxonomy of *Pudaengon* spp.

Keywords: *Pudaengon* spp., molecular genetic marker