



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การจำแนกชนิดปลาและลูกผสมในกลุ่ม Pangasiidae ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

ดร. เกตุณภัส ศรีไพโรจน์

16 มิถุนายน 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การจำแนกชนิดปลาและลูกผสมในกลุ่ม Pangasiidae ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร.เกตุณัฏฐ์ ศรีไพโรจน์

คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยพะเยา

2. ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร

ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการศึกษาครั้งนี้ภายใต้ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (MRG5280138) ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด โรงเพาะฟักเอกชน ผู้ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่าง และช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างทุกท่าน

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG5280138

(รหัสโครงการ)

Project Title : การจำแนกชนิดปลาและลูกผสมในกลุ่ม Pangasiidae ด้วยเทคนิค PCR-RFLP
(ชื่อโครงการ)

Investigator : ดร.เกตุณภัส ศรีไพโรจน์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ
(ชื่อนักวิจัย) มหาวิทยาลัยพะเยา

E-mail Address : ssriphairoj@hotmail.com

Project Period : 3 ปี 3 เดือน
(ระยะเวลาโครงการ)

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีการจำหน่ายผลิตภัณฑ์ของปลาในครอบครัว Pangasiidae อย่างกว้างขวาง การจำแนกผลิตภัณฑ์เหล่านี้จึงมีความสำคัญ นอกจากนี้การจำแนกปลาวัยอ่อนและลูกผสมโดยใช้ลักษณะภายนอกมีข้อจำกัด จึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมที่สามารถใช้งานง่าย และมีความถูกต้องสำหรับจำแนกชนิดปลาในครอบครัว Pangasiidae เทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ของยีน mtDNA 16s rRNA และ Igm ได้รับการพัฒนาเพื่อจำแนกชนิดปลาในครอบครัว Pangasiidae จำนวน 6 ชนิด การจำแนกปลาโตเต็มวัยและลูกปลาสามารถทำได้โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (mtDNA 16s rRNA) ของปลาทั้ง 6 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ 16Sar และ 16Sbr และนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tsp509I*, *HincII* และ *MfeI* เอนไซม์ *Tsp509I* สามารถจำแนกปลาได้เป็น 2 กลุ่ม และ 2 ชนิด คือ กลุ่ม 1 ปลาน้ำจืดและปลาสวาย กลุ่ม 2 ปลาเทโพและปลาเทพา ชนิดที่ 1 คือปลาโม่ง และชนิดที่ 2 คือปลาสายยู ส่วนเอนไซม์ *HincII* และ *MfeI* ใช้จำแนกปลาน้ำจืดกับปลาสวายและปลาเทโพกับปลาเทพา ตามลำดับ การจำแนกลูกผสมทำได้โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Igm) โดยใช้ไพรเมอร์ในส่วนของยีน immunoglobulin M heavy chain และนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* และ *TaqI* ลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาน้ำจืดและระหว่างปลาสวายกับปลาเทโพสามารถจำแนกได้ด้วยเอนไซม์ *TaqI* ส่วนลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาโม่งจำแนกได้ด้วยเอนไซม์ *PstI* ควรมีการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับจำแนกลูกผสมเพิ่มเติมสำหรับการจำแนกลูกผสมที่เกิดจากการผสมกลับกับชนิดพ่อแม่หรือชนิดแม่

Keywords : ปลาน้ำจืด ปลาสวาย PCR-RFLP

(คำหลัก)

ABSTRACT

Nowadays, the product of Pangasiids catfishes are distributed worldwide. The authentication of these products is economically important. In addition, the limitation of larvae and hybrid identification base on morphology, the clear and simple molecular markers are needed. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of the mitochondrial 16S rRNA and nuclear immunoglobulin M heavy chain (Igm) gene were developed for identification of fish, larvae and hybrids of six species in family Pangasiidae. Identification of six Pangasiid species and their larvae was achieved using PCR-RFLP of the mitochondrial 16S rRNA. DNA samples of each of six species and their larvae were amplified using 16Sar and 16Sbr primers and the PCR products were cut with three selected restriction endonucleases (*Tsp509I*, *HincII* and *MfeI*). *Tsp509I* separates the six species into 2 groups and 2 species (group 1 = *P. gigas* and *P. hypophthalmus*, group 2= *P. larnaudii* and *P. sanitwongsei*, the first species is *P. bocourti*, the second species is *P. conchophilus*). *HincII* and *MfeI* could be used to discriminate *P. gigas* and *P. hypophthalmus* and *P. larnaudii* and *P. sanitwongsei*, respectively. The restriction digest of the PCR product of nuclear Igm gene by enzyme *TaqI* and *PstI* allowed the clear distinction of four species (*P. gigas*, *P. hypophthalmus*, *P. larnaudii* and *P. bocourti*) and their hybrid. Hybrids of *P. hypophthalmus* x *P. gigas* and *P. hypophthalmus* x *P. larnaudii* could be identified using *TaqI*. Hybrids of *P. hypophthalmus* x *P. bocourti* could be identified using *PstI*. More molecular marker are a necessity for identification the backcross hybrids.

Keywords: *Pangasius*, *Pangasianodon*, PCR-RFLP

บทนำ

ปลาในครอบครัว Pangasiidae เป็นปลาที่มีความสำคัญในประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปัจจุบันปลากลุ่มนี้โดยเฉพาะปลาสวายเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก ในประเทศเวียดนามการเพาะเลี้ยงและส่งออกปลาสวายในรูปแบบของเนื้อแล้มีปริมาณและมูลค่าสูงขึ้นมาก โดยมูลค่าการส่งออกปลาชนิดนี้ในปี 2551 มีถึง 1.6 ล้านล้านดอลลาร์สหรัฐ (Hau, 2008) นอกจากในแง่ของการเพาะเลี้ยงแล้ว ปลากลุ่มนี้ยังมีความสำคัญทั้งในแง่ของการอนุรักษ์ ตลอดจนเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญสำหรับการบริโภคของประชาชน โดยเฉพาะในแถบลุ่มน้ำโขง

โดยทั่วไปการจำแนกปลาในครอบครัว Pangasiidae นั้นสามารถใช้การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน (Roberts and Vidthayanon, 1991) ได้ แต่ในปลายวัยอ่อนการพัฒนาการการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานยังไม่ครอบคลุมทุกชนิดในวงศ์ Pangasiidae (อภิรดี และคณะ, 2553) และการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานนั้น บางลักษณะจำเป็นต้องผ่าดูอวัยวะภายใน เช่น ลักษณะของเหงือก กระเพาะลม จำเป็นต้องมีการผ่าปลา ทำให้เกิดข้อจำกัดในการใช้ลักษณะทางอนุกรมวิธานจัดจำแนกปลากลุ่มนี้ นอกจากนี้ปัจจุบันการผสมข้ามพันธุ์ (hybridization) ระหว่างปลาในครอบครัว Pangasiidae ได้รับความสนใจในการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลาย เช่น การผสมข้ามระหว่างปลาสวายกับปลาบึก (Mongkonpanya et al., 1996) ปลาสวายกับปลาโมง (Annop, per.com) ปลาสวายผสมกับปลาเทโพ (อภิรดี และคณะ, 2553) เป็นต้น ซึ่งปลาลูกผสมเหล่านี้มีลักษณะภายนอกที่แสดงออกต่าง ๆ กัน ตามสัดส่วนพันธุกรรมที่ได้รับจากปลาแต่ละชนิด และอาจมีลักษณะใกล้เคียงกับชนิดพ่อหรือแม่มากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ชัดเจนด้วยการศึกษาจากลักษณะภายนอก (อภิรดี และคณะ, 2553) การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมจึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยจำแนกชนิดปลาได้อย่างชัดเจน และมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องผ่าปลา ใช้ตัวอย่างในการทดสอบเพียงเล็กน้อย และสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแปรรูป เช่น เนื้อแล้ ได้ด้วย

การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับจำแนกชนิดปลาครอบครัว Pangasiidae มีการพัฒนาเทคนิค Single Stranded Conformation Polymorphism (SSCP) สำหรับใช้จำแนกปลากลุ่มนี้ (Sriphairoj et al., 2010) แต่เนื่องจากเทคนิค SSCP จำเป็นต้องใช้อะครีลาไมด์เจลในการตรวจสอบความหลากหลายรูปแบบของผลผลิตพีซีอาร์ และต้องการเวลาในการวิเคราะห์มากกว่าการใช้อะกาโรสเจลเพียงอย่างเดียวตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ซึ่งเทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) นั้นเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดหนึ่งที่ไม่ยุ่งยากในการวิเคราะห์ ใช้เวลาน้อย เสียค่าใช้จ่ายไม่แพง (Hashimoto et al., 2010) ใช้สำหรับการจำแนกชนิดปลา ปลาวัยอ่อน ลูกผสม รวมถึงตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแปรรูปได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Thongpan et al., 1997; Lindstrom, 1999; Khamnamtong et al., 2005; Ishizaki et al., 2006; Hashimoto et al., 2010)

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม PCR-RFLP สำหรับใช้แยกชนิดปลาในครอบครัว Pangasiidae ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจำนวน 6 ชนิด ประกอบด้วย ปลาบึก

(*Pangasianodon gigas*) ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) ปลาโม่ง (*Pangasius bocourti*) ปลาสายยู (*Pangasius conchophilus*) ปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) และปลาเทพา (*Pangasius sanitwongsei*) และลูกผสมระหว่างปลาในครอบครัว Pangasiidae ประกอบด้วย ลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาบึก และปลาสวายกับปลาโม่ง ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมที่พัฒนาได้จะมีประโยชน์สำหรับการจัดจำแนกชนิดปลา ปลาไว้อ่อน ลูกผสม และผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแปรรูป ของปลาในครอบครัว Pangasiidae

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างปลาที่ทราบชนิดแน่นอนจำนวน 6 ชนิด จำนวนตัวอย่างดังนี้ ปลาบึกจำนวน 46 ตัวอย่าง ปลาสวายจำนวน 37 ตัวอย่าง ปลาโม่งจำนวน 38 ตัวอย่าง ปลาสายยูจำนวน 23 ตัวอย่าง ปลาเทโพจำนวน 51 ตัวอย่าง ปลาเทพาจำนวน 51 ตัวอย่าง ตัวอย่างในการศึกษาเป็นปลาธรรมชาติ และจากโรงเพาะฟัก จากหลายแหล่งเก็บตัวอย่าง (รายละเอียดแหล่งเก็บตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 1 และภาพที่ 1) สำหรับลูกปลาวัยอ่อนเป็นตัวอย่างปลาที่เพิ่งฟักไม่เกิน 1 สัปดาห์ ประกอบด้วยลูกปลาบึกจำนวน 28 ตัวอย่าง จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดเชียงใหม่ ลูกปลาสวายและปลาเทโพชนิดละจำนวน 6 ตัวอย่าง จากธนาคารดีเอ็นเอ กรมประมง ลูกปลาโม่งจำนวน 11 ตัวอย่าง จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดสกลนคร และลูกปลาเทพาจำนวน 41 ตัวอย่างจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดพะเยา ส่วนลูกปลาสายยูไม่สามารถหาตัวอย่างได้

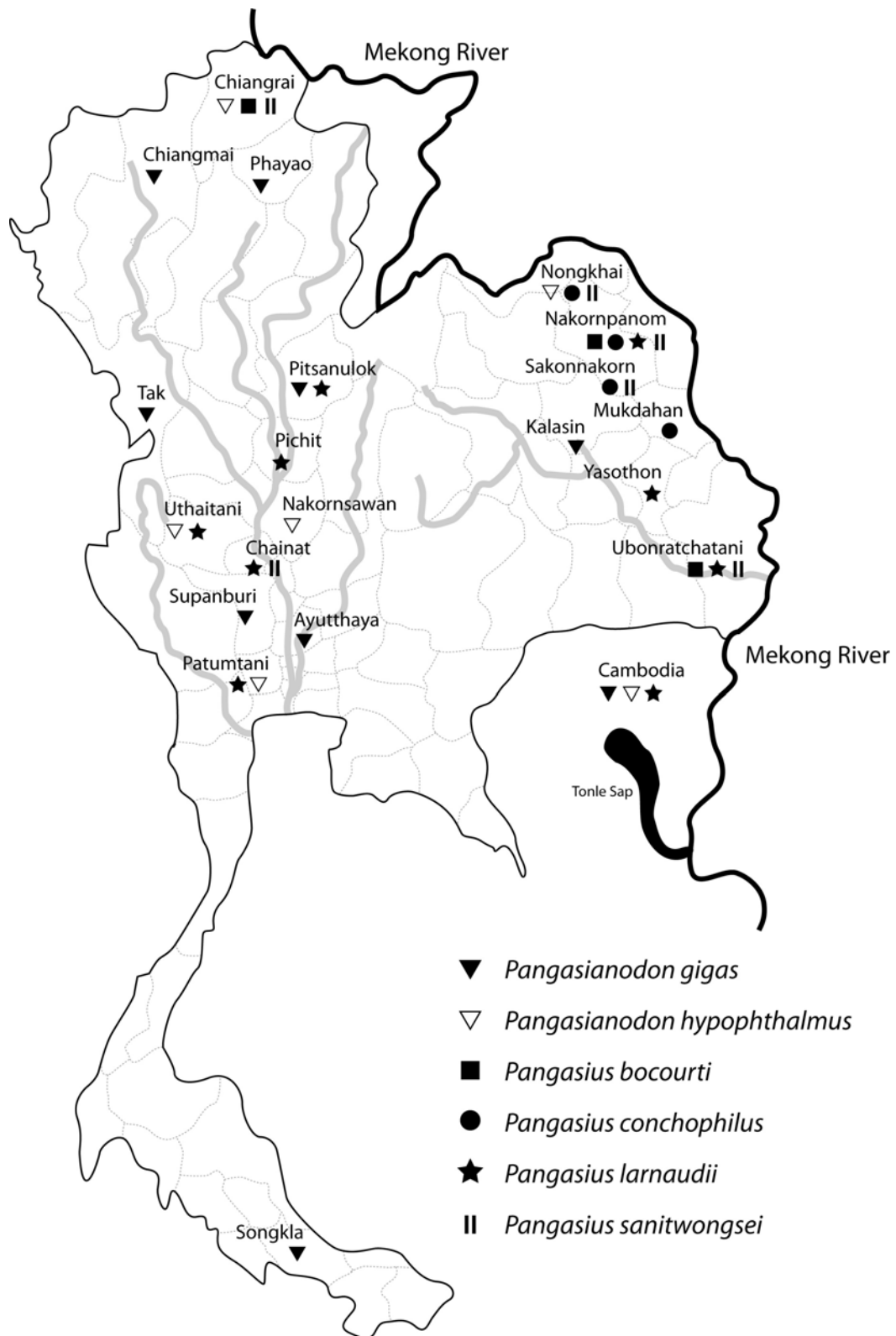
ตัวอย่างลูกผสมที่นำมาวิเคราะห์ในการศึกษานี้ประกอบไปด้วย ลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาบึก (*P. hypophthalmus* x *P. gigas*) จำนวน 10 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างจากโรงเพาะฟักเอกชน ลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาโม่ง (*P. hypophthalmus* x *P. bocourti*) จำนวน 20 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดสกลนคร และตัวอย่างซึ่งไม่ทราบแน่นอนว่าเป็นลูกผสมระหว่างปลาชนิดใด เนื่องจากตัวอย่างไม่สมบูรณ์ จำนวน 47 ตัวอย่าง แหล่งเก็บตัวอย่างคือตลาดสดในจังหวัดอุบลราชธานี ข้อมูลเบื้องต้นจากการสอบถามแม่ค้าทราบว่าเป็นปลาจากโรงเพาะฟักเอกชน เป็นลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาเทโพ (*P. hypophthalmus* x *P. larnaudii*) และลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาสายยู (*P. hypophthalmus* x *P. conchophilus*)

เก็บตัวอย่างครีบล้างทั้งหมดไว้ในเอทานอล 100% สกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Tagaart และคณะ (1992) ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

ตารางที่ 1 แหล่งเก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างของปลาทั้ง 6 ชนิด

Origin	Locality	Sample size
<i>Pangasianodon gigas</i>		
	Inland Fisheries Research Institute, Ayutthaya Province	1
	Chiangmai Inland Fisheries Research and Development Centre	14
	Phayao Inland Fisheries Research and Development Centre	5
	Pitsanulok Inland Fisheries Research and Development Centre	7
	Kalasin Inland Fisheries Station	4
	Tak Inland Fisheries Research and Development Centre	5
	Songkla Inland Fisheries Research and Development Centre	5
	Hatchery, Chaomudcha Farm, Supanburi Province	3
	Tonle Sap, Cambodia	2
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>		
	Nongkhai Inland Fisheries Research and Development Centre	5
	Sakaekrang River, Uthaitani Province	6
	Patumtani Province	9
	Chiangrai Province	3
	Tonle Sap, Cambodia	3
	Hatchery, Narong Farm, Nakornsawan Province	11
<i>Pangasius bocourti</i>		
	Nakornpanom Province	32
	Chiangrai Province	4
	Ubonratchatani Province	2
<i>Pangasius conchophilus</i>		
	Mukdahan Province	4
	Nongkhai Province	10
	Nakornpanom Province	3
	Sakonnakorn Inland Fisheries Research and Development Centre	6

Species	Locality	Sample size
<i>Pangasius larnaudii</i>	Nakornpanom Province	2
	Khongjiem, Ubonratchatani Province	7
	Hatchery, Ubonratchatani Province	2
	Yasothon Province	6
	Mekong River, Cambodia	5
	Pitsanulok Province	6
	Pichit Province	7
	Uthaitani Province	3
	Chainat Province	9
	Patumtani Province	4
<i>Pangasius sanitwongsei</i>	Nongkhai Inland Fisheries Research and Development Centre	10
	Nakornpanom Province	14
	Khongjiem, Ubonratchatani Province	4
	Sakonnakorn Inland Fisheries Research and Development Centre	10
	Chiangrai Province	6
	Chainat Province	7



ภาพที่ 1 แหล่งเก็บตัวอย่างของปลาทั้ง 6 ชนิด

2. การคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับจำแนกปลา Pangasiids 6 ชนิด

จัดเรียงลำดับเบสของยีน 16S rRNA mtDNA ของปลา 6 ชนิด จำนวนทั้งหมด 42 haplotypes (Na-Nakorn et al., 2006) ด้วยโปรแกรม ClustalW (Thompson et al., 1994) หาจุดตัดที่แตกต่างกันของเอนไซม์แต่ละชนิด เลือกเอนไซม์ที่จะนำมาใช้ด้วยโปรแกรม NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003) ตรวจสอบจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่คัดเลือกอีกครั้งโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ mt-DNA 16S rRNA ในปลาทั้ง 6 ชนิด ชนิดละ 3 ตัวอย่าง ไพรมเมอร์ที่ใช้คือ 16Sar 5' CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT 3' และ 16Sbr 5' CCG GTC TGA ACT CAG ATC ATG T 3' (Palumbi et al., 1991) ในปฏิกิริยา 20 μ l ประกอบไปด้วยดีเอ็นเอเทมเพลต 40 ng ไพรมเมอร์สายละ 0.25 μ M 1X PCR buffer 1.0 mM MgCl₂ 200 μ M dNTPs และ 1 unit DyNAzyme™ II DNA polymerase (Fermentas) ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, INC.) โดยใช้รอบอุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที 1 รอบ ตามด้วยวงจรปฏิกิริยาที่ 94°C นาน 1 นาที 52°C นาน 1 นาที และที่ 72°C นาน 1 นาที รวมทั้งสิ้น 30 รอบ และ 72°C นาน 5 นาที 1 รอบ นำผลผลิตพีซีอาร์ไปหาลำดับเบสและตรวจสอบจุดตัดของเอนไซม์ที่คัดเลือกอีกครั้ง

3. การวิเคราะห์ RFLP ของ mtDNA 16S rRNA

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ mtDNA 16S rRNA ของปลาโตเต็มวัย 6 ชนิด และลูกปลา 5 ชนิด (ปลาน้ำจืด ปลาหมอ ปลาเทโพ และปลาเทพา) โดยใช้สภาวะพีซีอาร์และไพรมเมอร์ตามวิธีการในข้อ 2 จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่คัดเลือกไว้ ในปฏิกิริยา 10 μ l ประกอบด้วยผลผลิต PCR จำนวน 3.33 μ l fast digest buffer 0.67 μ l fast digest enzyme 0.33 μ l และน้ำ 5.67 μ l อุณหภูมิและเวลาในการบ่มทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์แต่ละชนิด (Fermentas) ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วย 2% อะกาโรสเจล ตรวจสอบผลด้วยการย้อม Ethidium bromide ปลาแต่ละชนิดจะแสดงแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่ต่างกันออกไป

4. การคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับจำแนกลูกผสม

นำดีเอ็นเอของปลา 5 ชนิด ประกอบไปด้วยปลาน้ำจืด (*Pangasianodon gigas*, N=9) ปลาน้ำจืด (*Pangasianodon hypophthalmus*, N=9) ปลาหมอ (*Pangasius bocourti*, N=9) ปลาน้ำจืด (*Pangasius conchophilus*, N=7) และปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*, N=9) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ยีน immunoglobulin M heavy chain ซึ่งไพรมเมอร์ที่ใช้เป็นไพรมเมอร์ที่พัฒนามาจากยีนส่วน CH₄ exon ของ immunoglobulin M heavy chain gene ในปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (5' TCC CCA AGG TTT ACT TGC TCG CTC C 3' และ 5' CGA TGG ATC TGG ATA TGT GGC GCA C 3') (Thongpan et al., 1997) ในปฏิกิริยา 10 μ l ประกอบไปด้วยดีเอ็นเอเทมเพลต 10 ng ไพรมเมอร์สายละ 0.25 μ M 1X PCR buffer 2 mM MgCl₂ 200 μ M dNTPs และ 1 unit DyNAzyme™ II DNA polymerase (Fermentas) ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง PTC-100TM Programmable Thermal Controller

(MJ Research, INC.) โดยใช้รอบอุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที 1 รอบ ตามด้วยวงจรปฏิกิริยาที่ 95°C นาน 30 วินาที 62°C นาน 30 วินาที และที่ 72°C นาน 30 วินาที รวมทั้งสิ้น 30 รอบ และ 72°C นาน 3 นาที 1 รอบ นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปหาลำดับเบสและจัดเรียงลำดับเบสด้วยโปรแกรม ClustalW (Thompson et al., 1994) หาจุดตัดที่แตกต่างกันของเอนไซม์แต่ละชนิด เลือกเอนไซม์ที่จะนำมาใช้ด้วยโปรแกรม NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003)

5. การวิเคราะห์ RFLP ของยีน immunoglobulin M heavy chain gene (Igm gene)

นำดีเอ็นเอปลาชนิดพ่อแม่จำนวน 5 ชนิด (ปลานิล ปลาสวาย ปลาโม่ง ปลาสายยู และปลาเทโพ $N=10$ /ชนิด) และลูกผสม (*P. hypophthalmus* x *P. gigas*, $N=10$; *P. hypophthalmus* x *P. bocourti*, $N=20$; Unknow; $N=47$) ไปเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ในส่วน Igm gene ตามสภาวะพีซีอาร์ในข้อ 4 ซึ่งได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 310 คู่เบส จากนั้นนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกไว้ โดยในปฏิกิริยา 10 μ l ประกอบไปด้วย ผลผลิตพีซีอาร์ 7 μ l 10x fast digest buffer 0.67 μ l fast digest enzyme 0.33 μ l และน้ำ 2 μ l อุณหภูมิและเวลาในการปฏิกิริยาตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์ (Fermentas) ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วย 2% อะกาโรสเจล ตรวจสอบผลด้วยการย้อม Ethidium bromide

ผลการทดลอง

การจำแนกชนิดปลาในกลุ่ม Pangasiid ด้วยวิธี PCR-RFLP

การคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมพบว่าปลาทั้ง 6 ชนิดมีเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้ 1 ตำแหน่ง (1 cutter) 32-39 เอนไซม์ และตัดได้ 2 ตำแหน่ง (2 cutter) 17-22 เอนไซม์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 และ 2 ตำแหน่งของปลา 6 ชนิด

ชนิดปลา	จำนวน 1 cutter enzyme	จำนวน 2 cutter enzyme
ปลาบึก <i>Pangasianodon gigas</i>	39	17
ปลาซวาย	35	18
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>		
ปลาโหม่ง <i>Pangasius bocourti</i>	32	22
ปลาสาวยู <i>Pangasius conchophilus</i>	34	21
ปลาเทโพ <i>Pangasius larnaudii</i>	34	22
ปลาเทพา <i>Pangasius sanitwongsei</i>	32	21

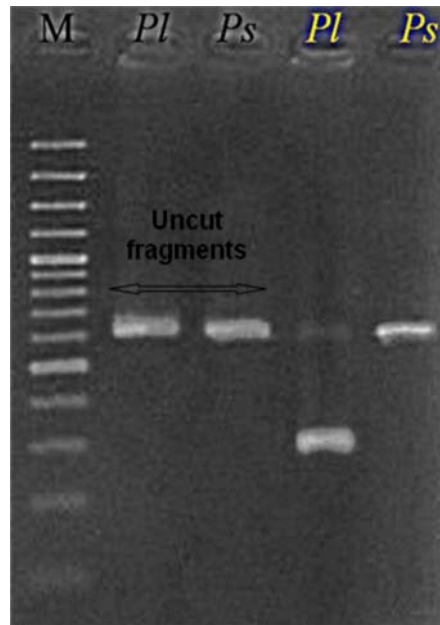
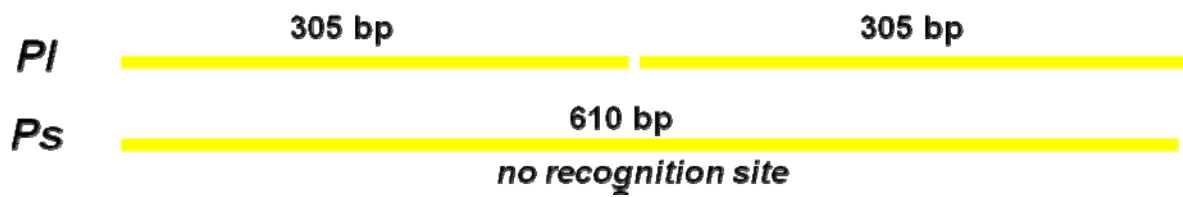
ผลการคัดเลือกเอนไซม์ที่เหมาะสมพบว่าในจำนวนนี้มี 3 เอนไซม์ ประกอบไปด้วยเอนไซม์ *Tsp509I*, *HincII* และ *MfeI* สามารถใช้จำแนกชนิดปลาจำนวน 6 ชนิด ($N=246$) ในครอบครัว Pangasiidae ได้ เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 610 คู่เบสของปลาทั้ง 6 ชนิดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tsp509I* สามารถแยกปลาทั้ง 6 ชนิดได้เป็น 2 กลุ่ม และ 2 ชนิด กลุ่มแรกประกอบด้วยปลาบึกและปลาซวาย แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีขนาด 190 และ 420 คู่เบส กลุ่ม 2 ประกอบด้วยปลาเทโพและปลาเทพา แสดงแถบดีเอ็นเอที่สามารถมองเห็นได้บนอะกาโรสเจล 3 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 95 190 และ 309 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอที่ไม่สามารถมองเห็น 1 แถบ มีขนาด 16 สำหรับปลาอีก 2 ชนิด คือปลาโหม่งแสดงแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ มีขนาด 95 190 และ 325 คู่เบส และปลาสาวยูแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 35 95 155 และ 325 คู่เบส (ภาพที่ 2)

ปลาในกลุ่มแรกคือปลาบึกและปลาซวายสามารถจำแนกได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HincII* โดยปลาบึกแสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีขนาด 245 และ 366 คู่เบส ส่วนปลาซวายแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 610 คู่เบส เนื่องจากไม่มีจุดตัดของเอนไซม์ *HincII* (ภาพที่ 3) สำหรับปลาเทโพและปลาเทพาสามารถใช้เอนไซม์ *MfeI* ในการจำแนกได้ เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ตัดด้วยเอนไซม์ *MfeI* ปลาเทโพจะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส และปลาเทพาแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 610 เนื่องจากไม่มีจุดตัดของเอนไซม์ *MfeI* (ภาพที่ 4)

ส่วนการทดสอบตัวอย่างลูกปลาของปลาจำนวน 5 ชนิด พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในลูกปลาบึก ปลาซวาย ปลาโหม่ง ปลาเทโพ และปลาเทพา มีรูปแบบเหมือนกับแถบดีเอ็นเอของปลาโตเต็มวัยทุกตัว



ภาพที่ 2 แผนี่แสดงจุดตัดและแถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ปลาทั้ง 6 ชนิด เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Tsp509I* *Pg*= ปลานีวก (*P. gigas*) *Ph*= ปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) *Pb*= ปลานิล (*P. bocourti*) *Pc*= ปลาสวาย (*P. conchophilus*) *Pl*= ปลาทู (*P. larnaudii*) *Ps*= ปลาทู (*P. sanitwongsei*) M คือ 100 bp ladder.



ภาพที่ 4 แผนี่แสดงจุดตัดและแถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ปลาเทโพและปลาเทพาเมื่อตัดด้วย เอนไซม์ *Mfe* *Pl*= ปลาเทโพ (*P. larnaudii*) *Ps*= ปลาเทพา (*P. sanitwongsei*) M คือ 100 bp ladder.

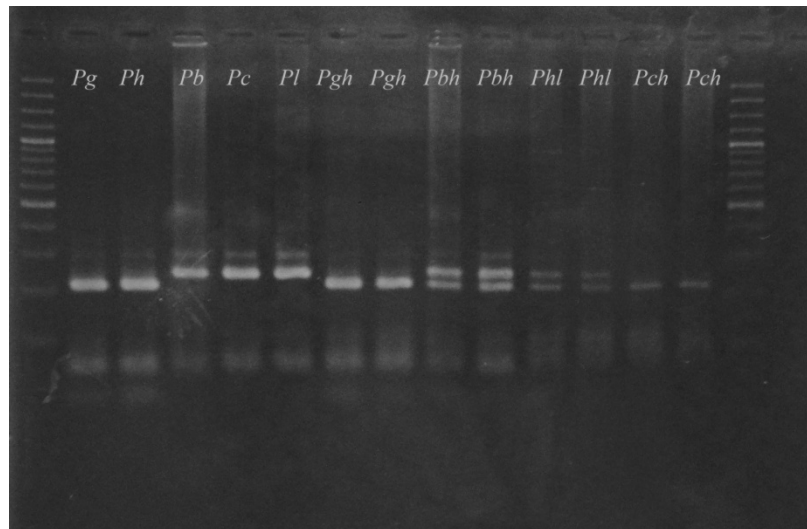
การจำแนกกลุ่มผสมของปลาในครอบครัว Pangasiidae

ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *Igm* ของปลา 5 ชนิด (ปลาน้ำจืด ปลาทราย ปลาโม่ง ปลาสาหร่าย และปลาเทโพ) ($N=10$ /ชนิด) และลูกผสมมีขนาดประมาณ 310 คู่เบส ลูกผสมสามารถจำแนกได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 เอนไซม์คือ *Pst*I และ *Taq*I ปลาน้ำจืดและปลาทรายมีจุดตัดของเอนไซม์ *Pst*I จำนวน 2 ตำแหน่ง ซึ่งเมื่อตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ของปลาน้ำจืดและปลาทรายที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I ด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาด 227 52 และ 31 คู่เบส สำหรับปลาโม่ง ปลาสาหร่าย และปลาเทโพ มีจุดตัดของเอนไซม์ *Pst*I เพียง 1 ตำแหน่ง จึงปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 258 และ 52 คู่เบส เอนไซม์ *Pst*I ไม่สามารถใช้จำแนกกลุ่มผสมระหว่างปลาทรายกับปลาน้ำจืด (*Pgh*) แต่สามารถใช้จำแนกกลุ่มผสมของปลาทรายกับปลาโม่ง (*Pbh*) ได้ โดยลูกผสมแสดงแถบดีเอ็นเอที่เห็นได้ชัดเจนจำนวน 2 แถบ ขนาด 258 และ 227 คู่เบส (แถบดีเอ็นเอขนาด 52 และ 31 ไม่สามารถเห็นได้ชัดเจน) (ภาพที่ 6)

ปลาน้ำจืดและปลาเทโพมีจุดตัดของเอนไซม์ *Taq*I จำนวน 1 ตำแหน่ง ส่วนปลาทราย ปลาโม่ง และปลาสาหร่าย มีจุดตัดของเอนไซม์ *Taq*I จำนวน 2 ตำแหน่ง ผลการตัดผลผลิตพีซีอาร์ของปลา 5 ชนิดด้วยเอนไซม์ *Taq*I ปรากฏรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน 3 รูปแบบ ปลาน้ำจืดปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 170 และ 140 คู่เบส ปลาทราย ปลาโม่ง และปลาสาหร่าย ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาด 170 100 และ 40 คู่เบส (เห็นได้ชัดเจน 2 แถบ คือขนาด 170 และ 100 คู่เบส) ปลาเทโพปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 272 และ 38 คู่เบส (เห็นได้ชัดเจน 1 แถบ คือขนาด 272 คู่เบส) เอนไซม์ *Taq*I สามารถจำแนกกลุ่มผสมระหว่างปลาทรายกับปลาน้ำจืด (*Pgh*) โดยเมื่อตัดผลผลิตพีซีอาร์ของลูกผสมด้วยเอนไซม์ *Taq*I ลูกผสมจะแสดงแถบดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบ ขนาด 170 140 100 และ 40 คู่เบส (เห็นชัดเจนจำนวน 3 แถบ 170 140 และ 100 คู่เบส) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของลูกผสมระหว่างปลาทรายกับปลาโม่ง (*Pbh*) แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับที่ปรากฏในปลาทรายและปลาโม่งจำนวน 3 แถบ ขนาด 170 100 และ 40 คู่เบส (เห็นได้ชัดเจน 2 แถบ คือขนาด 170 และ 100 คู่เบส)

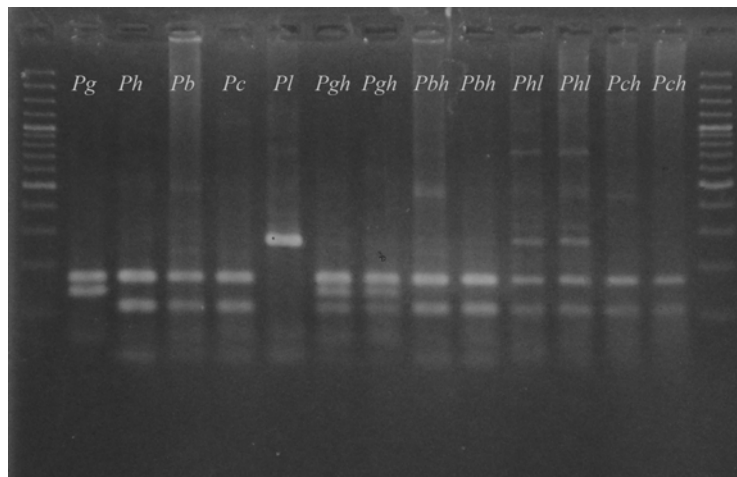
ผลการใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดทดสอบตัวอย่างลูกผสมระหว่างปลาทรายกับปลาน้ำจืด และปลาทรายกับปลาโม่งจำนวน 30 ตัวอย่าง (*Pgh* $N=10$, *Pbh* $N=20$) พบว่ามีลูกผสม *Pgh* จำนวน 3 ตัวอย่างแสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอเหมือนปลาทราย ส่วนลูกผสม *Pbh* ทุกตัวแสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากชนิดพ่อแม่

สำหรับลูกผสมที่ไม่สามารถระบุชนิดได้แน่นอน ในจำนวน 47 ตัวอย่าง มี 23 ตัวอย่าง แสดงแถบดีเอ็นเอของปลาทรายและปลาเทโพเมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ไปตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I (แสดงแถบดีเอ็นเอที่เห็นได้ชัดเจนจำนวน 2 แถบ ขนาด 258 และ 227 คู่เบส) และ *Taq*I (แสดงแถบดีเอ็นเอที่เห็นชัดเจนจำนวน 3 แถบ ขนาด 272 170 และ 100 คู่เบส) ส่วนตัวอย่างที่เหลือจำนวน 24 ตัวอย่างไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นลูกผสมโดยในจำนวนนี้มีตัวอย่างที่แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอเหมือนปลาเทโพจำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอเหมือนปลาทรายจำนวน 23 ตัวอย่าง



ภาพที่ 5 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของการวิเคราะห์ RFLP ของยีน Igm และตัดด้วยเอนไซม์ *PstI*

Pg = ปลานีล *Ph* = ปลาสวาย *Pb* = ปลาโม่ง *Pc* = ปลาสวาย *Pl* = ปลาเทโพ *Pgh* = ลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลานีล *Pbh* = ลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาโม่ง *Phl* = ลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาเทโพ *Pch* = ลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาสวาย



ภาพที่ 6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของการวิเคราะห์ RFLP ของยีน Igm และตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI*

Pg = ปลานีล *Ph* = ปลาสวาย *Pb* = ปลาโม่ง *Pc* = ปลาสวาย *Pl* = ปลาเทโพ *Pgh* = ลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลานีล *Pbh* = ลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาโม่ง *Phl* = ลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาเทโพ *Pch* = ลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาสวาย

วิจารณ์ผล

เทคนิค PCR-RFLP สามารถใช้จำแนกชนิดปลาในกลุ่ม Pangasiids จำนวน 6 ชนิดได้โดยใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด (*Tsp509I*, *HincII* และ *MfeI*) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิค SSCP และการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอในการจำแนกชนิดปลากลุ่มนี้ (อภิรดี และคณะ, 2553; Sriphairoj et al., 2010) พบว่าเทคนิค PCR-RFLP สามารถจำแนกปลาได้มากชนิดกว่า แต่ใช้เครื่องมือ และเวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า ทั้งนี้เทคนิค PCR-RFLP ถูกใช้สำหรับการจำแนกชนิดอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้ในการจำแนกชนิดลูกปลา (Lindstrom, 1999) การจำแนกผลิตภัณฑ์ประมง (Wolf et al., 1999, Sanjuan and Comesana, 2002, Fernandez et al., 2002) ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ยีนไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอในการศึกษา (เช่น cytochrome b 12S rRNA 16S rRNA) เนื่องจากอัตราการกลายที่สูง (high mutation rate) เมื่อเปรียบเทียบกับยีนในนิวเคลียส ทำให้มีความหลากหลายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอมากกว่า ซึ่งจะง่ายต่อการตรวจพบความแตกต่างระหว่างชนิด แม้จะเป็นชนิดที่ใกล้เคียงกัน (closely related species) (Wolf et al., 1999) และไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีจำนวนมาก (1,000 mitochondria/cell, each 10 copies of the genome) (Civera, 2003) สามารถหาคัดเบสดีเอ็นเอที่สูญเสียไประหว่างการแปรรูปในกรณีของการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ประมง (Zhang et al., 2007) อย่างไรก็ตามการที่ไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอมีความหลากหลายสูงทำให้ต้องระมัดระวังการเกิดความหลากหลายภายในชนิด (intraspecific variability) ซึ่งอาจทำให้จุดตัดของเอนไซม์ในปลาชนิดเดียวกันเปลี่ยนแปลงไป ทำให้เกิดการแปรผลผิดได้ (Civera, 2003) ดังนั้นตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ควรจะมาจากรายละเอียดย่อยๆ แหล่งเก็บตัวอย่าง ประมาณ 5-10 แหล่งเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน เพื่อความถูกต้องและน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ (Sanjuan and Comesana, 2002) ซึ่งในการศึกษารั้งนี้แหล่งเก็บตัวอย่างค่อนข้างมากและหลากหลาย (3-10 แหล่ง) และยีน 16S rRNA มีความหลากหลายค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับยีนอื่นๆ ในไมโทคอนเดรีย (ศิริราช และคณะ, 2551) ทำให้มั่นใจว่าเครื่องหมายที่พัฒนาได้สามารถใช้จำแนกปลาทั้ง 6 ชนิดได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ เครื่องหมายที่พัฒนาได้จะมีประโยชน์มากสำหรับการจำแนกปลาโตเต็มวัย กรณีตัวอย่างไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถระบุชนิดจากลักษณะภายนอกได้ สามารถนำไปใช้จำแนกลูกปลา ซึ่งจะทำให้ การศึกษาชีววิทยาของปลากลุ่มนี้ในแหล่งน้ำธรรมชาติทำได้ง่ายขึ้น ข้อมูลทางชีววิทยาที่ได้จะมี ประโยชน์สำหรับการวางแผนอนุรักษ์และจัดการทรัพยากรประมง (Lindstrom, 1999) ตลอดจนนำไปใช้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ประมงของปลากลุ่มนี้

เทคนิค PCR-RFLP ของยีน Igm สามารถใช้จำแนกลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาโม่ได้โดยใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *PstI* และ *TaqI* และลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาเทโพตรวจสอบ ได้ด้วยการใช้เอนไซม์ *TaqI* ส่วนการตรวจสอบลูกผสมระหว่างปลาสวายและปลากบ (บักหวาย) พบบาง ตัวอย่าง (3 ตัวอย่าง) ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของปลาสวายซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบโดยใช้ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ (อภิรดี และคณะ, 2553) สันนิษฐานว่าตัวอย่างดังกล่าวอาจเป็น ปลาผสมที่มีการผสมกลับ (backcross) กับปลาสวาย เพราะข้อมูลจากการสอบถามโรงเพาะฟักที่ อนุเคราะห์ตัวอย่างมีการผลิตลูกปลา backcross ของลูกผสมบักหวายด้วย ซึ่งการตรวจสอบลูกผสมที่ เกิดจากการผสมปลามากกว่า 2 ชนิด หรือลูกผสมที่มีการผสมกลับนั้นจำเป็นต้องใช้เครื่องหมายหลายๆ

ตำแหน่งและต้องวิเคราะห์ในตัวอย่างจำนวนมาก เพื่อความแม่นยำในการตรวจสอบ (อภิรดี และคณะ, 2553) ส่วนการตรวจสอบลูกผสมที่ทราบข้อมูลเบื้องต้นว่าเป็นลูกผสมระหว่างปลาสวายกับปลาสายยูนั้น เมื่อตรวจสอบแล้วพบว่าตัวอย่างที่ได้มาแสดงแถบดีเอ็นเอของปลาสวายทั้งหมด ทั้งนี้ยังไม่มีข้อมูลว่ามีการผลิตปลา backcross ของลูกผสมปลาสวายกับปลาสายยู สำหรับปลาโม่ง และปลาสายยู แสดงรูปแบบดีเอ็นเอที่เหมือนกันเมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Taq*I ในอนาคตจึงควรมีการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับจำแนกลูกผสมของปลากลุ่ม Pangasiids เพิ่มเติม เพื่อให้สามารถตรวจสอบลูกผสมได้มากขึ้นและมีความแม่นยำในการตรวจสอบมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- ศิริราชู กลิ่นบุหงา บวรลักษณ์ คำน้ำทอง และ อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2551. เครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม. หน้า 46-77, ใน อุทัยรัตน์ ณ นคร และ วงศ์ปฐมกมลรัตน์ (บรรณาธิการ). พันธุศาสตร์ประชากรเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ.
- อภิรดี หันพงศ์กิตติกุล วงศ์ปฐมกมลรัตน์ และ สุภาภรณ์ ขาวสวน. 2553. การจำแนกชนิดปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิดและลูกผสมในวงศ์ปลาสร้อยโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ. วารสารการประมง 63(1), หน้า 39-46.
- Civera, T. 2003. Species identification and safety of fish products. Vet Res Commun. 27 Suppl.1: 481-489.
- Fernández, A., T. García, I. González, L. Asensio, M. Ángel, M.A. Rodríguez, P.E. Hernández and R. Martín. 2002. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment for authentication of four clam species. J. Food Protect. 65: 692-695.
- Hashimoto, D.T., F.F. Mendonça, J.A. Senhorini, J. Bortolozzi, C. Oliveira, F. Foresti, and F. Porto-Foresti. 2010. Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongates* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: Tools for genetic monitoring in aquaculture. Aquaculture 298, 346-349.
- Hau, N.P. 2008. Sustainable development of *Pangasius* farming: view of the producers. The 1st *Pangasius* aquaculture dialogue workshop in Hochiminh City. 11 March 2008. Viet Nam Association of Seafood Exporters and Producers (VASEP).
<http://www.worldwildlife.org/what/globalmarkets/aquaculture>.
- Ishizaki, S., Y. Yokoyama, N.Oshiro, N. Teruya, Y. Nagashima, K. Shiomi, S. Watabe. 2006. Molecular identification of pufferfish species using PCR amplification and restriction analysis of a segment of the 16S rRNA gene. Comp. Biochem. Physiol. D 1: 139-144.
- Khamnamtong, B., S. Klinbunga and P. Menasveta. 2005. Species identification of five Penaeid shrimps using PCR-RFLP and SSCP analyses of 16S ribosomal DNA. J. Biochem. Mol. Biol. 38, 491-499.
- Lindstrom, D.P. 1999. Molecular species identification of newly hatched Hawaiian amphidromous gobioid larvae. Mar. Biotechnol. 1: 167-174.

- Mongkonpanya, K., C. Senawong, T. Pupipat and T. Tiersch. 1996. The Mekong giant catfish and ChaoPhraya catfish and their hybrid: morphology, carcass composition and dress-out percentages. *Thai. J. Agric. Sci.* 29: 373-381.
- Na-Nakorn, U., S. Sukmanomon, M. Nakajima, N. Taniguchi, W. Kamonrat, S. Poompuang and T.T.T. Nguyen. 2006. MtDNA diversity of the critically endangered Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas* Chevey, 1913) and closely related species: implications for conservation. *Anim. Conserv.* 9: 483-494.
- Palumbi, S.R., A.P. Martin, S. Romano, W.O. McMillan, L. Stice and G. Grabowski. 1991. The simple fool's guide to PCR. Honolulu: Department of Zoology, University of Hawaii.
- Roberts, T.R. and C. Vidthayanon. 1991. Systematic revision of the Asian catfish family Pangasiidae, with biological observations and descriptions of three new species. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.* 143: 97-144.
- Sanjuan, A. and A. Comesana. 2002. Molecular identification of nine commercial flatfish species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a segment of the cytochrome b region. *J. Food Protect.* 65: 1016-1023.
- Sriphairoj, K., S. Klinbu-nga, W. Kamonrat and U. Na-Nakorn. 2010. Species identification of four economically important Pangasiid catfishes and closely related species using SSCP markers. *Aquaculture* 308: S47-S50.
- Taggart, J.B., R.A. Hynes, P.A. Prodohl and A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.* 49: 963-965.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Thongpan, A., M. Mingmuang, S. Thinchant, R. Cooper, T. Tiersch and K. Mongkonpunya. 1997. Genomic identification of catfish species by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis of the gene encoding the immunoglobulin M heavy chain constant region. *Aquaculture* 156, 129-137.
- Vincze, T., J. Posfai and R.J. Roberts. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 31: 3688-3691.
- Wolf, C., J. Rentsch and P. Hübner. 1999. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1350-1355.
- Zhang, J., H. Huang, Z. Cai and L. Huang. 2007. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondria 12S rRNA gene sequence. *Food Control* 18: 1331-1336.

ภาคผนวก

ฉบับร่าง

Identification of catfish in the family Pangasiidae and their hybrid using PCR-RFLP

Kednapat Sripairoj¹, Uthairat Na-Nakorn², Sirawut Klinbu-nga³

¹ Department of Fisheries, School of Agriculture and Natural resource, University of Phayao, Phayao, Thailand

² Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

³ National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pathumthani, Thailand

*corresponding author. Tel.: ; fax:

E-mail address:

Abstract

The clear and accessible methodology for identification of larval, processed fish products and hybrids of Pangasiidae species was developed. Identification of six Pangasiid species and their hybrid was achieved using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of the mitochondrial 16S rRNA and nuclear immunoglobulin M heavy chain (Igm) gene. DNA samples of each of six species were amplified using 16Sar and 16Sbr primers and PCR products obtained were cut with selected restriction endonucleases. The result showed that six species of Pangasiid catfish could be discriminated using three restriction enzymes (*Tsp509I*, *HincII* and *MfeI*). Larvae of five species (*P. gigas*, *P. hypophthalmus*, *P. bocourti*, *P. larnaudii* and *P. sanitwongsei*) could also be identified using these restriction enzymes. The restriction digest of the PCR product of nuclear Igm gene by enzyme *TaqI* and *PstI* allowed the clear distinction of four species (*P. gigas*, *P. hypophthalmus*, *P. larnaudii* and *P. bocourti*) and their hybrid. Enzyme *TaqI* generated species-specific RFLP pattern of three species (*P. gigas*, *P. hypophthalmus* and *P. larnaudii*). Hybrids of *P. hypophthalmus* x *P. gigas* and *P. hypophthalmus* x *P. larnaudii* demonstrated a heterozygous pattern with diagnostic bands inherited from their parental species. Enzyme *PstI* generated different electrophoretic profiles of *P. hypophthalmus* and *P. bocourti* and could be used to identify their hybrid.

Keyword: *Pangasius*, *Pangasianodon*, PCR-RFLP

1. Introduction

The fishes of the Pangasiidae family are among the important freshwater fishes in Thailand and South-east Asian countries. The export value of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* was extremely increased by 42.9% over 8 years (Hau, 2008). *Pangasius bocourti* are widely cultured in areas along the Mekong River basin in Thailand and Vietnam (Trong et al., 2002; Thammapat et al., 2010). Almost of *P. hypophthalmus* and *P. bocourti* were exported as frozen fillet (Anonymous, 2005). Some species are also important in terms of conservation. Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*), found in only one river in the world, has been listed as critically endangered by IUCN (IUCN, 2005) and *Pangasius sanitwongsei* as endangered by Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR, 1995). Moreover Pangasiids catfish form significant components of regional fisheries and they are a major protein sources for the local consumption in the Mekong River Basin (Coates, 2002).

The morphology could be effectively applied for adult Pangasiid catfishes identification (Roberts and Vidthayanon, 1991). The identification guideline base on morphology for larvae is not well established (Hanphongkittikul et al., 2010). Some characteristic rely on internal organ (number gill raker, air bladder), limited of using taxonomy for larvae identification. Hybrid among Pangasiid species [e.g. *P. hypophthalmus* and *P. gigas* (Mongkonpanya et al., 1996); *P. hypophthalmus* and *P. bocourti* (Annop Imsilp, per. com.); *P. hypophthalmus* and *P. larnaudii* (Apiradee et al., 2010)] could not be clearly identified using morphological features. Molecular marker will facilitate species identification of larvae, hybrid and processed fish of Pangasiid catfishes. Species identification of the fishes of the Pangasiidae family were developed using SSCP markers (Sriphairoj et al., 2010). However, SSCP marker have to run on acrylamide gel and take long time for analysis. Fast and simple approach should be developed, PCR-RFLP (Polymerase

Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) is considered fast, simple and inexpensive (Hashimoto et al., 2010).

This study focused on applying PCR-RFLP for identification of six economically important Pangasiid catfishes (*Pangasianodon gigas*; *Pg*, *Pangasianodon hypophthalmus*; *Ph*, *Pangasius bocourti*; *Pb*, *Pangasius conchophilus*; *Pc*, *Pangasius larnaudii*; *Pl*, *Pangasius sanitwongsei*; *Ps*) and their hybrids (*P. hypophthalmus* x *P. gigas*; *Phg*, *P. hypophthalmus* x *P. larnaudii*; *Phl* and *P. hypophthalmus* x *P. bocourti*; *Phb*). These novel molecular markers are useful for larvae and hybrid identification as well as products authentication of Pangasiidae species.

2. Materials and method

2.1 Sampling and DNA extraction

Broodstock-sized samples of six Pangasiid species (*Pg*; *N*=47, *Ph*; *N*=37, *Pb*; *N*=34, *Pc*; *N*=23, *Pl*; *N*=50 and *Ps*; *N*=53) were collected from various locations including wild and captive populations. Post-hatched larvae samples of five species (*Pg*; *N*=28, *Ph*; *N*=6, *Pb*; *N*=11, *Pl*; *N*=6 and *Ps*; *N*=41) were collected from government hatcheries (tell about station). Hybrids of *P. hypophthalmus* x *P. bocourti* (*N*=20) and *P. gigas* x *P. hypophthalmus* (*N* = 10) were sampled from government hatcheries (province) and private hatchery in Nakhonsawan, respectively. The samples of *P. hypophthalmus* x *P. larnaudii* (*N*=31) and *P. hypophthalmus* x *P. conchophilus* were collected from fish markets in Ubonratchatanee Province, they originated from private hatcheries.

Fin clips of adults and hybrids, and whole body of the larvae were preserved in absolute ethanol. Genomic DNA of all samples was extracted following the standard phenol-chloroform protocol (Taggart et al., 1992).

2.2 PCR-RFLP analysis of six Pangasiids

Forty-two haplotypes of the mitochondrial 16S rRNA of six Pangasiids species (Na-Nakorn et al., 2006, *Pg*= 4 haplotypes; *Ph*=8 haplotypes; *Pb*=10 haplotypes; *Pc*=3 haplotypes; *Pl*=11 haplotypes; *Ps*=6 haplotypes) were aligned using ClustalW (Thompson et al., 1994). Restriction endonuclease sites were found using NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003) and restriction enzymes were then selected on the basis of the predictable specific patterns that they produced. DNA samples of each (N=3/species) of six species were amplified using primers 16Sar (5'-CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT-3') and 16Sbr (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ATG T-3') (Palumbi et al., 1991). PCR products obtained were sequenced both forward and reward direction and aligned to confirm restriction site of selected enzymes. DNA samples of each of six species were amplified with 16Sar and 16Sbr primers (Palumbi et al., 1991) following Na-Nakorn et al., 2006. PCR products obtained were cut with selected restriction endonucleases and then determined by electrophoresis in 2.0% agarose gels.

2.3 PCR-RFLP analysis of hybrids

DNA fragments (300 bp) of immunoglobulin M heavy chain gene (Igm gene) of each of five species (*Pg*, N=10; *Ph*, N=10; *Pb*, N=10; *Pc*, N=10 and *Pl*, N=10) were amplified following Thongpan et al. (1997). The PCR products (N = 2) were sequenced and aligned using ClustalW (Thompson et al., 1994). Restriction enzymes were selected from restriction map analyzed using NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003). DNA samples of parental species (*P. gigas*, *P. hypophthalmus*, *P. bocourti*, *P. conchophilus* and *P. larnaudii*) and hybrids (*P. hypophthalmus* x *P. gigas*, N=10; *P. hypophthalmus* x *P. bocourti*, N=20; *P. hypophthalmus* x *P. conchophilus*, N=16 and *P. hypophthalmus* x *P. larnaudii*, N=31) were amplified

following Thongpan et al. (1997). PCR products obtained were digested with selected enzyme and then electrophoresed on 2.0% agarose gels.

3. Results

3.1. PCR-RFLP analysis of Six Pangasiid catfishes

Restriction enzymes obtained from NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003) of six species comprised of one cutter and two cutter size 32-39 and 17-22 enzymes, respectively. Three restriction enzymes (*Tsp509I*, *HincII* and *MfeI*), produced species specific patterns, were selected for RFLP analysis of six Pangasiid catfishes (N=237). PCR product (610 bp) obtained from six catfishes species were cut with *Tsp509I* resulting four species-specific patterns of two species, *P. bocourti* and *P. conchophilus* and two groups comprising 1) *P. gigas* and *P. hypophthalmus* 2) *P. larnaudii* and *P. sanitwongsei*. Two DNA fragments (190 and 420 bp) were generated for *P. gigas* and *P. hypophthalmus*. Three DNA fragments were obtained from *P. bocourti* (95, 190 and 325 bp). Four DNA fragments were generated for *P. conchophilus* (35, 95, 155 and 325 bp) and *P. larnaudii* and *P. sanitwongsei* (16, 95, 190 and 309 bp) (Figure 1). Enzyme *HincII* could be used to differentiate *P. gigas* and *P. hypophthalmus*, it generated two DNA fragments of *P. gigas* (245 and 366 bp) and one of *P. hypophthalmus* (no recognition site, Figure 2). *P. larnaudii* and *P. sanitwongsei* were discriminated using enzyme *MfeI* which generated 300 bp DNA fragment of *P. larnaudii* and 610 bp of *P. sanitwongsei* (no recognition site, Figure 3). On screening increased number of individuals of each of six species, variation of RFLP pattern was found for *P. gigas*, *P. bocourti* and *P. larnaudii*. One individual of *P. gigas* had DNA pattern of *P. hypophthalmus* consistent with result of SSCP (Sriphairoj et al., 2010) demonstrated that this sample was *P. hypophthalmus*. One individual of *P. bocourti* had DNA pattern of *P. hypophthalmus* another

no match with any species. One individual of *P. larnaudii* had DNA pattern of *P. hypophthalmus* and four samples had DNA pattern of *P. conchophilus*.

3.2 PCR-RFLP analysis of larvae of five Pangasiid catfishes

DNA of post-hatch larvae of five species (*P. gigas*, $N = 28$; *P. hypophthalmus*, $N = 6$; *P. bocourti*, $N = 11$; *P. larnaudii*, $N = 6$ and *P. sanitwongsei*, $N = 41$) were analyzed with three restriction enzymes (*Tsp509I*, *HincII* and *MfeI*). DNA patterns obtained of larvae were perfectly matched the patterns found in the adults. There is mislabeling in samples of *P. hypophthalmus* and *P. larnaudii*, three samples of *P. hypophthalmus* had RFLP patterns of *P. larnaudii* and three samples of *P. larnaudii* had RFLP patterns of *P. hypophthalmus*. All DNA of larvae (equal concentration, 10 ng) of two, three and five species were pooled and tested using three restriction enzymes. The result showed that three restriction enzymes could identify each species within pool DNA.

3.3 PCR-RFLP analysis of Pangasiid catfish hybrids

DAN fragments of approximately 300 bp of Igm gene were amplified in all individuals of parental and hybrid. Two selected restriction enzymes (*PstI* and *TaqI*) were used to digest PCR products of parental and hybrid. Digestion of the PCR product of five parent species with enzyme *PstI* revealed different size of single amplification band (Figure 4). Electrophoretic patterns of *P. gigas* and *P. hypophthalmus* were single fragment of approximately 200 bp, *PstI* could not used to identified their hybrids. Electrophoretic patterns of *P. bocourti*, *P. conchophilus* and *P. larnaudii* showed larger than 200 bp single fragment. RFLP profile of hybrids of *P. hypophthalmus* x *P. bocourti* and *P. hypophthalmus* x *P. larnaudii* were heterozygous bands with different size inherited from both parental species. Electrophoretic patterns of all hybrid samples ($N=16$) of *P. hypophthalmus* x *P. conchophilus*

(*Phc*) showed one DNA fragment matched the patterns found in *P. hypophthalmus* (Figure 4).

Electrophoretic patterns of PCR product digested by enzyme *TaqI* revealed specific pattern of *P. gigas* and *P. larnaudii* (Figure 5). RFLP profile of *P. gigas* was double band of approximately 130 bp and 180 bp. RFLP profile of *P. larnaudii* was single band of approximately 300 bp. RFLP profile of *P. hypophthalmus*, *P. bocourti* and *P. conchophilus* showed double band of approximately 100 bp and 180 bp. Digestion of the PCR products of hybrids of *P. hypophthalmus* x *P. gigas* (*Phg*) and *P. hypophthalmus* x *P. larnaudii* (*Phl*) by *TaqI* obtained triple bands with different size inherited from their parental species (100 bp 130 bp and 180 bp for *Phg*, 100 bp 180 bp and 300 bp for *Phl*) (Figure 5).

4. Discussion

Acknowledgements

This work was funded by Thailand Research Fund and Office of the Higher Education Commission (Research Grant for New Scholar, MRG5280138) awarded to KS. We appreciate all government and private hatchery provided samples for this study.

References

Anonymous, 2005

Hanphongkittikul et al., 2010

Hashimoto, D.T., F.F. Mendonça, J.A. Senhorini, J. Bortolozzi, C. Oliveira, F. Foresti, and F. Porto-Foresti. 2010. Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongates* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: Tools for genetic monitoring in aquaculture. *Aquaculture* 298, 346-349.

- Hau, N.P. 2008. Sustainable development of *Pangasius* farming: view of the producers. The 1st *Pangasius* aquaculture dialogue workshop in Hochiminh City. 11 March 2008. Viet Nam Association of Seafood Exporters and Producers (VASEP). <http://www.worldwildlife.org/what/globalmarkets/aquaculture>.
- Ishizaki, S., Y. Yokoyama, N.Oshiro, N. Teruya, Y. Nagashima, K. Shiomi, S. Watabe. 2006. Molecular identification of pufferfish species using PCR amplification and restriction analysis of a segment of the 16S rRNA gene. *Comp. Biochem. Physiol. D* 1: 139-144.
- Khamnamtong, B., S. Klinbunga and P. Menasveta. 2005. Species identification of five Penaeid shrimps using PCR-RFLP and SSCP analyses of 16S ribosomal DNA. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 491-499.
- Mongkonpanya, K., C. Senawong, T. Pupipat and T. Tiersch. 1996. The Mekong giant catfish and ChaoPhraya catfish and their hybrid: morphology, carcass composition and dress-out percentages. *Thai. J. Agric. Sci.* 29: 373-381.
- Na-Nakorn, U., S. Sukmanomon, M. Nakajima, N. Taniguchi, W. Kamonrat, S. Poompuang and T.T.T. Nguyen. 2006. MtDNA diversity of the critically endangered Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas* Chevey, 1913) and closely related species: implications for conservation. *Anim. Conserv.* 9: 483-494.
- Palumbi, S.R., A.P. Martin, S. Romano, W.O. McMillan, L. Stice and G. Grabowski. 1991. The simple fool's guide to PCR. Honolulu: Department of Zoology, University of Hawaii.

- Roberts, T.R. and C. Vidthayanon. 1991. Systematic revision of the Asian catfish family Pangasiidae, with biological observations and descriptions of three new species. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.* 143: 97-144.
- Sanjuan, A. and A. Comesana. 2002. Molecular identification of nine commercial flatfish species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a segment of the cytochrome b region. *J. Food Protect.* 65: 1016-1023.
- Sriphairoj, K., S. Klinbu-nga, W. Kamonrat and U. Na-Nakorn. 2010. Species identification of four economically important Pangasiid catfishes and closely related species using SSCP markers. *Aquaculture* 308: S47-S50.
- Taggart, J.B., R.A. Hynes, P.A. Prodohl and A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.* 49: 963-965.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Thongpan, A., M. Mingmuang, S. Thinchant, R. Cooper, T. Tiersch and K. Mongkonpunya. 1997. Genomic identification of catfish species by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis of the gene encoding the immunoglobulin M heavy chain constant region. *Aquaculture* 156, 129-137.
- Vincze, T., J. Posfai and R.J. Roberts. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 31: 3688-3691.

Output จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

อยู่ระหว่างการตรวจแก้ไข manuscript โดยนักวิจัยที่ปรึกษา (manuscript ฉบับร่างตามเอกสารในภาคผนวก)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

-

3. อื่นๆ

การนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยายในการประชุมวิชาการนานาชาติ 9TH ASIAN FISHERIES & AQUACULTURE FORUM (9AFAF) ณ มหาวิทยาลัย Shanghai เมือง Shanghai ประเทศจีน ระหว่างวันที่ 21–25 เมษายน 2554

Kednapat Sriphairoj, Uthairat Na-Nakorn and Sirawut Klinbu-nga. 2554. SPECIES

IDENTIFICATION OF CATFISH IN THE FAMILY PANGASIIDAE USING mtDNA 16S rRNA. Presented in the **9TH ASIAN FISHERIES & AQUACULTURE FORUM (9AFAF)**, Shanghai Ocean University, Shanghai, China, 21–25 April 2554. (oral presentation)