บทคัดย่อ

1. ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอปลาบึก (*Pangasianodon gigas* – mtDNA) ได้ถูกสกัดจากตับปลาบึก และนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MboI* และนำไปต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* หลังจากนั้น recombinant plasmid ถูกนำไปโคลนใน *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ภายหลังคัดเลือกโคลนที่ได้รับชิ้นส่วนสอดแทรกของ mtDNA จะถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ ลำดับดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ 3 คู่เพื่อทำ Long PCR สำหรับLong PCR product ที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ โดยอาศัย primer walking sequencing ผลปรากฏว่า Long PCR products ที่ได้ครอบคลุม mtDNA ทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดแล้ว พบว่า complete mitochondrial DNA genome ของปลาบึกยาว 16,533 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วยยีนต่าง ๆ ทั้งหมด 37 ยีน (คือ 13 protein coding genes, 2 ribosomal RNA genes, 22 tRNA genes) และ control region เหมือนกับที่พบในปลากระดูกแข็งอื่น ๆ ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดถูกนำไปฝากไว้ที่ GenBank ภายใต้ Acession number AY672971

2. จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอปลาบึก ภายใต้ Acession number AY672971 สามารถนำไปออกแบบไพรเมอร์ได้อย่างไม่มีขีดจำกัด โครงการนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์ไว้แล้ว 4 คู่ สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีน *ND2, ND3-ND4, Cytochrome b* และ บริเวณ control region ซึ่งจะได้ PCR product ขนาด 1376, 2356, 2263, และ 1000 bp ตามลำดับ

3. เมื่อตรวจความแปรปรวนปลาบึก จำนวน 161 ตัว ที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ รวม 8 แหล่ง และปลาธรรมชาติอีก 1 กลุ่ม โดยอาศัยข้อมูล *ND2* – RFLP พบว่า ความแปรปรวนภายในประชากรต่ำ (gene diversity) มีค่าระหว่าง 000-0.198 ซึ่งพบเพียงใน 3 ประชากรเท่านั้น คือ ประชากรกาฬสินธุ์ สระบุรี และประชากรธรรมชาติ ไม่พบความแตกต่างระหว่างประชากรอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อสร้าง phylogenetic tree ระหว่างปลาทั้งหมดพบว่ามี 4 กลุ่ม หรือ 4 maternal lineages เท่านั้น กล่าวคือ อาจมีจุดกำเนิดตั้งต้นมาจากตัวเมียเพียง 4 ตัวเท่านั้น

4. เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนระหว่างประชากรโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ control region พบว่าปลา 131 ตัวนั้นสามารถแบ่งได้เป็น 48 haplotype ซึ่งเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype พบว่า haplotype ที่ห่างที่สูงสุดถึง 6 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งคาดว่าปลาบึกทั้งหมดนี้น่าจะมาจากประชากรหลัก 2 ประชากรที่แยกกันอยู่นานแล้ว เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนทั้งหมดพบว่า percentage of polymorphism จะมีค่าเท่ากับ 5.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ค่า nucleotide diversity พบว่าภายในประชากรมีค่าระหว่าง0.0032-0.0104. และเมื่อทดสอบความแปรปรวนระหว่างประชากร (nucleotide divergence) พบว่าประชากรเหล่านี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อนำเอาค่า nucleotide divergence ไปสร้าง Neighbor joining(NJ) phylogenetic tree พบว่าปลาทั้งหมดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลัก(major clade)ซึ่งมาจากหลายสายพันธุ์แม่ (maternal lineages) จากผลการวิเคราะห์ครั้ง

นี้ แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้เทคนิคที่ละเอียดขึ้นเราก็สามารถวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปลาบึกได้กว้างขวางมากขึ้น ข้อมูลเหล่านี้น่าจะเป็นประโยชน์เพื่อการวางแผนการใช้ปลาบึกอย่างยั่งยืนได้

Abstract

1. The mitochondrial DNA (mtDNA) of a Mekong giant catfish was extracted from liver and digested with *MboI* and ligated with *BamHI* digested pUC18. The recombinant plasmids were trasferred to *E. coli* strain JM109. The presumably inserted bacterial clones were screened and sent to sequencing unit. The nucleotide sequences of inserted mtDNA fragments were used to design 3 pairs of primers for long PCR. The long PCR-products were sequenced by primer walking technique. All nucleotide sequences of long PCR products obtained, covered entire mitochondrial genome of giant catfish. It was found that mitochondrial genome of giant catfish is composed of 16,533 bp. which contains 37 genes (13 proteins- coding genes, 2 ribosomal RNA genes, 22 tRNA genes) and control region as those found in other bony fishes.

2. By means of complete mitochondrial genome of Mekong giant catfish under accession number AY672971 of GenBank, one can design PCR-primer undefinitely. This project has designed 4 pairs of PCR primers of amplifying mtDNA-fragments of gene *ND2, ND3 – ND4*, *Cytochrome b* + control region and control region. The PCR products obtained were 1,376, 2,356, 2,263 and 1000 bp, respectively.

3. The genetic variation of all fish collected from 8 different locations and a wild group was determined by using *ND2*-RFLP data. It was found that the genetic variability within population is seemingly low and found only in three populations; Kalasin, Saraburi and wild group. The constructed phylogenetic tree showed that all fish derived from 4 maternal lineages.

4. The nucleotide sequences of control region (899 bp) of 131 fish were also determined and used to define theirs haplotypes. Nucleotide sequences of 131 fish produced 48 haplotypes. Consideration to relationship among haplotypes, it was found that the highly distinct haplotypes were only six nucleotides differences. It was assumed that all fish were derived from two populations. The genetic varialbility was determined and found that the percentage of polymorphism is only 5 % , nucleotide diversity within populations ranged from 0.0032 to 0.0104. AMOVA hierarchical analysis showed significant variation among populations ($p>0.05$).The neighbor joining (NJ) phylogenetic tree ,based on nucleotide divergence between haplotypes, revealed 3 major clades which derived from different matrenal lineages. Eventhough the genetic diversity of giant catfish is very low, the suitable technique could be used to measure variation among populations which would be useful for sustainable management.