

โครงการ การศึกษาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรกุ่มกุลาดำ
โดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยตัวตรวจสอบที่มีลำดับเบสซ้ำแบบง่าย

ผู้วิจัย รศ. ดร. อัญชลี ทศนาขจร
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ในการศึกษาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรกุ่มกุลาดำ ได้ทดสอบวิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกุ่มกุลาดำและได้เลือก 2 วิธี เพื่อใช้ในการศึกษาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรม คือ 1. การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA analysis) และ 2. การตรวจความแปรผันของ microsatellites DNA ในการศึกษาได้เก็บตัวอย่างกุ่มจากแหล่งที่นิยมใช้เป็นพ่อ-แม่พันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ่ม จำนวน 5 แหล่ง โดยเก็บตัวอย่างจากทะเลอันดามัน 3 แหล่ง ได้แก่ กุ่มบริเวณ จ.สตูล-ตรัง กุ่มจากจ.พังงา และ กุ่มจากเมดาน ประเทศอินโดนีเซีย และเก็บตัวอย่างกุ่มจากฝั่งอ่าวไทย 2 แหล่ง ได้แก่ กุ่มจาก จ.ตราด และ จากจ.ชุมพร โดยแต่ละวิธีได้ผลโดยสรุปดังนี้

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค RAPD

จากการวิเคราะห์ RAPD patterns ของกุ่มทั้ง 5 กลุ่ม พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจาก RAPD primers ทั้ง 7 ตัว รวม 80 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 200-2000 คู่เบส เมื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอ (%polymorphic bands) ในกุ่มแต่ละกลุ่มพบว่ามีความใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 51.5-57.7% ค่า similarity index ภายในกลุ่มประชากรอยู่ในช่วง 0.86-0.89 โดยตัวอย่างกุ่มจากพังงามีค่า similarity ภายในกลุ่มประชากรสูงสุด จากค่า similarity index ระหว่างกลุ่มประชากร เมื่อนำมาคำนวณค่า genetic distance และ สร้าง dendrogram พบว่าตัวอย่างกุ่มกุลาดำจากเมดานมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากกุ่มของประเทศไทย ($D_{ij}=14.976\%$) และภายในกลุ่มตัวอย่างของกุ่มจากประเทศไทยด้วยกัน สามารถแยกกุ่มสตูล-ตรังออกจากกลุ่มตัวอย่างที่เหลือ ($D_{ij}=2.632\%$) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ่มทั้ง 5 กลุ่ม มีลักษณะที่แตกต่างกันทั้งสิ้น 252 แบบ เมื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ไคสแควร์ (chi-square analysis) และเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างกุ่มจากเมดานกับกลุ่มตัวอย่างของประเทศไทย และระหว่างกลุ่มตัวอย่างของประเทศไทยจากทะเลอันดามันและอ่าวไทย พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.0001$ และ $P=0.0000-0.0387$ ตามลำดับ)

การตรวจความแปรผันของ microsatellites DNA

สามารถแยก microsatellite clones จาก partial genomic library ของกุ่มกุลาดำได้ และจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ microsatellite clones พบว่ามีลำดับเบสซ้ำเป็นแบบ (GT) $_n$ จำนวน 97 clones, (CT) $_n$ จำนวน 16 clones และเป็น microsatellites ชนิด perfect, imperfect และ compound ในสัดส่วน 24, 53, และ 23% ตามลำดับ แสดงว่า microsatellites ในกุ่มกุลาดำส่วนใหญ่

เป็นชนิด imperfect นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวน repeat ในแต่ละ clone มีความยาวตั้งแต่ 6 repeats จนถึงมากกว่า 100 repeats โดยจำนวน repeat ที่พบมากที่สุดอยู่ในช่วง 30-35 repeats จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ flanking regions ของ microsatellite clones นำมาออกแบบ PCR primers เพื่อตรวจสอบความแปรผันของ microsatellite loci พบว่ามี 4 loci ที่ให้ PCR product ตามที่คาดไว้ และสามารถ score allele ได้ คือ CUPmo 18, CUPmo386, CUPmo131 และ CUPmo 195 เมื่อทำการทดสอบความแปรผันของ microsatellite loci เหล่านี้ โดยนำไปตรวจตัวอย่างกุ้งจากธรรมชาติ พบว่าทุก loci มีความแปรผันสูง คือมีจำนวน alleles ที่พบในแต่ละ locus อยู่ในช่วง 14-28 alleles เมื่อนำไปตรวจความแปรผันทางพันธุกรรมในตัวอย่างกุ้ง 4 กลุ่ม คือ สตูล ตรัง พังงา และชุมพร โดยการตรวจความแปรผันที่ตำแหน่ง CUPmo18 locus พบว่ากุ้งจากทะเลอันดามัน คือ สตูล ตรัง และพังงา มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับกุ้งจากอ่าวไทย คือ กุ้งชุมพร

Abstract

Two molecular methods, the Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis and the microsatellite technique, were used in determining genetic variations in wild populations of the black tiger shrimps, *Penaeus monodon*, Fabricius. Specimens were collected from 5 geographically separated locations of *P. monodon* consisted of Satun-Trang, Phangnga, and Medan in the Andaman Sea and Chumphon and Trad in the Gulf of Thailand.

In the RAPD analysis using 7 arbitrarily selected primers, the percentages of polymorphic bands of 5 geographic populations investigated varied from 51.5-57.7%. The average similarity index within populations across all primers ranged from 0.86-0.89. The Phangnga *P. monodon* showed the highest level of within population similarity whereas the remaining populations showed slightly lower similarity index. The genetic distance between populations and UPGMA dendrograms indicated that the medan population was genetically different from Thai *P. monodon*. ($D_{ij} = 14.976\%$). Within Thailand, the Satun-Trang *P. monodon* was separated from the remaining geographic populations with a genetic distance of 2.632%. RAPD analysis yielded a total of 252 genotypes. A Monte Carlo analysis illustrated geographic heterogeneity in genotype frequencies within this species suggesting that genetic population structure does exist in this taxon ($P < 0.001$ for all primers). Significant differences in genotype frequencies between Thai and Indonesian (Medan) *P. monodon* were observed ($P < 0.0001$). Within Thailand, The Andaman Sea *P. monodon* was significantly different from that of the Gulf of Thailand indicating population differentiation between *P. monodon* from these two main fishery regions of Thailand.