

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การประยุกต์ใช้พันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน

สัญญาเลขที่ RTA4680010

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร

ระยะเวลาการรับทุน 1 กันยายน 2546 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2549 (ขยายเวลาการวิจัย 12 เดือน)

บทคัดย่อ

งานวิจัยในโครงการประกอบด้วยโครงการย่อย 4 โครงการ ดังต่อไปนี้ (1) การใช้แนวทางพันธุศาสตร์เพื่อความยั่งยืนของปลานิล: (1.1) การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อการวางแผนการผสมพันธุ์ปลานิล: การศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อวางแผนการผสมพันธุ์พ่อแม่ปลานิลที่เจริญพันธุ์ในโรงเพาะฟักเป็นรุ่นแรก ไม่ให้เกิดการผสมเลือดชิด ทำการศึกษา microsatellite 7 ตำแหน่ง ในพ่อแม่พันธุ์ปลานิลจำนวน 129 ตัวจากโรงเพาะฟัก 7 แห่ง คำนวณค่า genetic relatedness (r_{xy}) จากข้อมูลจีโนไทป์ เพื่อใช้ในการตัดสินใจปลาคูใดไม่เป็นเครือญาติกัน โดยใช้ค่า r_{xy} น้อยกว่า 0.07 [ค่า r_{xy} ต่ำสุดในการจับคู่ระหว่างปลาที่ร่วมพ่อแม่ (half-sib)] เป็นค่าตัดสินใจปลาคูนั้นๆไม่เป็นเครือญาติกัน จากการจำลองสถานการณ์ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์แบบต่างๆ พบว่าการคัดเลือกคู่ผสมโดยพิจารณาจากค่า r_{xy} สามารถรักษาความหลากหลายได้ดีที่สุด; (1.2) การศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อเพศในปลานิลและปลาสวาย: การศึกษาใช้เทคนิค AFLP โดยในปลานิลนั้น ใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 570 คู่ไพรเมอร์ ศึกษาใน DNA pool ปลานิลเพศผู้ 4 pools เพศเมีย 4 pools (10 ตัว/pool) ในปลาสวายตรวจสอบคู่ไพรเมอร์จำนวน 102 คู่ไพรเมอร์ ใน DNA pool ปลาสวายเพศผู้ 4 pool เพศเมีย 4 pool (7-8 ตัว/pool) ไม่พบเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะกับเพศ; (1.3) ความหลากหลายของ mitochondrial DNA ในปลาครอบครัว Pangasiidae: ได้ร่วมกับโครงการ Genetic Characterization of the Threatened Mekong Pangasid Catfishes (สนับสนุนโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) ศึกษาความหลากหลายของลำดับเบสของยีน 16S rRNA ในปลาครอบครัว Pangasiidae 9 ชนิด พบว่าปลาแต่ละชนิดมีค่าความหลากหลายของแฮปโลไทป์ ต่ำจนถึงปานกลาง โดยมีค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ ต่ำมาก โดยปลานิลนั้นมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับเดียวกับปลาชนิดอื่นๆ (2) การใช้แนวทางพันธุศาสตร์และการควบคุมเพศ เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตของกึ่งกำกราม: (2.1) การผลิตกึ่งกำกรามเพศผู้ล้วนด้วยเทคโนโลยี neofemale: เนื่องจากกึ่งกำกรามเพศผู้เจริญเติบโตดีกว่าเพศเมีย การศึกษาจึงสนใจจะผลิตลูกกึ่งเพศผู้ล้วน โดยสร้างกึ่งเพศเมียที่มีพันธุกรรมเป็นเพศผู้ (genotype-ZZ เรียกว่า neofemale) เพื่อนำไปผสมกับกึ่งเพศผู้ปกติ (ZZ) แล้วจะได้ลูกเพศผู้ล้วน การสร้างกึ่ง

neofemale ทำโดยการทำลาย androgenic gland ในกึ่งเพศผู้ระยะ 45 วันหลังคว่ำ จำนวน 87 ตัว กึ่งมีอัตรารอด 70% กึ่งที่รอดชีวิตทั้งหมดเปลี่ยนเป็นเพศเมีย 21% และ กึ่งจำนวนนี้ 62% สร้างไข่ จากนั้นได้ทำการผสมกึ่ง neofemale กับเพศผู้ปกติ ได้ลูกเพศผู้ 88-100% (2.2) การปรับปรุงพันธุ์กึ่งก้ามกราม: กึ่งก้ามกรามสายพันธุ์พื้นเมืองผ่านการ domesticate มานาน อาจสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเจริญเติบโตที่ลดลง ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อจะนำข้อมูลมาเป็นแนวทางปรับปรุงพันธุ์ต่อไป โดยได้พัฒนา microsatellite primer จากกึ่งก้ามกราม 10 คู่ แล้วนำ primer จำนวน 6 คู่ ไปศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกึ่งก้ามกรามสายพันธุ์พื้นเมือง และสายพันธุ์อื่นๆ 5 สายพันธุ์ เทียบกับประชากรธรรมชาติ 2 ประชากร ผลการศึกษาแสดงว่า ประชากรโรงเพาะฟัก มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับปานกลางและไม่แตกต่างจากประชากรธรรมชาติ ดังนั้นแสดงว่าการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่ใช่สาเหตุที่ทำให้กึ่งสายพันธุ์พื้นเมืองมีลักษณะด้อยลง กึ่งแต่ละประชากรมีพันธุกรรมแตกต่างกัน จัดเป็น gene pool ที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ (3) การบูรณาการความรู้ด้านพันธุศาสตร์ เพื่อการจัดการประมงและการเพาะเลี้ยงปลาเก๋า: (3.1) ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างชนิดปลาเก๋า: โดยการศึกษาเครื่องหมาย microsatellite 6 ตำแหน่ง ในปลาเก๋า 8 ชนิด พบความแตกต่างระหว่างชนิดอยู่ในระดับสูง และ microsatellite บางตำแหน่งสามารถแสดงความแตกต่างระหว่างชนิด พบ private alleles ในปลาเก๋าทุกชนิด ยกเว้น *E. ongus*; (3.2) ความหลากหลายทางพันธุกรรมเชิงพื้นที่ (spacial variation) ของประชากรปลาเก๋าดอกแดง (*Epinephelus coioides*): ศึกษาในปลาเก๋าดอกแดง 6 ประชากรในประเทศไทยและอินโดนีเซีย โดยใช้ microsatellite 4 ตำแหน่ง ในภาพรวมความหลากหลายภายในประชากรปลาเก๋าดอกแดง มีค่าค่อนข้างต่ำ ระดับความแตกต่างระหว่างประชากร ไม่สัมพันธ์กับระยะทาง แต่สัมพันธ์กับทิศทางของกระแสน้ำ; (3.3) ความหลากหลายทางพันธุกรรมเชิงเวลา (temporal variation) ในประชากรของปลาเก๋าดอกแดงจากจังหวัดตรัง: ในการศึกษาครั้งนี้ ได้รวบรวมตัวอย่างลูกปลาเก๋า ณ อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง ซึ่งเป็นแหล่งจับลูกปลาเพื่อนำไปเลี้ยง เก็บตัวอย่างทุก 3 เดือน ตั้งแต่ มกราคม 2547 ถึง มกราคม 2548 และติดตามความหลากหลายพันธุกรรมของกลุ่มลูกปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ตลอดทั้งปี ศึกษาโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่ง พบว่าตัวอย่างเดือนกรกฎาคม มีพันธุกรรมแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ และเมื่อนำ genotype ของปลาแต่ละตัวมาศึกษาโดยวิธี assignment test ปรากฏว่าปลาที่จับในเดือนกรกฎาคมร้อยละ 83 ถูกจัดเข้าสู่กลุ่มเดิมอย่างถูกต้อง ส่วนตัวอย่างที่เก็บในช่วงเวลาอื่นๆ มีพันธุกรรมคล้ายคลึงกัน จากผลการทดลองทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่า มีปลามากกว่า 1 ประชากรในจังหวัดตรัง ซึ่งวางไข่ในเวลาที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาข้อมูลด้านอื่นๆ ประกอบ เพื่อจะสามารถจัดการทรัพยากรที่หลากหลายนี้ ให้สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืน (4) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเชลล์ 2 ชนิดในประเทศไทย: (4.1) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเชลล์ *Amusium pleuronectes*: ศึกษาลำดับเบสของ 16S rRNA ในหอยเชลล์จาก 6 แหล่งในอ่าวไทย และอีก 1 แหล่งจากฝั่งทะเลอันดามัน ความหลากหลายภายในประชากร มีค่าค่อนข้างต่ำ แสดงว่าประชากรของ *A. pleuronectes* มีขนาดเล็ก หอยจากฝั่งอ่าวไทย และทะเลอันดามัน ไม่มี haplotype ที่เหมือนกันเลย ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าไม่ควรมีการขนย้ายประชากรข้ามระหว่างอ่าว

ไทยและทะเลอันดามัน และควรนำเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีระดับความหลากหลายสูง มาใช้ศึกษาประชากรในอ่าวไทยอีกครั้งหนึ่ง เพื่อให้แน่ใจว่าประชากรเหล่านั้น แยกเป็นประชากรย่อยๆหรือไม่ก่อนที่จะออกมาตรการเกี่ยวกับการจัดการประมง; (4.2) การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของหอยเชลล์ในประเทศไทย: ศึกษาลำดับเบสของยีน 4 ตำแหน่งได้แก่ 16SrRNA, ITS1, 5.8S และ ITS2 ในหอยเชลล์ 9 ชนิด ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ 3 วิธี [maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) และ Bayesian] ซึ่งทั้ง 3 วิธีให้ผลความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเหมือนกัน โดยสรุปแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้ สอดคล้องกับวิธีการจัดจำแนกของ Waller (1991, 2006) โดยหอยเชลล์ทั้ง 9 ชนิด อยู่ใน 2 ครอบครัวย่อย คือ Pectininae และ Chlamydiae ผลการศึกษายังแสดงว่าครอบครัวย่อย Pectininae เกิดจากสายวิวัฒนาการมากกว่า 1 สาย (paraphyletic); (4.3) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเชลล์ชนิด *Mimachlamys senatoria* ในประเทศไทย: ในการศึกษานี้ได้พัฒนา microsatellite primers จาก partial DNA library ของหอยเชลล์ *M. senatoria* แล้วนำไปศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยชนิดนี้ 4 ประชากร (3 ประชากรจากอ่าวไทย และ 1 ประชากรจากฝั่งอันดามัน) ผลการศึกษาแสดงว่าประชากรจากอ่าวไทยมีความหลากหลายภายในประชากรต่ำ ส่วนประชากรฝั่งอันดามันมีค่าความหลากหลายค่อนข้างสูง มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างทุกคู่ประชากร โดยเฉพาะอย่างยิ่งประชากรในอ่าวไทย มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับประชากรจากทะเลอันดามันอย่างชัดเจน

ABSTRACT

The project comprised of four sub-projects, (1) **Genetic Approaches for Sustainability of the Mekong Giant Catfish, *Pangasianodon gigas*** which comprised of two research topics, (1.1) Application of genetic markers for designing mating plans for Mekong giant catfish (MGC): The research aimed to design mating plans for the first batch of broodstock of MGC that matured in captivity in order to avoid inbreeding. Seven microsatellite primers were scored in a total of 129 MGC brooders from seven hatcheries. Then the genetic relatedness (r_{xy}) between a brooder pair was calculated from the genotype data and used to identify the unrelated pairs that can be bred without causing inbreeding. The r_{xy} less than 0.07, which was derived from the minimum r_{xy} value of the pairing among individuals from a half-sib family, was used as a critical value for being unrelated. The results of different mating scenarios were obtained by simulation using a computer program and then compared. The results showed that the highest efficiency was obtained when the mating pairs were selected according to low r_{xy} value. (1.2) A study on sex specific markers for the Mekong giant catfish and the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*): The Amplified Fragments Length Polymorphisms (AFLP) was studied covering 570 primer pairs in MGC DNA pools (four pools of each sex, 10 individuals/pool). The study in *P. hypophthalmus* covered 102 primer pairs analyzed in eight

DNA pools (four pools of each sex, seven to eight individuals/pool). No sex specific markers were identified. (1.3) Mitochondrial DNA diversity of Pangasiid Catfishes: With a partial support from the project "Genetic Characterization of the Threatened Mekong Pangasiid Catfishes" (funded by BIOTEC, Thailand) sequences of 16S rRNA region in nine species of the Pangasiidae were studied. The results showed that haplotype diversity was low to moderate while the nucleotide diversity was very low across species. Despite of being critically endangered, the Mekong giant catfish had genetic diversity comparable to other Pangasiids. One paper was published in Animal Conservation (IF=1.35).

(2) Genetic Approach and Sex Manipulation to Improve Production Efficiency of Freshwater Prawn, *Macrobrachium*

***rosenbergii*: (2.1) The production of the all-male freshwater prawn by the neofemale**

technology: This study aimed to produce the all-male freshwater prawn because males grow faster than females. The neofemale, a female with male genotype (ZZ), was produced by removing androgenic glands of a 45-day-old male postlarva. The removal of the androgenic glands in 87 post larvae resulted in 70% survival among which 21% changed sex to female and 62% of the sex-reversed prawn produced eggs. Then 10 neofemales were mated with normal males and the progeny were 88-100% male. (2.2) Genetic improvement of freshwater prawn:

The project originated from the anecdotal information that the local strains of freshwater prawn which have been domesticated showed local adaptation but with growth retardation.

Theoretically losing of genetic variation may explain the deterioration of traits. Therefore ten microsatellite primers were developed and seven primers were used to study genetic variation of five local strains in comparison with two natural populations. The local strains had moderate genetic variation which was comparable to that of the natural populations. Therefore loss of genetic variation may not explain the deteriorated traits observed in the local strains of freshwater prawn. All populations were genetically different from each other and hence should be used as gene pools for genetic improvement. (3) **Integrating Genetic Knowledge to**

Fisheries Management and Aquaculture of Groupers: (3.1) Genetic diversity among species

of grouper: Six microsatellite loci were studied in eight species of grouper and revealed large genetic differentiation between species. Species specific alleles were observed between some species pairs. Private alleles were observed in all species but *E. ongus*; (3.2) Spatial genetic

variation among populations of *Epinephelus coioides*: Four microsatellite loci were used to study genetic variation of six populations of *E. coioides* in Thailand and Indonesia. Genetic variation within populations was low. Genetic diversity among populations did not correlate with

geographic distance but correlated with the directions of sea current; (3.3) Temporal genetic

variation of *E. coioides* in Trang Province: The samples of *E. coioides* fingerlings were collected

from Trang Province where most fingerlings for aquaculture are purchased. Samples were collected at three months interval, from January 2004 to January 2005. Then the genetic variation of each size-group was monitored throughout a year using six microsatellite loci. The overall genetic variation was moderate. The samples collected in July showed unique genetic profile. The assignment test verified the uniqueness of this group wherein 83% of individual genotypes were correctly assigned to the original group. The genetic profiles of the other sample groups were not different. The results suggested the existence of more than one populations of *E. coioides* in Trang Province. They may be separated by different spawning time. Therefore further studies are needed in order to facilitate sustainable exploitation of the resource.

(4) Genetic Diversity of scallops, *Chlamys senatoria* and *Amusium pleuronectes* in Thailand. The studies included the three following topics.

(4.1) Genetic diversity of *Amusium pleuronectes*: The variation at 16S rRNA was studied in six populations of *A. pleuronectes* in the Gulf of Thailand and one population from the Andaman Sea. The genetic variation within populations was low indicating small population size. No common haplotypes were found between the populations in the Gulf of Thailand and one from the Andaman Sea. Therefore the translocation of populations between the two coasts should be avoided. The study on genetic differentiation between populations in the Gulf should be repeated using more polymorphic markers before a management plan is made.

(4.2) Phylogenetic relationship of scallops in Thailand: The sequence variation of nine species of scallops was studied at four gene regions, 16S rRNA, ITS1, 5.8S and ITS2. Three methods of analyses [maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and Bayesian method] were employed and resulted in similar tree topologies. In conclusion the clustering according to the sequences agreed well with the systematics of Waller (1991, 2006), wherein the nine species of scallops belong to two subfamilies, Pectininae and Chamydinae. Our results also showed that the subfamily Pectininae is paraphyletic.

(4.3) Genetic diversity of *Mimachlamys senatoria* in Thailand: Four microsatellite primers were developed from a partial DNA library of *Mimachlamys senatoria*. They were subsequently used to study genetic diversity of four populations of *M. senatoria*, three from the Gulf of Thailand and one from the Andaman Sea. The results revealed low genetic variation within populations in the Gulf of Thailand while it was relatively high for a population from Andaman Sea. All population pairs were genetically different. The deep genetic divergence between the populations from the Gulf of Thailand and the Andaman Sea was observed.