

ความผันแปรทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามโดยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

Genetic variation of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) by microsatellite technique

ธีระ พัฒนจักร^{1,2}, สิริภาวี เจริญวัฒนศักดิ์¹, มนต์ชัย ดวงจินดา³ และ ยูพิน ผาสู³

Teera Patthanajak^{1,2}, Siripavee Charoenwattanasak¹, Monchai Duangjinda³ and Yupin Phasook³

บทคัดย่อ: การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามในประเทศไทยจาก 4 แหล่ง คือ ขอนแก่น (KK) สมุทรสงคราม (SK) สุราษฎร์ธานี (SR) และอ่างทอง (AT) จำนวน 100 ตัวอย่าง ศึกษาโดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 13 คู่ไพรเมอร์ และตรวจสอบชิ้นส่วนไมโครแซทเทลไลท์ที่ติดเอ็นเอด้วย 6% denaturing polyacrylamide gel พบอัลลีลทั้งหมด 105 อัลลีล เฉลี่ย 8.08 อัลลีลต่อโลคัส ค่าความถี่อัลลีลอยู่ในช่วง 0.00-0.88 ค่าเฮเทอโรไซโกสที่คาดหวังมีค่าเฉลี่ย 0.73 และค่าการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.15-0.20 พบว่า กุ้งก้ามกรามจากสมุทรสงครามกับอ่างทองมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด ขณะที่กุ้งก้ามกรามจากสมุทรสงครามกับสุราษฎร์ธานีมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด ข้อมูลจากการศึกษาความหลากหลายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการวางแผนการจัดการพันธุกรรมด้านต่างๆ ตลอดจนการอนุรักษ์พันธุกรรมกุ้งก้ามกรามต่อไป

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางพันธุกรรม กุ้งก้ามกราม ไมโครแซทเทลไลท์

Abstract: The objective of this study was to study the genetic diversity in Giant Freshwater Prawn in Thailand from 4 locations, which were Khon Kaen (KK), Samut Songkhram (SK), Surat Thani (SR) and Ang Thong (AT), with a total of 100 samples. Microsatellite technique with 13 primers and separating on 6% denaturing polyacrylamide gel were used in this study. The result showed that polymorphic loci had 105 alleles, the average number of alleles per locus was 8.08. The frequency of

¹ ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

² Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

³ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี (สบว.) สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษาและศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

² Center of Excellence on Agriculture Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research

Development Office (PERDO), Commission on Higher Education, Ministry of Education and agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

³ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

³ Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

alleles ranged from 0.00 to 0.88. The average expected heterozygosity at all loci was 0.73 and the genetic distance ranged from 0.15 to 0.20, showed that the population from Samutsongkhram and Angthong were genetic the closest, while the population from Samutsongkhram and Suratthani were the most divergent. The information about genetic diversity may be useful for management and conservation of the genetics of Giant Freshwater Prawns in the future.

Key words: genetic diversity, Giant Freshwater Prawn, microsatellite

บทนำ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) มีชื่อสามัญว่า Giant Freshwater Prawn กุ้งชนิดนี้จัดเป็นกุ้งน้ำจืดขนาดใหญ่ที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตอินโดแปซิฟิก (ทิพสุคนธ์ และจิราพร, 2548) ในประเทศไทยพบแพร่กระจายตามแหล่งน้ำจืดที่มีทางติดต่อกับทะเล แหล่งน้ำกร่อยบริเวณแม่น้ำลำคลองและทะเลสาบ (ยนต์, 2529) กุ้งก้ามกรามมีเนื้อที่มีรสชาติดีและมีราคาสูงเป็นที่นิยมของผู้บริโภคจึงจัดเป็นสัตว์น้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทย ผลผลิตของกุ้งก้ามกรามนั้นได้มาจากการจับจากแหล่งน้ำธรรมชาติและการเพาะเลี้ยง แต่ปัจจุบันกุ้งก้ามกรามที่จับจากธรรมชาติมีปริมาณลดจำนวนน้อยลงเรื่อยๆ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญที่จะทำการเพิ่มผลผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการบริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ การผลิตกุ้งก้ามกรามที่ดี มีคุณภาพจะต้องมีพ่อแม่พันธุ์ที่เจริญเติบโตได้ดี แข็งแรง ทนต่อโรคและสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ดี ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาข้อมูลต่างๆ ด้านพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามอย่างละเอียด เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลต์ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในการศึกษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ในปัจจุบัน เนื่องจากไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอมีเป็นจำนวนมากและกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนมและมีความหลากหลายของอัลลีลสูง นอกจากนี้ยังมีข้อได้เปรียบกว่าเครื่องหมายพันธุกรรมอื่นๆ อีกหลายประการ เช่น ใช้ปริมาณตัวอย่างดีเอ็นเอที่น้อยกว่าและไม่จำเป็นต้อง

มีคุณภาพดี อีกทั้งยังใช้เวลารวดเร็วจึงได้มีการศึกษาพัฒนาและประยุกต์ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์กันอย่างกว้างขวาง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามในประเทศไทยเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปใช้ในการปรับปรุงและผลิตสายพันธุ์ที่มีคุณภาพ อีกทั้งยังนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์วางแผนการอนุรักษ์สายพันธุ์ดั้งเดิมไว้ไม่ให้สูญพันธุ์ และจัดการด้านพันธุกรรมต่างๆ ของกุ้งก้ามกรามได้ทันทั่วทั้งและมีประสิทธิภาพ อันจะนำมาซึ่งสายพันธุ์ที่มีคุณภาพ และดำรงทรัพยากรกุ้งก้ามกรามให้ยั่งยืนสืบไป

วิธีการศึกษา

เก็บรวบรวมตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย จำนวน 4 จังหวัด ได้แก่ ขอนแก่น (KK) สมุทรสงคราม (SK) สุราษฎร์ธานี (SR) และอ่างทอง (AT) จำนวนแหล่งละ 25 ตัว รวมทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง โดยเก็บรักษาตัวอย่างกุ้งก้ามกรามใน Absolute ethanol (Kirby, 1990) ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟิโนลคลอโรฟอร์มโดยดัดแปลงจาก (Sambrook and Russell, 2001) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 0.8% agarose gel และ spectrophotometer ปรับความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยไพรเมอร์ที่ได้จาก สิริ

ภาวี่ และคณะ (2549) จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ คือ DTLSH-7, DTLSH-9 และ DTLSH-12 และที่ได้จาก Charoentawee et al. (2006) จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ คือ Mbr-1, Mbr-2, Mbr-3, Mbr-4, Mbr-5, Mbr-7, Mbr-8, Mbr-9, Mbr-10 และ Mbr-11 (Table 1) ตรวจสอบชิ้นส่วนของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วย 6% denaturing polyacrylamide gel ด้วยกระแสไฟฟ้า 90 V. เป็นเวลา 75 นาที จากนั้นบันทึกภาพและตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสำหรับเป็นข้อมูลไว้ใช้วิเคราะห์ผลทางสถิติต่อไป

การวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการวิเคราะห์สภาพความหลากหลายทางพันธุกรรม คือ 1) วิเคราะห์ค่าความถี่ยัลลิล 2) คำนวณค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต 3) คำนวณค่าเฮเทอโรไซโกซิตีคาดหวัง และการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม คือ 1) วิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม 2) สร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามจาก 4 แหล่งของประเทศไทยพบว่ามีอัลลีลรวมทั้งหมด 105 อัลลีลและจำนวนอัลลีลเฉลี่ยมีค่า 8.08 อัลลีลต่อโลคัส ค่าความถี่ยัลลิลอยู่ในช่วง 0.00-0.88 โดยค่าความถี่ยัลลิลสูงสุดพบในอัลลีลที่ 2 ของไพรเมอร์ DTLSH-9 ในตัวอย่างกลุ่ม SR เมื่อคำนวณค่าเฮเทอโรไซโกซิตีสังเกตมีค่าเฉลี่ย 0.55 และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีคาดหวังมีค่าเฉลี่ย 0.73 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chareontawee et al. (2007) ที่ศึกษาความหลากหลายกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟักของประเทศไทยพบว่ามีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีสังเกตมีค่าเฉลี่ย 0.62 และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีคาดหวังมีค่าเฉลี่ย 0.74 แสดงให้เห็นว่าประชากรกุ้งก้ามกรามที่ทำการศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ค่า

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.15-0.20 พบว่า กุ้งก้ามกรามจาก SK กับ SR มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด ส่วน AT กับ SK มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด จาก Figure 1 แสดงแผนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่า กลุ่มกุ้งก้ามกรามจาก SR มีพันธุกรรมแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ มากที่สุด และสามารถแบ่งกุ้งก้ามกรามได้อีก 2 กลุ่ม ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน คือ กลุ่มกุ้งก้ามกรามจาก KK และกลุ่มที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากที่สุด คือ กลุ่มกุ้งก้ามกรามจาก AT กับ SK ทั้งนี้อาจมีผลมาจากลักษณะทางภูมิศาสตร์หรือมีการนำพ่อแม่พันธุ์จากต่างถิ่นมาเพาะพันธุ์แล้วปล่อยลูกพันธุ์หรือมีการหลุดรอดลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาค่าความหลากหลายของกุ้งก้ามกรามทั้ง 4 กลุ่มประชากร ได้แก่ ขอนแก่น สมุทรสงคราม สุราษฎร์ธานี และอ่างทอง รวมทั้งสิ้น 100 ตัวอย่างด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 13 คู่ไพรเมอร์ แสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามในแต่ละพื้นที่มีความหลากหลายแตกต่างกัน โดยกุ้งก้ามกรามจากสุราษฎร์ธานีมีพันธุกรรมแตกต่างจากกลุ่มอื่นมากที่สุด และกุ้งก้ามกรามจากสมุทรสงครามและอ่างทองมีพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากที่สุด ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าทรัพยากรกุ้งก้ามกรามยังคงมีความหลากหลายและแตกต่างกันในแต่ละแหล่งที่มา จึงเห็นว่าการมีการศึกษาวิจัยพันธุกรรมกุ้งก้ามกรามในประเทศไทยอย่างจริงจังและละเอียดยิ่งขึ้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนการจัดการพันธุกรรมด้านต่างๆ ตลอดจนการอนุรักษ์พันธุกรรมกุ้งก้ามกรามให้ยั่งยืนต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการและศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น และได้รับการสนับสนุนสถานที่ทำการวิจัยจากภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการประมง ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตลอดจนได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. จอมสุตา ดวงวงษา ที่เก็บรวบรวมตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจากจังหวัดสมุทรสงคราม และสุราษฎร์ธานี

เอกสารอ้างอิง

ทิพสุคนธ์ พิมพ์พิมล และจิราพร โรจน์ทินกร. 2548. ชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ การประมวลองค์ความรู้เกี่ยวกับสถานภาพการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในประเทศไทย. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย คณะเทคโนโลยีการประมง และทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 210 หน้า.

ยนต์ มุสิก. 2529. การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 146 หน้า.

ศิริภาวี เจริญพัฒนศักดิ์, รักพงษ์ เพชรคำ, อรุณพงษ์ ศรีสาพร และพรเทพ เนียมพิทักษ์. 2549. การพัฒนาและประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลด้วยไมโครแซทเทลไลท์ในกุ้งก้ามกราม. บทคัดย่องานวิจัย หมวดงบประมาณเงินรายได้ ทุนปีงบประมาณปี พ.ศ. 2549.

Charoentawee, K., S. Poompuang, and U. Na-Nakorn. 2006. Isolation and characterization of microsatellites in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Molecular Ecology Notes.

Charoentawee, K., S. Poompuang, U. Na-Nakorn, and W. Kamonrat. 2007. Genetic diversity of hatchery stocks of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Thailand. Aquaculture. 207 : 121-129.

Kirby, L.T. 1990. DNA Fringerprint: An Introduction Stockton Press. USA. 165 p.

Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

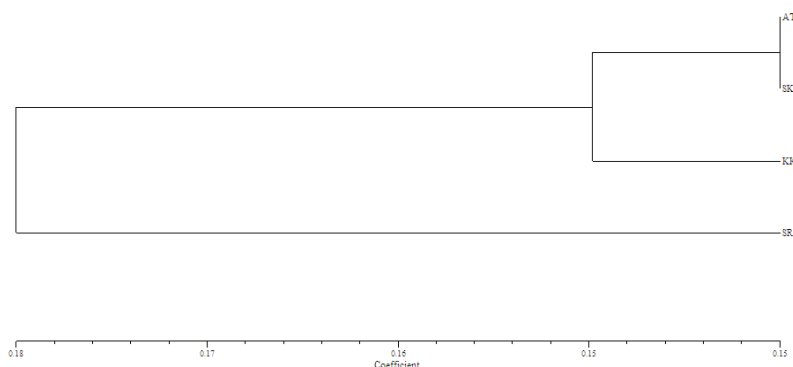


Figure 1 Diagram shows correlated evolution of Giant Freshwater Prawn in Thailand

Table 1 Primers used in genetic diversity study of Giant Freshwater Prawn in Thailand

No.	Primer	Nucleotide sequence 5'→3'	T _a (°C)	Size rang(bp)
1	DTLSH-7	F: AACGAAACCAAAATATCTTACC R: AGGCAGTGATGTATCAGCTG	60	131
2	DTLSH-9	F: AATTGTTGCCTTCGTACGGG R: AACAAAGCCGAGCAAAACCG	60	210
3	DTLSH-12	F: TCGCTGGAAACACGAATGG R: AAAGCTTAGGGGTTGAGTGG	60	193-205
4	Mbr-1	F: CCCACCATCAATTCTCACTTACC R: TCCTTTTCACATCGTTCCAGTC	60	272-320
5	Mbr-2	F: TTCCCGACCAATTTCTCTTTCTC R: GGCAAAAATGATCTTGGAATTCAC	60	298-336
6	Mbr-3	F: CAACTCTATGTTTCGGCATTGG R: GGGGAATTTACCGATGTTTCTG	62	232-284
7	Mbr-4	F: CCACCTACCGTACATTCCAAAC R: CGGGGCGACTTTTAGTATCGAC	62	288-326
8	Mbr-5	F: CAAGGCTCGTGTCTCTGTTTC R: GCTTGTA CTGTTTCAGCTTTTGC	62	286-328
9	Mbr-7	F: ATAAAAGAGTCGCCAAATGAGCA R: ATTGGGAATTGTTGACCTCCAAG	62	274-286
10	Mbr-8	F: AACCAGCCGACTTAGACTGTGC R: CGCCATTGCGTCTATCTCTTAC	62	256-266
11	Mbr-9	F: TTGTTTGCTTGTTTAGTGTCAAGG R: CTCCAAAACCGAAAAATCCTCAC	60	240-284
12	Mbr-10	F: ATGACGATGATGAGGAATGAAGC R: TTTCAGGCTATATCAAGCAACAG	60	241-265
13	Mbr-11	F: GTATTGAGAACAAAGGCGCACAG R: ATCTCTTTCCAAAACAGGGCACA	60	263-291