Journal of Research Methodology, Volume 16, Number 3 (July - September 2003)

วารสารวิธีวิทยาการวิจัย ปีที่ 16 ฉบับที่ 3 (กรกฎาคม - กันยายน 2546)

Genetic Diversity and Population Structure of the Black Tiger shrimp, Penaeus monodon, in Thailand Revealed by Microsatellite Markers

Anchalee Tassanakajon

ABSTRACT

Genetic variation and differentiation of the black tiger shrimp (Penaeus monodon) collected from 5 geographic locations (Chumphon and Trat from the Gulf of Thailand; Phangnga, Satun and Trang from the Andaman Sea) were examined using microsatellite markers. The mean number of alleles (21.0-26.6) and the average heterozygosity (0.78) across five microsatellite loci indicate high levels of genetic diversity in this species Geographic heterogeneity analysis showed significant differences between the Andaman and Trat samples (P<.001) and between the two populations from the Gulf of Thailand, Chumphon and Trat, whereas those of the Andaman samples were genetically similar (P>.05). Surprisingly, the Chumphon P. monodon was genetically more similar to the Andaman than to Trat samples which may result from the transfer of stocks from the Andaman to this area. Our study provides a basic knowledge that is useful for genetic improvement and management of this species. Enhancing of natural populations with hatchery-reared larvae without any consideration on the characteristics of P. mondon gene pool should be concerned.

Journal of Research Methodology, Volume 16, Number 3 (July - September 2003)

วารสารวิธีวิทยาการวิจัย ปีที่ 16 ฉบับที่ 3 (กรกฎาคม - กันยายน 2546)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรกุ้งกุลาดำในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์*

อัญชลี ทัศนาขจร

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างกุ้งจาก 5 แหล่ง ได้แก่ กุ้งสตูล ตรังและพังงาจากฝั่งอันดามัน กุ้งชุมพรและตราดจากอ่าวไทย โดยเลือกใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในการศึกษา พบว่ากุ้งกุลาดำในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 5 โลกัส โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลในแต่ละกลุ่มตัวอย่างตั้งแต่ 21.0 ถึง 26.6 อัลลีล และมีค่าเฉลี่ยของเฮเทอโรไซโกซิตี้เท่ากับ 0.78 จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมพบว่ากุ้งอันดามันมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากกุ้งอ่าวไทย($P<.001$) และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สามารถแยกความแตกต่างภายในกุ้งจากอ่าวไทยคือกุ้งชุมพรและกุ้งตราด ($P<.001$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากรกุ้งจากอันดามัน ($P>.05$) ที่น่าแปลกใจคือกุ้งชุมพรมีพันธุกรรมใกล้ชิดกับกุ้งอันดามันมากกว่ากุ้งตราดที่อยู่ในฝั่งเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดการปะปนพันธุกรรมเนื่องจากการเคลื่อนย้ายกุ้งอันดามันมาเลี้ยงในแถบนี้ ผลการวิจัยนี้ให้ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำในประเทศไทย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำของไทยและต่อนโยบายการประมงให้มีการเพิ่มความระมัดระวังในการเคลื่อนย้ายแม่พันธุ์หรือลูกกุ้งจากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่ง ตลอดจนการวางแผนการที่เหมาะสมในการปล่อยลูกพันธุ์กุ้งคืนสู่ธรรมชาติเพื่อไม่ให้มีการปะปนระหว่างประชากรที่มีพันธุกรรมแตกต่างกัน อันจะทำให้สูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมและอาจทำลายลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์ได้

* งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ทุนวิจัยสมทบจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทุนวิจัยบางส่วนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

บทนำ

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีผลผลิตต่อปี 2-3 แสนตัน ซึ่งผลผลิตกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่มาจากการเพาะเลี้ยง ปัจจุบันมีพื้นที่การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำประมาณ 5 แสนไร่ กระจายอยู่ทั่วประเทศ โดยเฉพาะบริเวณชายฝั่งทะเล และมีปริมาณการส่งออกกุ้งเป็นอันดับหนึ่งของโลก โดยในแต่ละปีสามารถส่งออกกุ้งได้ไม่น้อยกว่าสองแสนตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 8 หมื่นถึงหนึ่งแสนล้านบาท (Rosenberry, 2000) แม้ว่าที่ผ่านมาเราจะประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ แต่การขยายตัวอย่างรวดเร็วทำให้เกิดปัญหาต่าง ๆ ขึ้น เช่น ปัญหาการทำลายระบบนิเวศน์ชายฝั่งของ นากุ้ง ปัญหาโรคระบาด รวมทั้งปัญหาการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์กุ้งเนื่องจากกุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่เจริญวัย (maturation) ในบ่อเลี้ยงได้ยากทำให้เกษตรกรต้องอาศัยพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติเท่านั้น ปัจจุบันมีความพยายามที่จะผลิตพ่อแม่พันธุ์จากกุ้งในบ่อเลี้ยงและทำการคัดเลือกกุ้ง เพื่อผลิตกุ้งที่ต้านทานต่อโรค และมีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว (Withyachamnarnkul และคณะ, 1998) จึงต้องมีการจัดการทางพันธุกรรมให้ถูกต้องเหมาะสม ซึ่งจะนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์กุ้งเพื่อเพิ่มผลผลิต แม้ว่ากุ้งจะเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญแต่การศึกษาพันธุกรรมในกุ้งยังมีอยู่น้อยมาก ปัจจุบันแหล่งพ่อแม่พันธุ์กุ้งมาจากฝั่งทะเลอันดามันและอ่าวไทย แต่เกษตรกรนิยมพ่อแม่พันธุ์ที่มาจากฝั่งอันดามันมากกว่าเพราะเชื่อว่าให้ลูกที่แข็งแรงและมีอัตราการรอดสูงกว่า ทำให้ราคาพ่อแม่พันธุ์จากอันดามันสูงกว่าอ่าวไทย 4-5 เท่า ซึ่งยังไม่มีหลักฐานและการทดลองที่ยืนยันว่ากุ้งทั้ง 2 ฝั่งนี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจริง และยังไม่มีเครื่องหมายที่ใช้แยกระหว่างกุ้งทั้ง 2 ฝั่งนอกจากการดูจากลักษณะภายนอก

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของกุ้งกุลาดำในประเทศไทยเป็นความรู้พื้นฐานที่สำคัญต่อการจัดการพันธุกรรมของกุ้งเพื่อการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งต้องการเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic markers) ที่มีประสิทธิภาพในการบ่งชี้ลักษณะและความแตกต่างของกุ้งได้อย่างถูกต้องแม่นยำและสามารถแยกความแตกต่างที่เกิดเนื่องจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจมีผลต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกุ้งที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ทำให้ได้สายพันธุ์ด้อยซึ่งจะส่งผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตกุ้งของประเทศ

เครื่องหมายพันธุกรรม (genetic markers)

การแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของกุ้งโดยดูจากลักษณะทางสันฐานวิทยา เช่น ความยาวของลำตัวและกรี ความกว้างของแพนหาง สีของเปลือก ทำให้ขาดความแม่นยำในการจำแนกกุ้ง เนื่องจากลักษณะเหล่านี้มักได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมมากกว่ายีน ปัจจุบันเทคนิคทางด้านอณูพันธุศาตร์และพันธุวิศวกรรมมีความก้าวหน้าเป็นอย่างมาก ทำให้สามารถตรวจสอบ

ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ในระดับโมเลกุล (Hoelzel, 1998) โดยอาศัยโมเลกุลเครื่องหมายซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. เครื่องหมายโปรตีน

โปรตีนที่ใช้เป็นเครื่องหมายแยกความแตกต่างส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ เพราะสามารถติดตามโปรตีนด้วยการย้อมแอคติวิตี้ของเอนไซม์ได้ง่าย อัลโลไซม์ (allozymes) เป็นเอนไซม์ที่สร้างจากรหัสของยีนที่ตำแหน่ง (locus) เดียวกัน แต่มีความแตกต่างหลายรูปแบบหรือเรียกว่ามีหลายอัลลีล (allele) เนื่องจากมีกรดอะมิโนบางตัวต่างกัน ซึ่งสามารถตรวจแยกความแตกต่างของอัลลีลได้โดยเทคนิค อัลโลไซม์อิเลคโตรโฟริซิส (Richardson และคณะ, 1986) ซึ่งเป็นการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า อัลโลไซม์ที่มีกรดอะมิโนต่างกันและมีประจุต่างกันจะวิ่งไปในกระแสไฟฟ้าได้ต่างกันจึงถูกแยกออกมา การจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยใช้เครื่องหมายโปรตีนทำได้ง่าย รวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและสามารถนำมาใช้ตรวจตัวอย่างจำนวนมากได้ แต่มีข้อเสียคืออัลโลไซม์มีความแตกต่างแปรผันในระดับต่ำ โดยทั่วไปแต่ละตำแหน่งของอัลโลไซม์จะมีความแตกต่างน้อยมาก คือมีจำนวนอัลลีลเพียง 1-2 อัลลีล จึงให้ข้อมูลที่ไม่ละเอียดและมักใช้ได้ไม่ดีในสปีชีส์ที่มีความหลากหลายในระดับต่ำ

2. เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายมีทั้งดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียสและในไมโตคอนเดรีย เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ละเอียดและถูกต้องกว่าเครื่องหมายโปรตีน และปัจจุบันการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอส่วนใหญ่ใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วนำไปวิเคราะห์แยกความแตกต่าง จึงใช้ปริมาณตัวอย่างในการตรวจสอบเพียงเล็กน้อย วิธีการตรวจง่ายและรวดเร็วกว่าเดิมที่ใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs)

2.1 ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย มีการถ่ายทอดดีเอ็นเอทางแม่เท่านั้น (maternal inheritance) และมีอัตราการเกิดมิวเตชั่นสูงกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียสถึง 10 เท่า จึงใช้เป็นเครื่องหมายแยกความแตกต่างของกลุ่มประชากรได้ดี แต่มีข้อเสียคือความแตกต่างที่พบจากการตรวจดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย ถือเป็นความแตกต่างที่ตำแหน่งเดียว (single locus) และแม้ว่าจะพบความหลากหลายของดีเอ็นเอแต่ความถี่ที่พบในแต่ละรูปแบบจะต่ำ โดยจะมีเพียง 1 หรือ 2 รูปแบบที่พบมาก (Roff และ Bentzen, 1989)

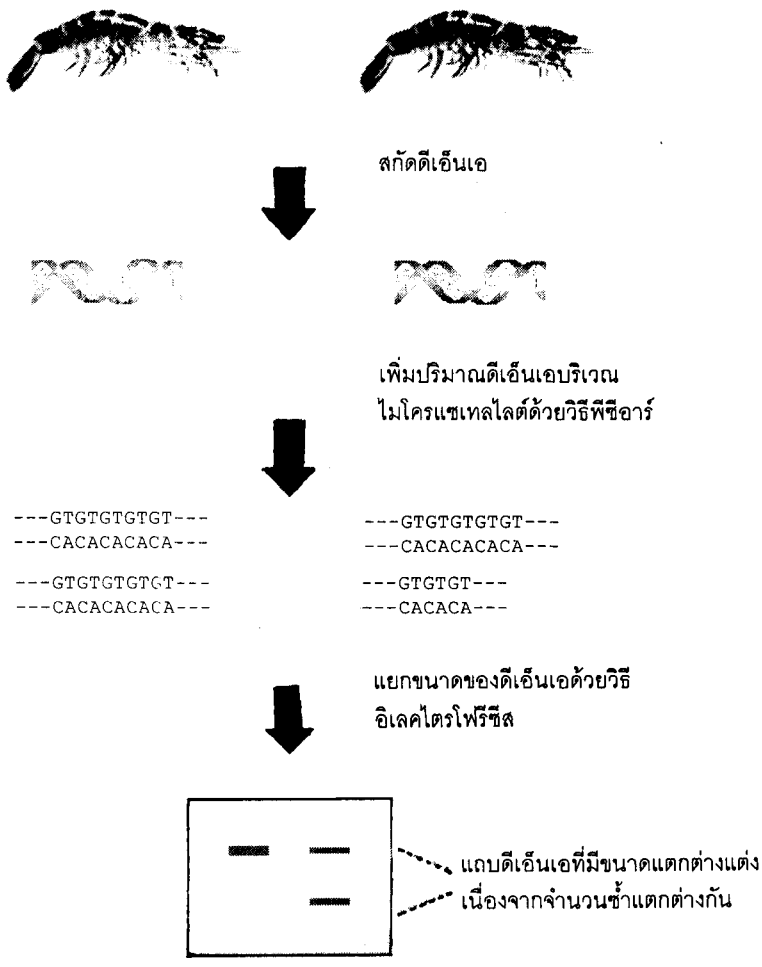
2.2 ดีเอ็นเอในนิวเคลียส ที่ใช้เป็นเครื่องหมายแยกความแตกต่างได้ดีเป็นส่วนของ

ดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ยีน (non-coding sequences) โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นลำดับเบสซ้ำ (repetitive sequences) เช่น มินิแซเทลไลต์ และไมโครแซเทลไลต์

เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์

ไมโครแซเทลไลต์เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำช่วงสั้น ๆ โดยหน่วยซ้ำส่วนใหญ่เล็กกว่า 6 คู่เบส เช่น (GT)n, (CAT)n, (GATA)n กระจายอยู่ทั่วไปในโครโมโซม ไมโครแซเทลไลต์แต่ละตำแหน่งมีความแตกต่างแปรผันสูง เนื่องมาจากจำนวนซ้ำที่แตกต่างกันในแต่ละตำแหน่ง (Tautz, 1989) การตรวจความแตกต่างของไมโครแซเทลไลต์ที่ตำแหน่งต่าง ๆทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอแล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนไมโครแซเทลไลต์โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาออกแบบจากลำดับเบสขนาบข้าง (flanking regions) ของไมโครแซเทลไลต์แต่ละตำแหน่ง แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกความแตกต่างของขนาดด้วยอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส (รูปที่ 1) ข้อดีของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ คือบริเวณที่ตรวจเป็นดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ ดังนั้นดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจไม่จำเป็นต้องมีคุณภาพดีก็ตรวจได้ ตัวอย่างที่ใช้จึงไม่จำเป็นต้องเป็นตัวอย่างสด อาจแช่อยู่ในเอทธานอลหรือแช่แข็งมาก็ได้ และใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจสอบน้อยอาจใช้ตัวอย่างจากเศษเนื้อเยื่อหรือคราบเลือด นอกจากนี้ที่แต่ละตำแหน่งจะมีความหลากหลายแตกต่างกันจึงสามารถเลือกตำแหน่งที่ตรวจให้เหมาะสมได้ เช่น ถ้าต้องการแยกความแตกต่างภายในกลุ่มประชากร มักจะเลือกตำแหน่งที่มีความหลากหลายไม่สูงมากนัก แต่ถ้าต้องการจำแนกครอบครัวหรือแยกความแตกต่างแต่ละตัวตนจะเลือกตรวจในตำแหน่งที่มีความหลากหลายสูง เช่น ตำแหน่งที่มีจำนวนอัลลีลมากกว่า 5 อัลลีลขึ้นไป

ในกุ้งกุลาดำมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิคอัลโลไซม์อิเลคโตรโฟรีซีส แต่พบความแตกต่างค่อนข้างน้อย (Benzie และคณะ, 1992) ต่อมาได้ใช้เทคนิค mitochondrial RFLPs (mtDNA-RFLPs) และการหาลำดับการเรียงตัวของรหัสบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำในออสเตรเลีย และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกุ้งกุลาดำในเขตตะวันตกและในเขตทิศเหนือ และฝั่งตะวันออกของออสเตรเลีย (Benzie และ คณะ,1993) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการตรวจความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอสามารถนำมาใช้ในการศึกษากุ้งได้ดีกว่าเทคนิคอัลโลไซม์อิเลคโตรโฟรีซิส เนื่องจากความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอาจไม่ทำให้โปรตีนมีประจุต่างกัน จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ในระดับของโปรตีน



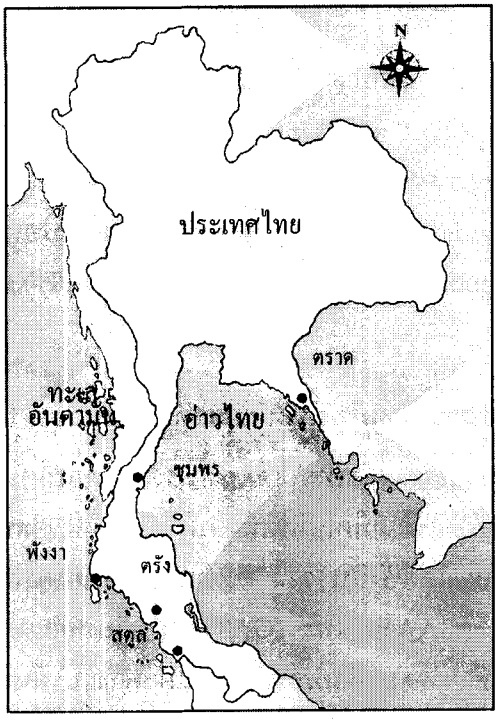
รูปที่ 1 การตรวจความแตกต่างของไมโครแซเทลไลต์ทำโดยการสกัดดีเอ็นเอแล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนไมโครแซเทลไลต์โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกความแตกต่างของขนาดด้วยอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของกุ้งกุลาดำในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้จะเป็นพื้นฐานต่อการจัดการทางพันธุกรรม เพื่อคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ การจัดการเกี่ยวกับโปรแกรมคัดพันธุ์ของกุ้งในบ่อเพาะเลี้ยงและการจัดการในเชิงอนุรักษ์ไม่ให้มีการปะปนของสายพันธุ์ (mixed stocking) อันจะทำให้สูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม และอาจทำลายลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างกุ้งและสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำในประเทศไทยจำนวน 5 แหล่ง เป็นกุ้งจากฝั่งอันดามัน 3 แหล่ง คือ สตูล ตรังและ พังงา กุ้งจากฝั่งอ่าวไทย 2 แหล่ง คือ ตราด และชุมพร (รูปที่ 2) โดยแต่ละแหล่งทำการเก็บกุ้งประมาณ 50 ตัว ตัดส่วนปลายของขาว่ายน้ำนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (Phenol-chloroform extraction) (Tassanakajon และคณะ, 1997) ดีเอ็นเอที่เตรียมโดยวิธีนี้จะนำไปใช้ในการสร้างห้องสมุดยีน สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างกุ้งจากแหล่งต่างๆ เพื่อตรวจความแตกต่างของไมโครแซทเทลไลต์ เตรียมโดยวิธี alkaline extraction โดยนำตัวอย่างประมาณ 10 mg มาตัดและล้างด้วย 250 µl sterile distilled water ปั่นแยกน้ำออก เติม 20 µl 0.2 M NaOH บ่มที่ 75 °C เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 100 µl 0.04 M Tris-HCl pH 7.5 ผสมให้เข้ากัน ปั่นแยกเอาส่วนสารละลายไปใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ปริมาณสารละลายจำนวน 5 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา



รูปที่ 2 แสดงบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในกุ้งกุลาดำ

สร้างห้องสมุดยีนของกุ้งกุลาดำและแยกหาโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์ โดยใช้วิธีโคโลนีไฮ-บริไดเซชั่นด้วยดีเอ็นเอติดตามแบบต่างๆ เช่น $(GT)_{15}$ $(CT)_{15}$ และ $(GAA)_8$ เป็นต้น ตรวจวัดสัญญาณด้วยเทคนิคออโตเรดิโอกราฟี หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ขนาบข้างไมโครแซทเทลไลต์ ปรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ (Tassanakajon และคณะ, 1998) นำตัวอย่างกุ้งจากแหล่งธรรมชาติมาวิเคราะห์หาจำนวนอัลลีลและค่า heterozygosity ของไมโครแซทเทลไลต์แต่ละตำแหน่งที่แยกได้

การตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของกุ้งกุลาดำในประเทศไทย

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างกุ้งในแหล่งต่าง ๆ มาตรวจหาความแตกต่างแปรผันที่ไมโคร-แซทเทลไลต์ 5 ตำแหน่ง นับจำนวนอัลลีล การกระจายของอัลลีล และค่า heterozygosity ในแต่ละกลุ่มประชากร คำนวณค่า effective number of allele (n_e) จากสูตร $n_e = 1/\Sigma P^2$ เมื่อ P = ค่า allelic frequencies เมื่อนำมาคำนวณเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกุ้งจากทะเลอันดามันกับกุ้งอ่าวไทย และภายในกุ้งที่อยู่ฝั่งเดียวกันโดยใช้โปรแกรม GENEPOP (Raymond และ Rousset, 1995) หาค่า genetic distance ระหว่างกลุ่มตัวอย่างจาก Cavalli-Sforza and Edwards (1967) chord distance โดยใช้โปรแกรม GENDIST วิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยสร้าง Neighbor-joining tree โดยใช้โปรแกรม PHYLIP (Felsenstein, 1993)

ผลการวิจัย

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในกุ้งกุลาดำ

ในแยกหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ทำการตรวจสอบโคโลนีทั้งสิ้น 40,190 โคโลนี จากห้องสมุดยีนของกุ้งกุลาดำ แล้วนำโคโลนีที่ให้ผลบวกกับตัวตรวจสอบแบบต่างๆ มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบไมโครแซทเทลไลต์ทั้งสิ้น 234 ตำแหน่ง โดยไมโครแซทเทลไลต์ที่พบมาก ได้แก่ (AG)n, (GT)n, (AT)n, (GAA)n และ (GATA)n เมื่อออกแบบไพรเมอร์สามารถใช้เป็นเครื่องหมายได้ 25 โลกัส ทำการตรวจวิเคราะห์ความแตกต่างแปรผันของไมโครแซทเทลไลต์แต่ละตำแหน่งที่แยกได้ พบว่าโลกัสส่วนใหญ่มีความแปรผันสูงมีเพียง 3 โลกัส ที่ไม่มีความแปรผัน (monomorphic loci) และโลกัสที่มีความแปรผันมากที่สุดคือ CUPmo9 ซึ่งมีจำนวนอัลลีล 33 อัลลีล และมีค่าเฮเทอโรไซโกซิตี้ 0.90 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างลักษณะเบสซ้ำของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ของกุ้งกุลาดำที่โลกัสต่าง ๆ ที่แยกได้ขนาดและจำนวนอัลลีลและค่าเฮเทอโรไซโกซิตี้

โลกัส	ลักษณะไมโครแซเทลไลต์	ขนาดของอัลลีล	จำนวนอัลลีล (จำนวนตัวอย่าง)	ค่า Observed heterozygosity
CUpmo 1	$(GAA)_{43}$	224-326	29(51)	0.73
CUpmo 2	$(ATCT)_{12}(TA)_{10}(TAGA)_{3}$	137-217	28(51)	0.78
CUpmo 3	$(ATCT)_{12}(TA)_{9}(GA)_{9}$	135-223	27(49)	0.63
CUpmo 4	$(CT)_{10}TG(CT)_{17}(ATCT)_{10}$	206-256	21(45)	0.89
CUpmo 6	$(GATA)_{6}(GA)_{16}$	166-242	27(49)	0.69
CUpmo 7	$(CT)_{15}(ATCT)_{9}$	172-234	21(43)	0.16
CUpmo 9	$(TA)_{49}$	274-380	33(40)	0.90
CUpmo 11	$(TAA)_{9}TGA(TAA)3$	132-162	10(47)	0.81
CUpmo 12	$(GA)_{18}$	83-105	8(40)	0.53
CUpmo 13	$(TCA)_{9}$	271-316	12(43)	0.86
CUpmo 14	$(GT)_{9}CAG(GT)_{3}$	275-281	4(40)	0.57
CUpmo 15	$(TAA)_{10}$	267-351	15(41)	0.68
CUpmo 16	$(CAT)_{8}$	224-233	4(44)	0.48
CUpmo 18	$(GT)_{60}$	104-168	28(42)	0.83
CUpmo 19	$(GA)_{46}$	300-345	15(46)	0.80
CUpmo 20	$(TTA)_{5}TTG(TTA)_{5}$	166-196	17(22)	0.14

ความหลากหลายทางทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของกุ้งกุลาดำในประเทศไทย

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้งกุลาดำ 5 กลุ่มคือ สตูล ตรัง พังงา ตราด และ ชุมพร ตรวจความแปรผันที่ไมโครแซเทลไลต์ 5 ตำแหน่ง คือที่โลกัส CUPmo 18, Di 25, Di 27, CUPmo1, และ CUPmo2 พบว่ากุ้งกลุ่มต่าง ๆ มีจำนวนอัลลีลและการกระจายของอัลลีลแตกต่างกัน โดยจำนวนอัลลีลที่พบจากการตรวจไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 5 โลกัสมีค่าตั้งแต่ 19 ถึง 30 อัลลีล และมีค่า heterozygosity อยู่ในช่วง 0.49-0.83 (ตารางที่ 2) และพบว่ากุ้งอ่าวไทย (ชุมพรและตราด) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่ากุ้งจากอันดามัน(สตูล ตรัง พังงา)

ตารางที่ 2 ค่าความแตกต่างแปรผันของไมโครแซเทไลต์ทั้ง 5 โลกัสที่พบในประชากรกุ้งกุลาดำไทย

ตัวอย่าง โลกัส	สตูล	ตรัง	พังงา	ชุมพร	ตราด
CUPmo 18					
จำนวนตัวอย่าง	32	35	30	42	39
ขนาด (bp)	106-162	104-172	106-160	104-168	106-144
จำนวนอัลลีล	23	24	21	28	20
เฮเทอโรไซโกซิตี้	0.56	0.49	0.77	0.83	0.77
Di24*					
จำนวนตัวอย่าง	36	35	28	37	48
ขนาด (bp)	140-208	140-208	136-208	142-202	140-188
จำนวนอัลลีล	24	23	19	23	20
เฮเทอโรไซโกซิตี้	0.78	0.77	0.61	0.70	0.69
Di27*					
จำนวนตัวอย่าง	32	38	25	49	40
ขนาด (bp)	114-174	122-176	122-178	118-172	124-178
จำนวนอัลลีล	20	25	20	28	28
เฮเทอโรไซโกซิตี้	0.75	0.71	0.80	0.84	0.95
CUPmo1					
จำนวนตัวอย่าง	32	35	31	38	51
ขนาด (bp)	221-338	236-332	236-314	218-326	224-326
จำนวนอัลลีล	25	27	23	30	28
เฮเทอโรไซโกซิตี้	1.00	0.71	0.90	0.82	0.75
CUPmo2					
จำนวนตัวอย่าง	31	34	31	36	51
ขนาด (bp)	143-217	147-219	147-221	147-217	137-217
จำนวนอัลลีล	18	20	22	24	28
เฮเทอโรไซโกซิตี้	0.84	0.85	0.81	0.89	0.78

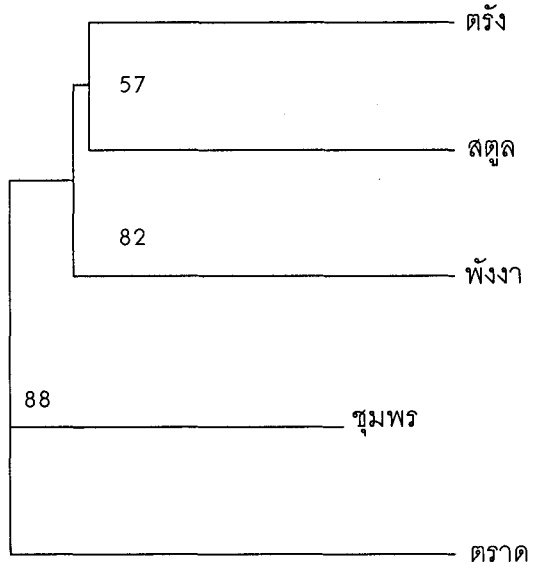
* ไพร์เมอร์ของโลกัสนี้ได้มาจากการแลกเปลี่ยนกับ Dr.F.Bonhomme, Laboratoire Genome et Populations, Universite de Montpellier, France

เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีจำนวนค่อนข้างน้อย แต่ไมโครแซเทลไลต์มีความแปรผันสูงและมีบางอัลลีลที่พบน้อยหรือพบเพียงครั้งเดียว ดังนั้นค่าที่จะบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี คือค่าจำนวนอีลลีลที่มีผล ในรุ่นต่อไป (effective number of allele, ne) ที่คำนวณจากสูตร ne = $1/\Sigma P^2$ เมื่อ P = ค่าความถี่ของอัลลีล จากค่า ne พบว่ากุ้งชุมพรมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงสุด (ne = 20.4) และกุ้งสตูลมีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด (ne = 13.1) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีล และเฮเทอโรไซโกซิตี้จากการตรวจด้วยเครื่องหมายไมโคร-แซเทลไลต์ 5 โลกัสในตัวอย่างกุ้งของไทย

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีล	จำนวนอัลลีลที่มีผลในรุ่นต่อไป	ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตี้	
			ค่าที่พบจริง (H_o)	ค่าที่คาดหวัง (H_e)
สตูล	22.0	13.1	0.79	0.94
ตรัง	23.8	16.4	0.71	0.95
พังงา	21.0	14.3	0.78	0.95
ชุมพร	26.6	20.4	0.82	0.95
ตราด	24.8	15.9	0.79	0.94

จากค่าความถี่ของอัลลีลเมื่อนำมาคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (genetic distance = d) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกุ้งแต่ละกลุ่มพบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย โดยมีความแตกต่างมากที่สุดระหว่างกุ้งตราดและสตูล (d = 0.30) น้อยที่สุดระหว่างกุ้งสตูลและตรัง (d = 0.024) เมื่อนำไปจัดทำโครงสร้างความสัมพันธ์ของประชากรโดย Neighbor joining tree (รูปที่ 3) และวิเคราะห์ Heterogeneity analysis จากความถี่ของอัลลีลที่พบในกลุ่มตัวอย่าง พบว่าไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากรกุ้งจากอันดามัน (P>.002) แต่พบความแตกต่างภายในประชากรจากอ่าวไทยคือกุ้งชุมพรและตราด โดยพบความแตกต่างที่โลกัส CUPmo18 และDi25 (P<.001) และระหว่างกลุ่มประชากรจากอันดามันและอ่าวไทยพบความแตกต่างระหว่างประชากรของอันดามันกับตราด (P<.001) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างประชากรของอันดามันกับชุมพร (P>.05) (ตารางที่ 4)



รูปที่ 3 Neighbor joining tree แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ของประชากรกุ้งทั้ง 5 แล่งของประเทศไทย

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ Geographic heterogeneity ระหว่างกลุ่มประชากรกุ้งกุลาดำ

คู่ประชากรที่เปรียบเทียบ	ค่าความน่าจะเป็น (Probability values)				
	CUPmo18	**Di25**	**Di27**	**CUPmo1**	**CUPmo2**
สตูล - ตรัง	0.060^{ns}	0.200^{ns}	0.030^{ns}	0.160^{ns}	0.436^{ns}
สตูล - พังงา	0.248^{ns}	0.037^{ns}	0.034^{ns}	0.415^{ns}	0.247^{ns}
สตูล - ชุมพร	0.143^{ns}	0.180^{ns}	0.212^{ns}	0.128^{ns}	0.012^{ns}
สตูล - ตราด	<0.001	<0.001	0.031^{ns}	0.314^{ns}	0.910^{ns}
ตรัง - พังงา	0.004^{ns}	0.169^{ns}	0.368^{ns}	0.313^{ns}	0.155^{ns}
ตรัง - ชุมพร	0.003^{ns}	0.015^{ns}	0.407^{ns}	0.279^{ns}	0.268^{ns}
ตรัง - ตราด	<0.001	0.001	0.154^{ns}	0.070^{ns}	0.793^{ns}
พังงา - ชุมพร	0.084^{ns}	0.004^{ns}	0.186^{ns}	0.260^{ns}	0.062^{ns}
พังงา - ตราด	<0.001	0.008^{ns}	0.573^{ns}	0.160^{ns}	0.629^{ns}
ชุมพร - ตราด	<0.001	0.001	0.249^{ns}	0.646^{ns}	0.029^{ns}
อันดามัน - ชุมพร	0.042^{ns}	0.021^{ns}	0.040^{ns}	0.014^{ns}	0.280^{ns}
อันดามัน - ตราด	<0.001	0.001	0.054^{ns}	0.014^{ns}	

ns = ไม่มีนัยสำคัญ (not significant after adjusting); *P*-value > 0.002

สรุปและข้อวิจารณ์ผล

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้เลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซเทลไลต์มาใช้เป็นเครื่องมือศึกษาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำ เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดนี้มีคุณสมบัติดีกว่าเครื่องหมายพันธุกรรมอื่นๆ เนื่องจากมีอัตราการเกิดมิวเตชั่นสูง (10-6-10-2 ครั้ง ต่อรุ่น) ทำให้มีความหลากหลายของอัลลีลมาก ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ไมโครแซเทลไลต์มีประโยชน์ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกัน ซึ่งส่วนมากมีความหลากหลายต่ำได้ดี การตรวจความแตกต่างของเครื่องหมายชนิดนี้ใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งต้องการดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยที่สกัดได้จากส่วนปลายของขาว่ายน้ำกุ้งและดีเอ็นเอที่ใช้ไม่ต้องมีคุณภาพดี (Wirght และ Bentzen, 1994) แต่มีข้อเสียคือต้องใช้เวลาในการพัฒนาเครื่องหมาย เพราะไพร์เมอร์ที่ใช้ออกแบบมาจากลำดับเบสขนาบข้างของไมโครแซเทลไลต์แต่ละโลกัสซึ่งต้องทำการโคลนและแยกหาเครื่องหมายจากห้องสมุดยีนของกุ้งกุลาดำ อย่างไรก็ตามเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่แยกได้ สามารถนำมาใช้ในการศึกษาอื่นๆ ได้ เช่น การจำแนกครอบครัวและการทำแผนที่ยีโนมเป็นต้น

จากผลของการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในตัวอย่างกุ้งกุลาดำของไทยทั้ง 5 แหล่ง พบว่าตัวอย่างกุ้งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ชัดเจนระหว่างกุ้งอันดามันและอ่าวไทย ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ (Klinbugna และคณะ, 2001) นอกจากนี้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์สามารถแยกความแตกต่างภายในกุ้งอ่าวไทย คือ กุ้งจากชุมพรและตราด แต่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากรกุ้งจากอันดามัน ซึ่งความแตกต่างภายในประชากรระหว่างชุมพรกับตราดน่าจะเกิดจากการที่เกษตรกรนำแม่พันธุ์กุ้งหรือลูกกุ้งจากอันดามันไปเลี้ยงในบริเวณจังหวัดชุมพร เนื่องจากเชื่อกันว่ากุ้งจากอันดามันให้ผลผลิตที่ดีกว่า ทำให้กุ้งชุมพรมีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับกุ้งอันดามันมากกว่ากุ้งตราดที่อยู่ในฝั่งทะเลเดียวกัน Klinbugna และคณะ (2001) ได้รายงานว่าเครื่องหมายไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอไม่สามารถบอกความแตกต่างภายในประชากรอ่าวไทย คือ ตราดและชุมพรได้ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากมีการเคลื่อนที่ของยีนจากเพศเมียระหว่างกุ้งชุมพรและกุ้งตราด (biased female gene flow) ซึ่งทำให้เครื่องหมายไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีการถ่ายทอดทางแม่เท่านั้น (Avise, 1994) ไม่สามารถแยกความแตกต่างของยีนในบริเวณนี้ได้

ความแตกต่างทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำในประเทศไทยที่พบในการศึกษานี้ มีประโยชน์ต่อนโยบายการประมงของไทยเพื่อให้มีการเพิ่มความระมัดระวังไม่ให้มีการเคลื่อนย้ายแม่พันธุ์หรือลูกกุ้งจากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่ง ตลอดจนการวางแผนการที่เหมาะสมในการปล่อยลูกพันธุ์กุ้งคืนสู่ธรรมชาติเพื่อไม่ให้มีการปะปนกันของประชากรที่มีพันธุกรรมต่างกัน รวมทั้งความพยายามที่จะพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำของไทยจะต้องมีการทดสอบให้ชัดเจนว่าพันธุ์ที่มี

อยู่นั้นพันธุ์ใดสามารถให้ผลผลิตที่ดีกว่าเมื่ออยู่ในสภาวะการเลี้ยงในบ่อเพาะเลี้ยง ดังนั้นข้อมูลที่ได้จึงเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการจัดการพันธุกรรมที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Avise, J.C. (1994). **Molecular markers, natural history and evolution.** London : Chapman and Hall.

Benzie, J.A.H., Ballment, E., and Frusher, S. (1993). Genetic structure of Penaeus monodon in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. **Aquaculture** 111: 89-93.

Benzie, J.A.H., Frusher, S., and Ballment, E. (1992). Geographical variation in allozyme frequencies of populations of Penaeus monodon (Crustacea: Decapoda) in Australia. **Aust J Mar Freshwater Res** 43: 715-725.

Cavalli-Sforza, L., and Edwards, A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis: Model and estimation procedures. **Am J Hum Genet** 19: 233-257.

Felsenstein, J. (1993). **Phylip (Phylogenetic inference Package) version 3.5c.** Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Hoelzel, A.R., (1998) **Molecular genetic analysis of populations,** 2nd ed., Oxford: Oxford University Press.

Klinbunga, S. , Siludjai, D., Wudthijinda, W., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Menasveta, P. (2001) Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (Penaeus monodon) in Thailand by RAPD and mitochondrial DNA RFLP analyses. **Mar. Biotechnol.** 3: 428-438.

Raymond, M., and Rousset, F. (1995). Genepop: population genetic software for exact test and ecumenism. **J Hered** 86: 248-250.

Richardson, B. J., Baverstock, P.R. and Adams, M. (1986). **Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systemics and population studies,** Sydney: Academic Press.

Roff, D.A., and Bentzen, P. (1989). The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: X 2 and the problems of small samples. **Mol Biol Evol** 6: 539-545.

Rosenberry, B. (2000) **World shrimp farming 2000.** Sandiego, California: Shrimp News International.

Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Rimphanitchayakit, V., Jarayabhand, P., and Boonsaeng, V. (1997). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the Black Tiger Prawn (Penaeus monodon) in Thailand. **Mol. Mar. Biol. Biotech.** 6 : 110-115.

Tassanakajon, A., Tiptawonnukul, A., Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., Cook, D., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., and Boonsaeng, V. (1998) Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn, Penaeus monodon. **Mol. Mar. Biol.** Biotechnol. 7 : 55-61.

Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res.** 17: 6463-6471.

Withyachamnarnkul, B., Boonsaeng, V., Flegel, T.W., Panyim, S., and Wongteerasupaya, C., (1998) Domestication and selective breeding of Penaeus monodon in Thailand. In : Flegel, T.W. (ed). **Advances in Shrimp Biotechnology. Proceeding to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum,** Chiengmai Thailand. 11-14 November 1998. pp. 73-77.

Wright, J.M., and Bentzen, P. (1994). Microsatellites: genetic markers for the future. **Rev Fish Biol Fisheries** 4: 384-388.

บทปริทัศน์บทความเรื่อง การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรกุ้งกุลาดำในประเทศไทย

เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต

บทความเรื่องนี้ได้รายงานการพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic markers) ชนิดไมโครแซเทลไลต์ เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกุ้มกุลาดำในทะเลอันดามันและอ่าวไทย เครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดนี้ มีประสิทธิภาพที่ดีในการใช้ประโยชน์ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ทั้งนี้เรื่องจากมีอัตราการเกิดมิวเตชั่นสูง และมีความหลากหลายของอัลลีลมากอย่างไรก็ดีเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดที่ต้องใช้เวลาในการพัฒนาค่อนข้างนานและมีขั้นตอนมาก

ผู้เขียนได้บรรยายการพัฒนาเครื่องหมายค่อนข้างสั้นซึ่งถ้าผู้อ่านอยู่ในสาขาวิชาเดียวกันก็พอจะเข้าใจ แต่ถ้าอยู่ต่างสาขาแล้วก็คงยากที่จะเข้าใจได้ หากมีการขยายความเป็นขั้นเป็นตอนและให้รายละเอียดในหัวข้อนี้ก็จะทำให้เกิดประโยชน์ต่อผู้ที่นำไปอ้างอิงหรือนำไปใช้ประกอบการวิจัยได้ดีขึ้น

ผลการวิจัยได้พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกุ้งกุลาดำที่อาศัยอยู่ในทะเลอันดามันและอ่าวไทยอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง อันนี้หมายความว่ากลุ่มประชากร (stock) ของกุ้งในทะเลอันดามันและอ่าวไทยเป็นคนละกลุ่มกัน นอกจากนี้ยังพบว่าในอ่าวไทยอาจมีกลุ่มประชากรแยกเป็นสองกลุ่ม (sub-stock) คือ กลุ่มที่อยู่ในบริเวณฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย (ตราด) และกลุ่มที่อยู่ในบริเวณฝั่งตะวันตกของอ่าวไทย (ชุมพร)

ผลของงานวิจัยเรื่องนี้มีประโยชน์ต่อการนำไปใช้ประยุกต์ในเรื่องต่างๆ กล่าวคือ การอนุรักษ์สายพันธุ์ของกุ้งกุลาดำในทะเลของประเทศไทย การจัดการประมง และการเพาะเลี้ยงกุ้ง อุปสรรคและปัญหาที่สำคัญเรื่องหนึ่งในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำก็คือการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์ การผลิตลูกกุ้งกุลาดำยังต้องพึ่งการใช้พ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติ ในแต่ละฝั่งทะเลอันดามัน เมื่ออุปสงค์มากกว่าอุปมาน จึงทำให้ราคาพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำสูงขึ้นอย่างมาก จากที่เคยขายตัวละ 1,000 บาท ในปี พ.ศ. 2534 มาเป็น 5,000-7,000 บาท ในปัจจุบัน และในบางระยะก็ไม่มีพันธุ์กุ้งจำหน่าย เพราะจัดหาไม่ได้

การแก้ปัญหาเฉพาะหน้าที่ดำเนินการอยู่ในปัจจุบันคือการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์จากต่างประเทศ แต่มาตรการดังกล่าวอาจมีผลเสียตามมาได้ในภายหลัง เพราะพ่อแม่พันธุ์ที่นำเข้าอาจนำพาเชื้อไวรัสที่ก่อโรคเข้ามาด้วย นอกจากนี้ถ้ากุ้งบางส่วนที่เป็นพันธุ์เทศหนีเล็ดรอดลงทะเลได้ ก็อาจทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของประชากรกุ้งกุลาดำในธรรมชาติเดิมที่มีอยู่เสียไป ซึ่งไม่ถูกหลักการอนุรักษ์ในด้านความหลากหลายของพันธุกรรมในธรรมชาติ

การแก้ปัญหาการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำอาจทำได้อีกแนวทางหนึ่ง คือ การบำรุงพันธุ์ในธรรมชาติ (stock enhancement) เพื่อให้มีประชากรกุ้งกุลาดำเพิ่มขึ้น ในแหล่งประมง และเมื่อมีประชากรเพิ่มขึ้นจะทำให้มีพ่อแม่พันธุ์เพิ่มขึ้นด้วย Ye (2000) ได้ใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ meta-analysis พิสูจน์ให้เห็นว่าประชากรกุ้งที่สามารถเข้าข่ายการประมงได้ (recruitment) จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณพ่อแม่พันธุ์ (spawners) ดังนั้นประชากรกุ้งควรได้รับการจัดการที่เหมาะสมเพื่อให้มีพ่อแม่พันธุ์เพียงพอต่อการเพิ่มผลผลิตกุ้งในทะเล Davenport et al. (1999) ได้ประสบความสำเร็จในการบำรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำในบริเวณชายฝั่งทะเลแห่งหนึ่งของประเทศศรีลังกา ผลของการปล่อยพันธุ์กุ้งได้ทำให้ประมาณการจัดเพิ่มขึ้น 1400% และจำนวนกุ้งโตที่จับได้หลังการปล่อยลูกกุ้งคิดเป็น 3.5% ของจำนวนลูกกุ้งที่ปล่อยลงไปทั้งหมด

การบำรุงพันธุ์ในธรรมชาติเพื่อเพิ่มพ่อแม่พันธุ์ควรมีโปรแกรมการคัดพันธุ์ร่วมด้วย ตัวอย่างการดำเนินงานในลักษณะนี้ได้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีในอดีต ได้แก่ ผลงานที่ทำกับปลาแซลมอน (salmon) ที่มลรัฐวอชิงตัน สหรัฐอเมริกา ปลาชนิดนี้เป็นปลาที่มีการอพยพย้ายถิ่น พ่อแม่ปลาจะวางไข่ในน้ำจืด หลังจากฟักเป็นตัวและโตขึ้นเป็นลูกปลาจะอพยพลงสู่ทะเล และเดินทางในทะเลเป็นระยะทางหลายพันไมล์และใช้เวลา 4-5 ปี จึงกลับมาวางไข่ในที่เดิม ในอดีตปลาแซลมอนถูกจับมากเกินไปจนใกล้สูญพันธุ์ การบำรุงพันธุ์และการคัดพันธุ์จึงถูกดำเนินการโดย Professor Dr. Lauren R. Donaldson, University of Washington โดยที่ท่านและคณะวิจัยได้ทำการเพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้เพื่อเพิ่มอัตรารอด มีการให้อาหารอย่างดี หลังจากเป็นลูกปลาแล้วจึงปล่อยลงสู่ธรรมชาติ และมีการตั้งโปรแกรมคัดพันธุ์ ให้ได้ปลาที่กลับมาแล้ว โตเร็วมีกำลังต้านทานโรคได้ดี ผลการดำเนินงานที่ใช้เวลา 20 ปี ได้ทำให้แก้ปัญหาการสูญพันธุ์ได้ มีพ่อแม่ปลาเพิ่มขึ้นอย่างเพียงพอ และทำให้ได้พันธุ์ปลาตามโปรแกรมการคัดพันธุ์ที่ตั้งไว้ (Donaldson & Menasveta, 1961).

ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงควรมีโครงการวิจัยและพัฒนาที่มีเป้าหมายในการบำรุงพันธุ์และคัดพันธุ์กุ้งกุลาดำในบริเวณฝั่งทะเลอันดามัน กลุ่มประชากรกุ้งกุลาดำในทะเลอันดามันนั้นไม่ใหญ่มาก และมีการอพยพย้ายถิ่นระยะสั้น จากการสืบค้นข้อมูลจากสถิติการประมงของประเทศไทย ปี พ.ศ.2531-2537 พบว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณการจับ 172 ตันต่อปี ถ้าจะประเมินคร่าวๆ ว่า

ประชากรกุ้งกุลาดำทั้งหมดในทะเลอันดามันเป็นสองเท่าของปริมาณจับได้ จะมีปริมาณทั้งหมดประมาณ 344 ตัน/ปี ถ้าคิดเฉลี่ยน้ำหนักกุ้ง 100 กรัมต่อตัว ก็จะมีประชากรกุ้งทั้งหมดประมาณ 3,440,000 ตัว ในปี พ.ศ. 2542 เราได้จับพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำจากฝั่งทะเลอันดามันประมาณ 250,000 ตัว (ข่าวกุ้ง, 2543) ซึ่งคิดเป็น 7.2% ของจำนวนประชากรทั้งหมด การที่กลุ่มประชากรมีขนาดใหญ่จะทำให้การบำรุงพันธุ์บรรลุผลชัดเจนเร็วยิ่งขึ้น และที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งก็คือการที่เรามีเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดไมโครแซเทลไลต์ ทำให้เราสามารถประยุกต์ความรู้ดังกล่าวไปในการจัดการในเรื่องการบำรุงพันธุ์ได้ สามารถติดตามผลของกุ้งในรุ่นต่อ ๆ ไปได้อย่างแม่ยำ และสามารถประกันได้ว่าการบำรุงพันธุ์ของเราจะไม่ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำในทะเลอันดามันเสียไป

การบำรุงพันธุ์ควรดำเนินการโดยนำพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำจากทะเลอันดามันมาทำการตรวจสายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมที่มีอยู่แล้ว เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นสายพันธุ์ของทะเลอันดามันที่แท้จริง ตรวจโรคต่าง ๆ ให้แน่ใจว่าไม่เป็นพาหะของไวรัสก่อโรคชนิดต่าง ๆ เมื่อผ่านกระบวนการดังกล่าวข้างต้นแล้วก็จะทำการเพาะพันธุ์ลูกกุ้งหลังวัยอ่อน (post larvae) ที่ผลิตได้จะถูกอนุบาลในบ่อดินเป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 6 สัปดาห์ สุ่มตรวจโรคอีกครั้ง จึงทำการปล่อยลงทะเล บางส่วนของลูกกุ้งจะถูกติดเครื่องหมายเพื่อการตรวจสอบในเรื่องอัตรารอด คาดว่าถ้าทำการปล่อยลูกกุ้งที่มีคุณภาพปีละ 10 ล้านตัว และมีการตั้งโปรแกรมในการคัดพันธุ์ ซึ่งมีเกณฑ์ในเรื่องการอพยพยังแหล่งพ่อแม่พันธุ์ได้เร็ว อัตราการเจริญเติบโตสูง ไม่เป็นพาหะไวรัสก่อโรค การปล่อยกุ้ง 10 ล้านตัว นั้นมีความคาดหวังที่จะมีอัตรารอดเป็นพ่อแม่พันธุ์ประมาณ 2% ซึ่งจะเป็นจำนวนพ่อแม่พันธุ์ 200,000 ตัว ซึ่งเป็นจำนวนที่ใกล้เคียงกับจำนวนพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่จับได้ในบริเวณฝั่งทะเลอันดามันในปี พ.ศ. 2542 (ข่าวกุ้ง, 2543)

อย่างไรก็ดี เป็นเรื่องที่น่าเสียดายที่โครงการประยุกต์เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อประเทศชาติโดยส่วนรวม ยังไม่มีทีท่าว่าจะบังเกิดขึ้น ทั้งนี้เพราะหน่วยงานให้ทุนสนับสนุนการวิจัยหลายแหล่งของประเทศยังมองไม่เห็นคุณค่าของการวิจัยในเรื่องนี้ ทั้ง ๆ ที่ใช้เงินทุนไม่มากกว่า 50 ล้านบาท เมื่อเปรียบเทียบกับธุรกิจกุ้งกุลาดำที่มีมูลค่าถึงปีละ 100,000 ล้านบาท

เอกสารอ้างอิง

ข่าวกุ้ง (2543). ภาวะขาดแคลนแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ หน้า 3 ในข่าวกุ้งประจำเดือนกรกฎาคม 2543

Davenport, J., Ekouatne, S.U.K. Walgama, S.A. Lee, D. and Hills, J.M. (1999). Successful stock enhancement of a lagoon prawn fishery at Rekawa, Sri Lanka using cultured post-larvae of penaeid shrimp. **Aquaculture** 180, 65-78.

Donalson, L.R. and Menasveta. D. (1961). Selective breeding of chinook salmon. Trans. Amer Fish. Soc., 90, 160-164.

Ye, Y. 2000. Is recruitment related to spawning stock in penaeid shrimp fisheries? ICES Journal of Marine Science 57, 1103-1103.