BRG/09/2541 รศ.ดร อัญชลี ทัศนาขจร

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

(1 ธันวาคม 2540 - 30 พฤศจิกายน 2543)

เรื่อง

การวิเคราะห์ลักษณะและความแปรผันของไมโครแซเทลไลต์ ในจีโนมของกุ้งกุลาดำและความเป็นไปได้ในการใช้จำแนกพันธุกรรม

(สัญญาเลขที่ BRG 9/2541)

โดย

รศ.ดร. อัญชลี ทัศนาขจร
ผศ.ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ
ดร.สิราวุธ กลิ่นบุหงา

572.86
ร52617

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

(1 ธันวาคม 2540 - 30 พฤศจิกายน 2543)

เรื่อง

การวิเคราะห์ลักษณะและความแปรผันของไมโครแซเทลไลต์ในจีโนมของกุ้งกุลาดำและความเป็นไปได้ในการใช้จำแนกพันธุกรรม

(สัญญาเลขที่ BRG 9/2541)

โดย

รศ.ดร. อัญชลี ทัศนาขจร

ผศ.ดร.วิเชียร ริมพนิชยกิจ

ดร.ศิราวุธ กลิ่นบุหงา

12 ก.ย. 2544

I19543785

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
มอบให้หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
๒๕ / ม.ค. ๕๐ / ๔๕

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.วิชัย บุญแสงและศาสตราจารย์ ดร.บุญเสริม วิทยชำนาญกุล ที่ได้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณ ดร.วงศ์ปฐม กมลรัตน์ ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ข้อมูลโครงสร้างทางพันธุกรรม โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ทุนวิทยานิพนธ์จากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย และทุนสนับสนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา โครงการสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ลักษณะและความแปรผันของไมโครแซเทลไลต์ในจีโนมของกุ้งกุลาดำ และความเป็นไปได้ในการใช้จำแนกพันธุกรรม

รศ.ดร.อัญชลี ทัศนาขจร, ผศ.ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ และ ดร.ศิราวุธ กลิ่นบุหงา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

---

2. บทคัดย่อ

ไมโครแซเทลไลต์เป็นดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของเบสซ้ำช่วงสั้นๆ ในหนึ่งหน่วยซ้ำประกอบด้วยลำดับเบส 1-6 คู่เบส พบกระจายอยู่ทั่วไปจีโนมของยูคาริโอต ความผันแปรของไมโครแซเทลไลต์เกิดจากการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนซ้ำและตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ไมโครแซเทลไลต์เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำแนกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตต่างๆได้ดี เนื่องจากมีความผันแปรของจำนวนซ้ำสูงหรือมีความหลากหลายของจำนวนอัลลีลและมีอยู่มากมายหลายตำแหน่งในจีโนม

ในงานวิจัยนี้ได้แยกไมโครแซเทลไลต์จากจีโนมของกุ้งกุลาดำ โดยการสร้างห้องสมุดยีนแล้วค้นหาโคลนที่มีไมโครแซเทลไลต์ชนิด tri- และ tetranucleotide repeats โดยวิธีโคโลนีไฮบริไดเซชั่น สามารถแยกโคลนได้เป็นจำนวนมาก เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบไมโครแซเทลไลต์ถึง 335 ตำแหน่ง แบบของเบสซ้ำที่พบมาก ได้แก่ $(GAA)_n$, $(GATA)_n$, $(CAT)_n$ และ $(ATG)_n$ ส่วนเบสซ้ำบางตัวพบน้อยมากหรือไม่พบเลย ได้แก่ $(GGAT)_n$, $(GGAA)_n$, $(CACC)_n$, $(CATA)_n$ และ $(TCAG)_n$ ไมโครแซเทลไลต์ชนิด perfect repeats พบมากที่สุด (55.2%) รองลงมาได้แก่ ชนิด imperfect (28.1%) และ compound repeats (16.7%) จำนวนซ้ำที่พบอยู่ในช่วง 4-94 ซ้ำ โดยส่วนมากเฉลี่ยอยู่ในช่วง 5-40 ซ้ำ ไมโครแซเทลไลต์ที่แยกได้สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อตรวจหาความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ 26 ตำแหน่ง ซึ่งเครื่องหมายส่วนมากมีความผันแปรสูงมีค่าเฉลี่ยของอัลลีลต่อโลกัสเท่ากับ 17.4 และค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตี้เท่ากับ 0.63

จากการนำเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์จำนวน 5 ตำแหน่ง คือ CUPmo1, CUPmo2, CUPmo18, Di25 และ Di27 มาศึกษาความแตกต่างและโครงสร้างทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำ 5 กลุ่มในประเทศไทย (กุ้งสตูล ตรัง และพังงาจากอันดามัน; กุ้งชุมพรและตราดจากอ่าวไทย) ผลการศึกษาพบว่ากุ้งกุลาดำในประเทศไทยยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (มีค่าอัลลีลอยู่ในช่วง 19 ถึง 30 และค่าเฮเทอโรไซโกซิตี้อยู่ในช่วง 0.49 ถึง 0.95) และมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกุ้งอันดามันและตราด ($P<.0001$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างอันดามันกับชุมพร ($P>.05$) นอกจากนี้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่ตำแหน่ง CUPmo18 และ Di25 สามารถแยกความแตกต่างภายในกุ้งจากอ่าวไทยคือกุ้งชุมพรและกุ้งตราด ($P<.0001$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากรกุ้งจากอันดามัน ผลงานวิจัยนี้ให้ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำในประเทศไทย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำของไทยและต่อนโยบายการประมงให้มีการเพิ่มความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้มีการปนเปื้อนระหว่างกลุ่มประชากรที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันอันจะทำให้สูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมและอาจทำลายลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์ได้ นอกจากนี้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์สามารถนำไปจำแนกครอบครัวกุ้งในโปรแกรมคัดพันธุ์และทำแผนที่จีโนม

Characterization of Microsatellite Sequences in the Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*) Genome, Polymorphism Tests and Their Potential Use in DNA Typing

Anchalee Tassanakajon, Vichien Rimphanitchayakit, and Sirawut Klinbunga

---

Abstract

Microsatellites are tandemly repetitive DNA sequences with very short nucleotide motifs (1-6 bp). They are abundant and distributed throughout the eukaryotic genome. Variation in the numbers of repeating units has been demonstrated and microsatellite polymorphisms can be assayed by the polymerase chain reaction (PCR). Microsatellite are being employed as genetic markers in a variety of organisms. The level of microsatellite polymorphism varies greatly among loci but is usually higher than that of allozymes and other DNA markers.

In this study, we isolated and characterized microsatellites from the genomic libraries of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). The genomic libraries were screened for tri- and tetranucleotide repeats $(GAA)_n$, $(GATA)_n$, $(CAT)_n$, $(ATG)_n$, $(GGAT)_n$, $(GGAA)_n$, $(TCAG)_n$ $(CACC)_n$, $(CATA)_n$ and several positive clones were isolated. From the nucleotide sequence data of those positive clones, 335 microsatellite arrays were isolated. The repeats $(GAA)_n$, $(GATA)_n$, $(CAT)_n$ and $(ATG)_n$ were found at the high frequency while the other sequence types were rare or not exist. The predominant category of *P. monodon* microsatellites was perfect repeats (55.2%) while imperfect and compound repeats were found at the lesser extent (28.1 and 16.7 % respectively). A range of repeat number was 4-94 repeats with most of the repeats in the range of 5-40 repeats. Primers were designed for several microsatellite loci and 26 pair of primers produce scorable PCR products. Analysis of polymorphism revealed that most of the microsatellite loci were highly polymorphic with average allele per locus of 17.4 and average heterozygosity of 0.63.

Five microsatellite loci (CUPmo1, CUPmo2, CUPmo18, Di25 and Di27) were used for determination of genetic variation and differentiation of Thai *P. monodon* from five geographic locations (Chumphon, Trad, Phangnga, Satun and Trang). The number of alleles across the 5 loci ranged from 19-30 alleles and heterozygosities ranged from 0.49-0.95. The average heterozygosity across all investigated samples was 0.78 indicating high genetic diversity in this species. Geographic heterogeneity analysis of the results from the 2 loci, CUPmo18 and Di25, showed significant differences among the Gulf of Thailand (Trad and Chumphon) but not the Andaman samples. Comparison between regions revealed significant genetic differentiation between the Andaman and Trad *P. monodon* ($P<0.001$) whereas those from Chumphon and the Andaman were genetically similar ($P>0.05$). 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. Microsatellites were also applied for family identification in selective breeding program and genome mapping.

Keywords: microsatellite marker, genetic variation, black tiger shrimp, *P. monodon*

3. สารบัญ

สารบัญเรื่อง

	หน้า
1. กิตติกรรมประกาศ	i
2. บทคัดย่อ	ii
3. สารบัญ	iv
4. บทนำ	1
5. วิธีทดลอง	4
5.1 การเตรียมดีเอ็นเอของกุ้งกุลาดำ	4
5.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับสร้างห้องสมุดยีน	4
5.1.2 การเตรียมดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจยีโนไทป์	4
5.2 การสร้างห้องสมุดยีนและคัดเลือกไมโครแซเทลไลต์	4
5.2.1 การสร้างห้องสมุดยีนด้วยวิธี convention และคัดเลือกไมโครแซเทลไลต์	4
5.2.2 การสร้างห้องสมุดยีนแบบ enrichment และการคัดเลือกไมโครแซเทลไลต์	5
5.3 หาลำดับนิวคลีโอไทด์และออกแบบไพรเมอร์	6
5.4 ปรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์	7
5.5 ทดสอบความหลากหลายของไมโครแซเทลไลต์	7
5.6 ทดสอบการทำมัลติเพลกซ์พีซีอาร์และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์	7
5.7 การประยุกต์ใช้จำแนกพันธุกรรม	8
5.7.1 การตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรกุ้งกุลาดำ	8
5.7.2 การตรวจยีโนไทป์ของกุ้งในโปรแกรมการคัดพันธุ์	8
5.7.3 การทำแผนที่จีโนม	8
6. ผลการทดลอง	9
6.1 การแยกไมโครแซเทลไลต์ชนิด tri- และ tetranucleotide	9
6.1.1 ห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นด้วยวิธี convention	9
6.1.2 ห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นด้วยวิธี enrichment	11
6.2 ลักษณะของไมโครแซเทลไลต์ในกุ้งกุลาดำ	13
6.3 การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซเทลไลต์และการทดสอบความหลากหลาย	16

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

6.4 การพัฒนาวิธีการตรวจเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์แบบมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ 26

6.5 การตรวจสอบยีโนไทป์ด้วยสารละลายซิลเวอร์ 26

6.6 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ 31

6.6.1 การตรวจความแตกต่างและโครงสร้างทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำ 31

6.6.2 การทำแผนที่จีโนม 35

7. บทวิจารณ์ 37

8. หนังสืออ้างอิง 40

9. Research output 44

10. การนำไปใช้ประโยชน์ 47

11. ภาคผนวก 49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	ตัวอย่างลำดับเบสของไมโครแซเทลไลต์ที่แยกได้จากห้องสมุดยีนของกุ้งกุลาดำ	16
2.	Amplification patterns ของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์	19
3.	การกระจายความถี่อัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมซึ่งได้จากการตรวจยีโนไทป์ของกุ้งกุลาดำจากอ่าวไทย	23
4.	รูปแบบของ microsatellite alleles จากการทำ duplex PCR ของ CUPmo1+2	28
5.	รูปแบบของ microsatellite alleles จากการทำ duplex PCR ของ CUPmo4+11	29
6.	รูปแบบของ microsatellite alleles จากการตรวจสอบยีโนไทป์ด้วยสารละลายซิลเวอร์ของ CUPmo 2 และ 11	30
7.	Neighbor joining tree แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ของประชากรกุ้งทั้ง 5 แหล่งของประเทศไทย	33
8.	การตรวจยีโนไทป์ที่ตำแหน่ง CUPmo2 จากตัวอย่างกุ้งที่เป็น Reference families เพื่อทำแผนที่จีโนม	36

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
1.	ผลการแยก microsatellite sequences จากห้องสมุดยีนแบบ convention	10
2.	ผลการแยก microsatellite sequences จากห้องสมุดยีนแบบ enrichment	12
	ก. enriched microsatellite จาก recombinant plasmid DNA	12
	ข. enriched microsatellite จาก genomic DNA	12
3.	ลักษณะของ microsatellite sequences ซึ่งพบในโคลนที่ทำการหาลำดับเบสจากห้องสมุดยีนแบบ convention	14
4.	ลักษณะของ microsatellite sequences ซึ่งพบในโคลนที่ทำการหาลำดับเบสจากห้องสมุดยีนแบบ enrichment	15
5.	ลักษณะของเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซเทลไลต์จากการตรวจสอบยีโนไทป์ของกุ้งกุลาดำ	18
6.	การทำมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์โลกัสต่างๆ และผลของพีซีอาร์	27
7.	ค่าความแตกต่างผันแปรของไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 5 โลกัสที่พบในประชากรกุ้งกุลาดำของไทย	32
8.	ความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรกุ้งที่ตรวจด้วยไมโครแซเทลไลต์ 5 โลกัส	33
9.	การวิเคราะห์ Geographic heterogeneity ระหว่างกลุ่มประชากรกุ้งกุลาดำ	34
10.	การประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของความแตกต่าง (F_{ST}) ระหว่างกลุ่มประชากรจากไมโครแซเทลไลต์ 5 โลกัส	35

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. บทนำ

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่นำรายได้เข้าประเทศปีละ 6-8 หมื่นล้านบาท โดยผลผลิตกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่มาจากการเพาะเลี้ยง ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของประเทศไทยมีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว ปัจจุบันเรามีผลผลิตกุ้งกุลาดำปีละกว่าสองแสนตัน (1) การขยายตัวอย่างรวดเร็วทำให้เกิดปัญหาต่างๆขึ้น เช่น ปัญหาการทำลายระบบนิเวศน์ชายฝั่งของนากุ้ง ปัญหาโรคระบาด รวมทั้งปัญหาการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์กุ้ง เพราะระบบการเลี้ยงที่ยังต้องอาศัยพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติ ปัจจุบันได้มีความพยายามเพาะเลี้ยงกุ้งให้เข้าสู่ระบบปิดคือ ใช้พ่อ แม่พันธุ์จากบ่อเลี้ยงแทนการจับจากธรรมชาติ (2, 3) จึงต้องมีการจัดการทางพันธุกรรมให้ถูกต้องเหมาะสมและจัดให้มีโปรแกรมคัดพันธุ์ (Selective breeding program) เพื่อคัดเลือกพันธุ์ที่ดี เช่น โตไวและต้านทานโรค ซึ่งจะนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์กุ้งเพื่อเพิ่มผลผลิตและทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งยั่งยืนต่อไป

แม้ว่ากุ้งจะเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญ แต่การศึกษาพันธุกรรมในกุ้งมีอยู่น้อยมากและยังขาดเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพในการบ่งชี้ลักษณะและความแตกต่างทางพันธุกรรมของกุ้ง เครื่องหมายพันธุกรรมในระดับโมเลกุล (molecular markers) สามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้อย่างถูกต้องและไม่ขึ้นกับปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม โมเลกุลเครื่องหมายแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือโปรตีนเครื่องหมาย ได้แก่ อัลโลไซม์ (allozymes) และดีเอ็นเอเครื่องหมาย ได้แก่ มินิแซทเทลไลต์ (minisatellite) ไมโครแซเทลไลต์ (microsatellite) และไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA หรือ MtDNA) เครื่องหมายพันธุกรรมเหล่านี้สามารถนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ในระดับที่แตกต่างกันและมีข้อดีข้อเสียในการนำมาใช้ต่างๆกัน (4, 5)

การตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิคอัลโลไซม์อิเลคโตรโฟรีซิส ทำได้ง่าย รวดเร็ว ราคาไม่แพงและสามารถนำมาใช้ตรวจตัวอย่างจำนวนมากได้ แต่มีข้อเสียคือ อัลโลไซม์มีความผันแปรในระดับต่ำ โดยทั่วไปแต่ละตำแหน่งของอัลโลไซม์จะมีความแตกต่างน้อยมาก คือมีจำนวนอัลลีลเพียง 1-2 อัลลีล จึงให้ข้อมูลที่ไม่ละเอียดและมักใช้ได้ไม่ดีในสปีชีส์ที่มีความหลากหลายในระดับต่ำ (6, 7) ดีเอ็นเอเครื่องหมายมีระดับความผันแปรสูง สามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดีและถูกต้องกว่าโปรตีนเครื่องหมาย

ในกุ้งกุลาดำได้มีการศึกษาความแตกต่างและโครงสร้างทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิคอัล-โลไซม์อิเลคโตรโฟรีซีส แต่พบความแตกต่างค่อนข้างน้อย (8, 9) ต่อมา Benzie และคณะ ได้ใช้เทคนิค mitochondrial RFLPs (MtDNA-RFLPs) และการหาลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำในออสเตรเลีย และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกุ้งกุลาดำในเขตตะวันตกและในเขตทิศเหนือและฝั่งตะวันออกของออสเตรเลีย (10, 11) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการตรวจความแตกต่างผันแปรในระดับดีเอ็นเอ สามารถนำมาใช้ในการศึกษากุ้ง

สกุลนี้ได้ดีกว่าเทคนิคอัลโลไซม์อิเลคโตรโฟรีซิส เนื่องจากการความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอาจไม่ทำให้โปรตีนมีประจุต่างกัน จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ในระดับของโปรตีน

เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis) ใช้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งในแบคทีเรีย พืชและสัตว์ (12) โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 10 เบส เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ แล้ววิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เทคนิคนี้ทำได้ง่าย รวดเร็วและไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ทำการศึกษา แต่มีข้อเสียคือ RAPD เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่แสดงเฉพาะลักษณะเด่น (dominance markers) นอกจากนี้อาจให้ผลแปรปรวนโดยบางครั้งได้แถบดีเอ็นเอไม่เหมือนกันเมื่อทำซ้ำ จึงต้องเลือกเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ให้ผลชัดเจนและไม่แปรปรวน (Scorable DNA patterns) และดีเอ็นเอที่ตรวจจะต้องมีคุณภาพดี กลุ่มวิจัยของเราได้ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างกุ้งจากแหล่งที่นิยมใช้เป็นพ่อ-แม่พันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งจำนวน 5 แหล่ง โดยเก็บตัวอย่างจากทะเลอันดามัน 3 แหล่ง ได้แก่ กุ้งบริเวณสตูล-ตรัง พังงา และ กุ้งจากเมดานประเทศอินโดนีเซีย และเก็บตัวอย่างกุ้งจากฝั่งอ่าวไทย 2 แหล่ง ได้แก่ กุ้งจากตราด และชุมพร ผลของการศึกษาพบว่าตัวอย่างกุ้งของไทยแตกต่างจากกุ้งเมดานอย่างชัดเจนและสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกุ้งอันดามันและอ่าวไทยได้ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกุ้งที่อยู่ในฝั่งทะเลเดียวกัน (13, 14)

ไมโครแซเทลไลต์ (microsatellite DNA) หรือ simple sequence repeat (SSR) หรือ short tandem repeat (STR) เป็นดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของเบสซ้ำช่วงสั้นๆในหนึ่งหน่วยซ้ำประกอบด้วยลำดับเบส 1-6 คู่เบส พบได้ 10^3-10^5 ตำแหน่ง กระจายอยู่ทั่วไปจีโนมของยูคาริโอต (15) ความผันแปรของไมโครแซเทลไลต์เกิดจากการเพิ่มขึ้นหรือลดลงจำนวนซ้ำ ซึ่งไมโครแซเทลไลต์เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีคุณสมบัติดีกว่าเครื่องหมายพันธุกรรมอื่นๆคือ มีความผันแปรของจำนวนซ้ำสูงหรือมีความหลากหลายของจำนวนอัลลีล (allele) และมีไมโครแซเทลไลต์อยู่มากมายหลายตำแหน่งในจีโนม สามารถเลือกใช้ตรวจความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ทีละหลายโลคัส ทำให้การตรวจมีความละเอียดและถูกต้องมากขึ้น นอกจากนี้อัลลีลของไมโครแซเทลไลต์เป็นแบบข่มร่วมกัน (codominance) ซึ่งทำให้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้ให้ข้อมูลทางพันธุกรรมมากกว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดี หรือไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เป็นแฮพลอยด์ ข้อมูลพันธุกรรมถ่ายทอดจากแม่เท่านั้น (16) การตรวจความแตกต่างของไมโครแซเทลไลต์ที่ตำแหน่งต่างๆ ทำได้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณไมโครแซเทลไลต์ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสขนาบข้าง (flanking regions) ของไมโครแซเทลไลต์แต่ละตำแหน่ง แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกความแตกต่างของขนาดด้วยอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส (17)

ไมโครแซเทลไลต์อัลลีลถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปสู่ลูกได้ตามกฎของเมนเดล (Medelian inheritance) ดังนั้นในโปรแกรมการคัดพันธุ์ เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดนี้สามารถใช้ติดตามพ่อ

แม่ ลูก เพื่อแยกกลุ่มกุ้งจากหลายครอบครัวที่เลี้ยงรวมในบ่อเดียวกัน นอกจากนี้สามารถใช้ทำแผนที่จีโนม (genome mapping) ร่วมกับเครื่องหมายพันธุกรรมแบบอื่นๆ เพื่อค้นหาตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สนใจในกุ้งเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป (18,19, 20)

กลุ่มวิจัยของเราได้ทำการแยกและวิเคราะห์ไมโครแซเทลไลต์ชนิด $(GT)_n$ และ $(CT)_n$ จากห้องสมุดยีนของกุ้งกุ้งกุลาดำและพบไมโครแซเทลไลต์ชนิด $(GT)_n$ ทุกๆ 92.8 กิโลเบส และ $(CT)_n$ พบได้ทุกๆ 164 กิโลเบส อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าไมโครแซเทลไลต์ที่แยกได้มีขนาดยาว ทำให้ไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาบข้างไมโครแซเทลไลต์เพียงพอที่จะออกแบบไพร-เมอร์ได้ ทำให้ได้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่ใช้ประโยชน์ได้เพียง 2 ตำแหน่ง (21) ต่อมาได้มีรายงานการแยกและแสดงลักษณะไมโครแซเทลไลต์ในกุ้งสกุลพีเนียสอื่นๆคือ Moore และคณะ, 1999 ทำการแยกไมโครแซเทลไลต์ในกุ้ง *Penaeus japonicus* ซึ่งพบไมโครแซทเทลไลต์ชนิด $(CA)_n$, $(CAA)_n$, $(CCA)_n$, $(GAA)_n$, $(GAC)_n$, $(CAG)_n$ โดยพบ $(CA)_n$ และ $(GAA)_n$ จำนวนมาก และไมโครแซเทลไลต์จำนวน 13 ตำแหน่งสามารถตรวจยีโนไทป์ในกุ้ง *Penaeus japonicus* ได้ดี แต่ไม่สามารถนำมาใช้กับกุ้งกุลาดำได้ (22) นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในการติดตามพ่อแม่ลูกที่ทำการผสมพันธุ์กุ้งโดยแม่พันธุ์ 33 ตัว ผสมกับพ่อพันธุ์แบบสุ่ม 34 ตัว เมื่อใช้เครื่องหมายพันธุกรรม 6 ตำแหน่ง สามารถจำแนกครอบครัวกุ้งได้ 31 ครอบครัว Garcia และ Alcivar-Warren, 1996 รายงานการแยกไมโครแซทเทลไลต์ของกุ้งขาว *Penaeus vannamei* ได้ 2 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นไมโครแซเทลไลต์แบบ $(CTTT)_n$ และ $(GAA)_n$ (23)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะแยกหาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ของกุ้งกุลาดำให้เพิ่มมากขึ้น เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการการศึกษาพันธุกรรมของกุ้ง โดยเฉพาะการทำแผนที่จีโนมซึ่งต้องใช้เครื่องหมายพันธุกรรมจำนวนมาก โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการแยกและวิเคราะห์ลักษณะของไมโครแซเทลไลต์ในกุ้งกุลาดำ รวมทั้งศึกษาการกระจายตัวในจีโนมและความผันแปรของไมโครแซเทลไลต์ที่โลกัสต่างๆและประเมินความเป็นไปได้ในการที่จะนำมาใช้จำแนกพันธุกรรม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาและใช้ประโยชน์เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. วิธีทดลอง

5.1 การเตรียมดีเอ็นเอของกุ้งกุลาดำ

5.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับสร้างห้องสมุดยีน

วิธีเตรียมดีเอ็นเอดัดแปลงจาก Davis และคณะ (24) นำตัวอย่างกุ้งกุลาดำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ส่วนเหงือก (gill) หรือขาว่ายน้ำ (pleopod) นำมาบดให้ละเอียดในสารละลายบัพเฟอร์ (100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM Na_2EDTA, pH 8.0; 1%SDS, 100 mM NaCl และ 200 mM sucrose) 500 µl ทำลายโปรตีนและอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ Proteinase K (500 µg/ml) และ RNase (100 µg/ml) ตามลำดับ โดยบ่มที่ 65°C นาน 1 ชั่วโมง ตกตะกอนโปรตีนด้วย potassium acetate โดยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ ทำการปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสและสกัดแยกโปรตีนออกจากส่วนใสด้วยฟีนอลและคลอโรฟอร์ม ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

5.1.2 การเตรียมดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจยีโนไทป์

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี alkaline extraction (25) จากเลือดกุ้งหรือลูกกุ้งทั้งตัว โดยนำเลือดกุ้ง 5 µl บ่มกับ 0.2 M NaOH 20 µl ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที สำหรับลูกกุ้งทำการบดในน้ำกลั่น 500 µl ปั่นเหวี่ยงนำตะกอนที่ได้ละลายใน 0.2 M NaOH 20 µl บ่มที่ 75°C 10 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาการสกัดดีเอ็นเอทั้งจากลูกกุ้งและเลือดด้วย 0.04 M Tris-HCl, pH 7.5 ทำการปั่นเหวี่ยงส่วนใสที่ได้พร้อมที่จะนำไปใช้ในการตรวจยีโนไทป์ โดยส่วนใส 1 µl/ปฏิกิริยาพีซีอาร์ 15 µl

5.2 การสร้างห้องสมุดยีนและคัดเลือกไมโครแซเทลไลต์

ทำการสร้างห้องสมุดยีน 2 วิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีจะมีการคัดเลือกไมโครแซเทลไลต์ที่แตกต่างกัน

5.2.1 การสร้างห้องสมุดยีนด้วยวิธี convention และคัดเลือกลักษณะไมโครแซเทลไลต์ (21)

นำดีเอ็นเอของกุ้งมาทำให้เป็นชิ้นเล็กๆ 3 วิธีด้วยกันคือ 1. การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง 2.การย่อยด้วย DNase และ 3. การตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hinc* II/*Alu* I จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 300-1,000 คู่เบสโดย 1.5% low melting agarose ชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการใช้คลื่นเสียงหรือย่อยด้วย DNase นำไปซ่อมปลายชิ้นดีเอ็นเอให้เป็นปลายทู่ด้วย T_4 polynucleotide kinase (Promega) และ Klenow polymerase (Promega) โดยบ่มที่ 37 °C นาน 30 นาที นำดีเอ็นเอของกุ้งกุลาดำที่แยกจาก low melting agarose ประมาณ 150 ng เชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC 18 ที่ตัดด้วย *Sma* I จำนวน 50 ng โดยอาศัย T4 ligase โดยบ่มที่ 16°C นาน 16-20 ชั่วโมง จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (*E.coli* strain XLI-Blue) ด้วยวิธีอิเลคโทรทรานสฟอร์เมชั่น คัดเลือกโคลน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาแอมพิซิลิน (100 mg/ml) X-gal (100 mg/ml) และ IPTG (0.0002 M) พลาสมิดลูกผสมจะพบจากแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาว

ทำการคัดเลือกโคลนที่มีไมโครแซเทลไลต์ดีเอ็นเอจากห้องสมุดยีนโดยวิธีโคโลนีไฮบริไดเซชั่น โดยทำการย้ายแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมซึ่งเลี้ยงบนจานเลี้ยงเชื้อมาบนแผ่นเมมเบรน ทำให้ดีเอ็นเอของแบคทีเรียเสียสภาพ แยกเป็นสายเดี่ยวด้วย 1.5 M NaCl และ 0.5 M NaOH จำนวน 2 ครั้งๆละ 5 นาที จากนั้น neutralize โคโลนีของแบคทีเรียด้วย 1.5 M NaCl และ 1M Tris-HCl, pH 8.0 จำนวน 2 ครั้งๆละ 5 นาที ทำการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ซึ่งดีเอ็นเอติดตามที่เลือกใช้คือ $(GAA)_n$, $(GAA)_8$, $(GATA)_6$, $(GGAT)_6$, $(GGAA)_5$, $(CACC)_5$, $(CATA)_6$, $(TCAG)_5$, $(ATG)_8$ และ $(CAT)_8$ ทำการติดฉลากตัวติดตามที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ที่ปลาย 5′ phosphate ของตัวติดตามด้วย (γ-^{32}P) ATP โดยอาศัย T_4 polyneucleotide kinase สำหรับตัวติดตาม $(GAA)_n$ ทำการติดฉลากบนสายดีเอ็นเอสายใหม่ด้วย (α-^{32}P)dCTP (random labelling) ทำการไฮบริไดซ์ในสารละลายที่ประกอบด้วย 1 M NaCl; 42 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1.2 mM EDTA; 0.2 %SDS; 1% BSA และ 0.1% Sodium pyrophosphate ที่ Tm ของตัวติดตาม -5 °C (สภาวะมาตรฐาน) หรือ Tm -10 °C (สภาวะที่ลดความแรงในขั้นตอนการไฮบริไดซ์) สำหรับตัวติดตาม $(GAA)_n$ ทำการไฮบริไดซ์ที่ 65°C เมื่อเกิดไฮบริดแล้วจึงล้างดีเอ็นเอติดตามที่ไม่สามารถจับคู่ออกโดยเมมเบรนที่ไฮบริไดซ์กับตัวติดตามที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ทำการล้างด้วย 2XSSC + 0.1% SDS ที่อุณหภูมิที่ใช้ในการไฮบริไดซ์ 10 นาที 1 ครั้ง และล้างด้วย 0.2XSSC + 0.1%SDS ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้งๆละ 10 นาที สำหรับเมมเบรนที่ไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม $(GAA)_n$ ทำการล้างเช่นเดียวกับตัวติดตามที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ แต่ทำการล้างที่อุณหภูมิ 65°C ทุกขั้นตอน โคลนที่ให้ผลบวกชัดเจนแสดงถึงการมีไมโครแซเทลไลต์ดีเอ็นเอ

5.2.2 การสร้างห้องสมุดยีนแบบ enrichment และการคัดเลือกไมโครแซเทลไลต์

5.2.2.1 การ enriched microsatellites โดยใช้ recombinant plasmids เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นและการสร้างห้องสมุดยีน (26)

ทำการสร้างห้องสมุดยีนแบบ conventional จากนั้นสกัดดีเอ็นเอของ recombinant plasmids ทั้งหมดที่ได้จากการสร้างห้องสมุดยีนด้วย QIAGen Plasmid Maxi kit (Qiagen, Inc., Chat Swort, CA) และแยก recombinant plasmid DNA ที่ประกอบด้วย GATA repeats ออกจาก recombinant plasmid DNA อื่นๆ โดยการไฮบริไดซ์ recombinant plasmid DNA 5 µg กับ $(GATA)_6$ probe ที่ติดฉลากด้วยไบโอตินที่ปลาย 5′ จำนวน 1µg ในสารละลายที่ประกอบด้วย 6XSSPE; 0.01% tween 20; 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 โดยทำการไฮบริไดซ์ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นแยกไฮบริดดีเอ็นเอด้วย magnetic bead ที่เคลือบด้วย streptavidin (Dyna beads M 280 Steptavidin; Dynal A.S., Oslo Norway) จำนวน 300 ng โดยบ่ม magnetic beads กับ hybridization reaction ที่ 50°C นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้าง beads 3 ครั้ง ด้วย 2XSSC+ 0.1% tween 20, 0.8XSSC+0.1% tween 20

และ 0.5XSSC+0.1%tween 20 ที่ 50°C นานครั้งละ 15 นาที ขั้นสุดท้ายทำการ elute recombinant plasmid DNA ออกจาก beads ด้วยน้ำกลั่นที่ 80°C 5 นาที นำ recombinant plasmid DNA ที่ได้จากการล้าง beads ครั้งที่ 2, 3 และการ elute ด้วยน้ำกลั่น ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E.coli* strain XLI-Blue ทำการเลี้ยงโคลนที่ได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาแอมพิซิลิน โคลนที่ได้นี้พร้อมที่จะนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อทำการหาลำดับเบสต่อไป

5.2.2.2 การ enriched microsatellites โดยใช้ genomic DNA เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นและการสร้างห้องสมุดยีน (27)

ทำการตัดดีเอ็นเอของกุ้งด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3A I จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 300-1,000 คู่เบสโดยใช้ 1.5% low melting agarose นำชิ้นดีเอ็นเอนี้จำนวน 5 µg มาเชื่อมต่อกับ SAU adapter ซึ่ง SAU1= 5′ GCGGTACCCGGGAAGCTTGG3′ และ SAU2= 5′ GATCCCA AGCTTCCCGGGTACCGC3′ ทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มี GATA และ GAA repeats ออกจากดีเอ็นเออื่นๆ โดยการไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม $(GATA)_6$ และ $(GAA)_8$ ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน โดยบ่มดีเอ็นเอของกุ้งที่ต่อกับ adapter แล้วกับตัวติดตาม $(GATA)_6$ หรือ $(GAA)_8$ จำนวน 3 µg ในสารละลาย 6XSSPE+ 0.1% tween 20 ที่ 55 °C นาน 1 ชั่วโมง ทำการแยกไฮบริดดีเอ็นเอด้วย magnetic beads ที่เคลือบด้วย streptavidin โดยบ่มรวมกับ hybridization reaction ที่ 55 °C นาน 3 ชั่วโมง ทำการล้าง beads และ elute DNA ออกจาก beads นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้สร้าง genomic library โดยทำชิ้นดีเอ็นเอที่แยกได้ให้เป็นเส้นคู่ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ SAU adapter เป็นไพรเมอร์ จากนั้นทำการตัด adapter ออกจากชิ้นดีเอ็นเอเส้นคู่โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3 AI เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่พร้อมจะนำไปใช้ในการสร้าง genomic library โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ 150 ng เชื่อมต่อเข้ากับ pUC 18 ที่ตัดด้วย *Bam* HI 50 ng โดยอาศัย T4 ligase บ่มที่ 16°C นาน 16-20 ชั่วโมง จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E.coli* strain XL1-Blue ทำการเลี้ยงโคลนที่ได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาแอมพิซิลิน, x-gal และ IPTG โคลนที่มีโคโลนีสีขาวพร้อมที่จะนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อทำการหาลำดับเบสต่อไป

5.3 หาลำดับนิวคลีโอไทด์และออกแบบไพรเมอร์

สกัดดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสมที่ถูกคัดเลือกด้วยวิธี rapid alkaline extraction (28) จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอกุ้งที่แทรกอยู่ในพลาสมิดโดยวิธี dideoxy sequencing method (29) โดยใช้ T7-sequencing™ kit (Pharmacia) แยก sequencing products ด้วย 8% denaturing polyacrylamide gel ทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ขนาบข้างไมโครแซทเทลไลต์ โดยให้มีความยาวประมาณ 18-25 เบส ใช้โปรแกรม OLOGO 4.0

5.4 ปรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์

สภาวะมาตรฐานที่ใช้คือใน 5 µl ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1XPCR buffer (GibCo BRL), 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM ของแต่ละ dNTP, 0.45 µM reverse primer, 0.425 µM forward primer, 0.025 µM (γ-^{32}P)ATP forward primer, 0.15 U Taq polymerase และดีเอ็นเอ 5-10 ng โปรแกรมที่ใช้ในการทำพีซีอาร์คือ pre-denaturation 95°C 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation 95°C 1 นาที, annealing ที่ Tm-5 °C เป็นเวลา 2 นาที, extension 72°C 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ extension 72°C 10 นาที จำนวน 1 รอบ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้นำไปแยกความแตกต่างโดย 8% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ในขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำพีซีอาร์ จะทำการทดสอบหาอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนของการ anneal เป็นอันดับแรก โดยจะทำการ anneal ที่ Tm-5 °C ถ้าพบว่าให้ผลผลิตพีซีอาร์ไม่ชัดเจนก็จะทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนนี้ ถ้ายังไม่พบสภาวะที่เหมาะสมอีกจะทำการปรับเปลี่ยนปริมาณ $MgCl_2$ และ Taq polymerase

5. 5 ทดสอบความหลากหลายของไมโครแซเทลไลต์

ไพรเมอร์คู่ที่สามารถเพิ่มขยายไมโครแซเทลไลต์ได้ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดอยู่ในช่วงที่คาดหมายจะนำไปศึกษาความหลากหลายของไมโครแซเทลไลต์ โดยการตรวจยีโนไทป์ของกุ้งกุลาดำจากธรรมชาติจำนวน 45 ตัว จากนั้นประเมินค่าความถี่ของอัลลีล เฮทเทอร์โรไซโกซิตี้ และ polymorphic information content (PIC) ซึ่งสูตรการคำนวณ ค่าความถี่ของอัลลีลคือ $p = (2N_{AA} + N_{Aa}) / 2N$ โดย p = ความถี่ของอัลลีล A, N = จำนวนตัวอย่างตรวจ, N_{AA} และ N_{Aa} = จำนวนโฮโมไซกัส และ เฮทเทอร์โรไซกัส สำหรับค่า observed heterozygosity (h_{obs}) คำนวณได้จากข้อมูลจริงโดยการนับเฮทเทอร์โรไซกัสยีโนไทป์ ค่า PIC = $1 - \sum Pi^2$ โดย Pi = ความถี่ของ อัลลีล i^{th} (30)

5. 6 ทดสอบการทำมัลติเพลกซ์พีซีอาร์และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยสารละลายซิลเวอร์

มัลติเพลกซ์พีซีอาร์เป็นการเพิ่มขยายไมโครแซเทลไลต์มากกว่า 1 ตำแหน่งใน 1 ปฏิกิริยาของพีซีอาร์ โดยทดสอบกับตำแหน่งของไมโครแซเทลไลต์ที่คัดเลือกในข้อ 5.5 ตำแหน่งของไมโครแซเทลไลต์ที่เหมาะในการทำมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ควรมีช่วงขนาดของอัลลีลไม่เหลื่อมล้ำกัน นอกจากนี้อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ควรใกล้เคียงกัน (31) ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเช่นเดียวสภาวะมาตรฐานของการทำพีซีอาร์ปกติ ยกเว้นปริมาณ $MgCl_2$ และ dNTP ซึ่งปริมาณของ $MgCl_2$ และ dNTP คือ 2.5 mM และ 300 µM ตามลำดับ อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนของการ anneal จะต่ำกว่าการทำพีซีอาร์ปกติ 2-5 °C ถ้าพบว่าให้ผลผลิตพีซีอาร์ไม่ชัดเจนก็จะทำการปรับปริมาณ Taq polymerase, primer

เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารรังสี และเพื่อความสะดวกในการทำยีโนไทป์ของกุ้ง จึงทำการตรวจสอบผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้ด้วยสารละลายซิลเวอร์ ซึ่งมีความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเอมากกว่าเอธิเดียมโบรไมด์ (32) วิธีการตรวจสอบผลิตผลพีซีอาร์ด้วยสารละลายซิลเวอร์คือ fix gel ด้วย 10% acetic acid เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นย้อม gel ด้วยสารละลาย silver (10% AgNo3+0.4% formaldehyde) เป็นเวลา 15 นาที และ develop gel ด้วย 3% sodium carbonate+0.4% formaldehyde+2 mg/ml sodium thiosulfate เมื่อเห็นผลิตผลพีซีอาร์ชัดเจนทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 10 % acetic acid

5.7 การประยุกต์ใช้จำแนกพันธุกรรม

5.7.1 การตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรกุ้งกุลาดำ

เก็บตัวอย่างกุ้ง 5 กลุ่มคือ สตูล ตรัง พังงา ตราดและชุมพร ตรวจความผันแปรที่ไมโครแซ-เทลไลต์ตำแหน่งต่างๆ คือ CUPmo1, CUPmo2, CUPmo18, Di25*, และ Di27* นับจำนวนอัลลีลและการกระจายของอัลลีล และค่า heterozygosity ในแต่ละกลุ่มประชากร คำนวณค่า effective number of allele (n_e) จากสูตร $n_e = 1/\Sigma P^2$ เมื่อ P = ค่า allelic frequencies เมื่อนำมาคำนวณเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกุ้งจากทะเลอันดามันกับกุ้งอ่าวไทยและภายในกุ้งที่อยู่ฝั่งเดียวกัน โดยใช้โปรแกรม GENEPOP (33) หาค่า genetic distance ระหว่างกลุ่มตัวอย่างจาก Cavalli-Sforza and Edwards (1967) chord distance โดยใช้โปรแกรม GENDIST วิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยสร้าง Neighbor-joining tree โดยใช้โปรแกรม PHYLIP (33, 34)

5.7.2 การตรวจยีโนไทป์ของกุ้งในโปรแกรมการคัดพันธุ์

นำเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่ได้ในข้อ 5.6 จำนวน 2-5 ตำแหน่ง ไปใช้ตรวจยีโนไทป์ของกุ้งในโปรแกรมการคัดพันธุ์ เพื่อจำแนกครอบครัวกุ้งที่จะใช้เลี้ยงเป็นพ่อ-แม่พันธุ์

5.7.3 การทำแผนที่จีโนม

เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาได้นำไปใช้ในการทำแผนที่จีโนม โดยร่วมมือกับ Dr. Stephen Moore จาก CSIRO Molecular Animal Genetic Centre ประเทศออสเตรเลีย เพื่อนำไมโครแซเทลไลต์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปใช้ในการทำแผนที่จีโนม โดยทำการตรวจยีโนไทป์ของ Reference families ซึ่งประกอบด้วยครอบครัวกุ้ง 3 ครอบครัว ใน 1 ครอบครัวประกอบด้วย ปู่, ย่า, ตา, ยาย, พ่อ, แม่ และ ลูก 42 ตัว

* Di25 และ Di27 เป็นเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในกุ้งกุลาดำที่ได้จากการแลกเปลี่ยนไพรเมอร์กับ Dr.F. Bonhomme, Laboratoire Genome et Populations, CNRS URA, Universite' de Montpellier, France

6. ผลการทดลอง

6.1 การแยกไมโครแซเทลไลต์ชนิด tri- และ tetranucleotide

6.1.1 ห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นด้วยวิธี convention

ผลการตรวจสอบไมโครแซเทลไลต์จากห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นด้วยวิธี convention แสดงในตารางที่1 ผลจากการไฮบริไดซ์พบโคโลนีที่ให้ผลบวกทั้งสิ้น 63,900 โคโลนี ซึ่งให้ผลบวกสูงเมื่อตรวจสอบด้วยตัวติดตาม $(GAA)_n$, $(GAA)_8$ และ $(GATA)_6$ มีค่าอยู่ในช่วง 0.23-1.21% ตัวติดตามที่ให้ผลบวกสูงรองลงมาคือ $(CAT)_8$ และ $(ATG)_8$ สำหรับตัวติดตาม $(GGAT)_6$, $(GGAA)_5$, $(CACC)_5$, $(TCAG)_5$ และ $(CATA)_6$ ให้ค่าผลบวกน้อยมาก (0-0.08%) แสดงว่าไมโครแซเทลไลต์แบบ trinucleotide คือ $(GAA)_n$, $(CAT)_n$, $(ATG)_n$ และ tetranucleotide repeats $(GATA)_n$ พบได้มากในจีโนมของกุ้งกุลาดำ แต่สำหรับ $(GGAT)_n$, $(GGAA)_n$, $(CACC)_n$, $(TCAG)_n$, $(CATA)_n$ พบในจีโนมของกุ้งกุลาดำน้อยมากหรือไม่พบเลย

จากนั้นได้ทำการหาลำดับเบสของโคโลนีที่ให้ผลบวก โดยเลือกทำการหาลำดับเบสของโคโลนีที่มีขนาดชิ้น insert สูงกว่า 400 คู่เบสทุกโคโลนี ส่วนโคโลนีที่มีขนาด 300-400 คู่เบส จะทำการหาลำดับเบสเป็นบางส่วน จากการตรวจสอบไมโครแซเทลไลต์โดยการไฮบริไดซ์ที่สภาวะมาตรฐานคือไฮบริไดซ์และล้างเมมเบรนที่ Tm ของตัวติดตาม -5°C [Sonicated ที่ตรวจสอบด้วย $(GAA)_n$, $(GATA)_6$, $(GGAT)_6$, $(GGAA)_5$ และ $(CACC)_5$] เมื่อทำการหาลำดับเบสของโคโลนีที่ให้ผลบวก 75 โคโลนี พบว่า 70 โคโลนี ประกอบด้วยไมโครแซเทลไลต์ โดยที่ 57 โคโลนีเป็นไมโครแซเทลไลต์ชนิดเดียวกับตัวติดตามที่ใช้ตรวจสอบ มีเพียง 5 โคโลนีเท่านั้นที่ไม่พบไมโครแซเทลไลต์เลย จากผลการหาลำดับเบสพบว่าโคโลนีส่วนใหญ่จะมีไมโครแซเทลไลต์ยาวตลอดเกือบทั้งโคลน หรือปลายข้างหนึ่งของส่วนไมโครแซเทลไลต์ติดส่วน cloning site ทำให้ไม่มีบริเวณ flanking region เพียงพอที่จะออกแบบไพรเมอร์ได้ ดังนั้นเมื่อทำการสร้างห้องสมุดยีนแบบ convention อีกครั้ง ได้ทำการลดอุณหภูมิในขั้นตอนการไฮบริไดซ์และล้างเมมเบรน โดยทำการไฮบริไดซ์และล้างเมมเบรนที่ Tm ของตัวติดตาม -10°C [DNase, Sonicated และ *Hinc* II/*Alu* I ที่ตรวจสอบด้วยตัวติดตาม $(GAA)_8$, $(GATA)_6$, $(CATA)_6$, $(TCAG)_5$, $(ATG)_8$, และ $(CAT)_8$] ทำการหาลำดับเบสห้องสมุดยีนนี้ 77 โคโลนี พบว่าโคโลนีจำนวน 51 โคโลนี ประกอบด้วยไมโครแซเทลไลต์ โดยมี 22 โคโลนีประกอบด้วยไมโครแซเทลไลต์ชนิดเดียวกับตัวติดตาม ส่วนโคโลนีที่ไม่มีไมโครแซเทลไลต์ประกอบมีสูงถึง 26 โคโลนี อย่างไรก็ตามโคโลนีที่ได้จากห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นจากการย่อยชิ้นดีเอ็นเอของกุ้งด้วย DNase หรือการ sonicate ยังพบว่าปลายด้านหนึ่งของไมโครแซเทลไลต์อยู่ติดกับส่วน cloning site เช่นกัน แต่สำหรับห้องสมุดยีนที่สร้างจากการตัดชิ้นดีเอ็นเอของกุ้งด้วย *Hinc* II/*Alu* I พบโคโลนีที่มีส่วนของไมโครแซเทลไลต์ไม่ติดกับส่วน cloning site ได้ง่ายกว่า ทำให้พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมจากห้องสมุดยีนนี้ได้สูงสุด โดยพบไพรเมอร์ที่ตรวจ

ยีโนไทป์ของกุ้งได้สูงถึง 14 คู่ ห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นจากการ sonicate ชิ้นดีเอ็นเอของกุ้งทั้ง 2 ห้องสมุดยีน พบไพรเมอร์ที่สามารถตรวจยีโนไทป์ของกุ้งได้รวม 9 คู่

ตารางที่ 1. ผลการแยก microsatellite sequences จากห้องสมุดยีนแบบ convention

ชนิดของห้องสมุดยีน	ตัวติดตาม	โคโลนีที่ตรวจสอบ	โคโลนีที่ให้ผลบวก (%)	โคโลนีที่หาลำดับเบส	โคโลนีที่มี microsatellite sequences ของตัวติดตาม	โคโลนีที่ไม่มี microsatellite sequences	จำนวนเครื่องหมายพันธุกรรม
Sonicated*	$(GAA)_n$	9,900	24(0.24)	23	18	1	1
	$(GATA)_6$	4,200	51(1.21)	48	36	4	6
	$(GGAT)_6$	7,560	3(0.04)	3	2	0	0
	$(GGAA)_5$	1,900	1(0.05)	1	1	0	0
	$(CACC)_5$	1,900	0(0.00)	0	0	0	0
DNase#	$(GAA)_8$	2,500	16(0.64)	9	5	2	0
	$(GATA)_6$	2,500	13(0.52)	7	2	2	0
	$(CAT)_8$	2,400	2(0.08)	2	2	0	0
	$(ATG)_8$	2,400	4(0.17)	4	3	1	0
	$(TCAG)_5$	2,400	1(0.04)	1	0	0	0
	$(CATA)_6$	2,400	2(0.08)	2	0	0	0
Sonicated#	$(GAA)_8$	2,640	13(0.49)	8	5	2	1
	$(GATA)_6$	2,640	6(0.23)	4	0	1	0
	$(CAT)_8$	2,100	3(0.29)	3	1	1	1
	$(ATG)_8$	2,100	4(0.38)	4	1	1	0
	$(TCAG)_5$	2,100	0(0.00)	0	0	0	0
	$(CATA)_6$	2,100	0(0.00)	0	0	0	0
Hinc II/ *Alu* I#	$(GAA)_8$	5,080	37(0.72)	18	2	9	6
	$(GATA)_6$	5,080	30(0.59)	15	1	7	8
Total		63,900	210(0.33)	152	79	31	23

* = ไฮบริไดซ์ที่สภาวะมาตรฐาน (Tm ของตัวติดตาม -5 °C)

= ลดความแรงในการไฮบริไดซ์ (Tm ของตัวติดตาม -10 °C)

6.1.2 ห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นด้วยวิธี enrichment

จากผลการสร้างห้องสมุดยีนด้วยวิธี convention พบว่า GAA และ GATA repeats พบมากในจีโนมของกุ้งกุลาดำ ดังนั้นในการสร้างห้องสมุดยีนแบบ enrichment จึงเลือกที่จะทำ enrichment ของ microsatellite 2 ชนิดนี้ ในครั้งแรกของการสร้างห้องสมุดยีนแบบ enrichment ได้ใช้ recombinant plasmid DNA เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นเพื่อสร้างห้องสมุดยีน โดย enriched recombinant plasmid DNA ที่ประกอบด้วย GATA repeats จากการหาลำดับเบสของโคโลนีที่ได้ พบว่าโคโลนีส่วนใหญ่มี insert ที่ซ้ำกันโดยพบโคโลนีที่แตกต่างกันเพียง 34 โคโลนี ซึ่งในจำนวนนี้ 22 โคโลนีประกอบด้วยไมโครแซเทลไลต์ชนิด GATA repeats และ 12 โคโลนีไม่มีไมโครแซเทลไลต์ (ตารางที่ 2ก.) อุณหภูมิที่ใช้ในการ enrichment recombinant plasmid DNA นี้คือ Tm ของตัวติดตาม -10°C ซึ่งทำให้ผลบวกปลอมสูง ในงานวิจัยนี้ทำการโคลน recombinant plasmid DNA ที่ elute จาก magnetic beads 3 ขั้นตอนด้วยกันเพื่อต้องการแยกไมโครแซเทลไลต์ที่มีจำนวนซ้ำน้อยๆออกจากไมโครแซเทลไลต์ที่มีจำนวนซ้ำสูงๆ โคโลนีส่วนใหญ่ที่ได้จากการโคลน recombinant plasmid DNA ที่ elute จากน้ำกลั่นจะมีจำนวนซ้ำสูงกว่าการ elute จาก wash 2 และ 3 อย่างไรก็ตาม ไมโครแซเทลไลต์ที่ได้จากการ elute wash 2 และ 3 ยังคงมีปัญหาปลายไมโครแซเทลไลต์ข้างหนึ่งติดส่วน cloning site สามารถแยกเครื่องหมายพันธุกรรมออกจากห้องสมุดยีนนี้ได้เพียง 2 ตำแหน่ง

เนื่องจากการสร้างห้องสมุดยีนแบบ enrichment โดยใช้ recombinant plasmid DNA เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นนั้น พบว่าโคโลนีที่ได้จากห้องสมุดยีนแบบนี้มี insert ซ้ำกันมาก จึงทำการปรับปรุงโดยทำ enrichment จากชิ้น genomic DNA โดยตรง และตัดชิ้นดีเอ็นเอของกุ้งด้วย *Sau*3A I แทนการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง เนื่องจากมีความสะดวกในการเชื่อม adapter เข้าที่ปลายดีเอ็นเอของกุ้ง ผลการ enriched GATA repeats แสดงในตารางที่ 2ข. จากการหาลำดับเบสจำนวน 68 โคโลนี พบโคโลนีที่มี GATA repeats 59 โคโลนี และ 2 โคโลนี ไม่มีไมโครแซเทลไลต์ประกอบอยู่ โดยชิ้น insert ที่ได้จากห้องสมุดยีนนี้มีความแตกต่างกัน จากผลการหาลำดับเบสพบว่าโคโลนีส่วนใหญ่ (ประมาณ 90%) ปลายข้างหนึ่งของไมโครแซเทลไลต์ติดส่วน cloning site ซึ่งทำให้ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์จากห้องสมุดยีนนี้ได้เลย คาดว่าน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากการตัดดีเอ็นเอของกุ้งด้วย *Sau* 3 AI อาจจะไม่เหมาะสมกับการแยก GATA repeats ในขั้นต่อมาจึงทำการแยก GAA repeats แทน จากการหาลำดับเบส 34 โคโลนี พบว่ามี 8 โคโลนีที่ประกอบด้วย GAA repeats และ 20 โคโลนีไม่มีไมโครแซเทลไลต์ โดยผลบวกปลอมพบมากจากการโคลนชิ้นดีเอ็นเอของกุ้งที่ elute จาก wash 2 และ 3 (ตารางที่ 2ข.) โดยส่วนใหญ่ GAA repeats ที่พบจากโคโลนีที่หาลำดับเบสไม่อยู่ติด cloning site สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 5 คู่ จากโคโลนีที่ประกอบด้วยไมโครแซเทลไลต์ 14 โคโลนี แต่พบว่าเมื่อนำไพรเมอร์เหล่านี้มาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจยีโนไทป์ พบไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 คู่ ซึ่งคาดว่าปัญหาเกิดจากขั้นตอนการทำ genomic DNA จาก

เส้นเดี่ยวให้เป็นเส้นคู่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ทำให้มีสาย genomic DNA ที่เป็นสายปลอมซึ่งเกิดจากการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ตารางที่ 2. ผลการแยก microsatellite sequences จากห้องสมุดยีนแบบ enrichment

ก. enriched microsatellite จาก recombinant plasmid DNA

ชิ้น inserts ที่ใช้สร้างห้องสมุดยีน	ตัวติดตาม	โคโลนีที่หาลำดับเบส	โคโลนีที่มี microsatellite sequences ของตัวติดตาม	โคโลนีที่ไม่มี microsatellite sequences	จำนวนเครื่องหมายพันธุกรรม
Elute จาก wash 2[a]	$(GATA)_6$[#]	8	7	1	0
Elute จาก wash 3[b]		14	7	7	1
Elute จาก น้ำกลั่น		12	8	4	1
รวม		34	12	12	2

ข. enriched microsatellite จาก genomic DNA

ชิ้น inserts ที่ใช้สร้างห้องสมุดยีน	ตัวติดตาม	โคโลนีที่หาลำดับเบส	โคโลนีที่มี microsatellite sequences ของตัวติดตาม	โคโลนีที่ไม่มี microsatellite sequences	จำนวนเครื่องหมายพันธุกรรม
Elute จาก wash 2[a]	$(GATA)_6$*	30	26	1	0
Elute จาก wash 3[b]		24	21	1	0
Elute จาก น้ำกลั่น		14	12	0	0
รวม		68	59	2	0

ชิ้น inserts ที่ใช้สร้างห้องสมุดยีน	ตัวติดตาม	โคโลนีที่หาลำดับเบส	โคโลนีที่มี microsatellite sequences ของตัวติดตาม	โคโลนีที่ไม่มี microsatellite sequences	จำนวนเครื่องหมายพันธุกรรม
Elute จาก wash 2[a]	$(GAA)_6$[#]	15	0	11	1
Elute จาก wash 3[b]		8	3	5	0
Elute จาก น้ำกลั่น		11	5	4	0
รวม		34	8	20	1

[a] wash 2 = 0.8XSSC + 0.1% tween 20 [b] wash 3 = 0.5XSSC + 0.1% tween 20

* enriched ที่สภาวะมาตรฐาน (Tm ของตัวติดตาม -5 °C)

[#] ลดความแรงในการ enriched (Tm ของตัวติดตาม -10 °C)

6. 2 ลักษณะของไมโครแซเทลไลต์ในกุ้งกุลาดำ

จากการหาลำดับเบสโคโลนีที่ให้ผลบวกจากห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นทั้ง 2 แบบ พบว่าส่วนใหญ่ใน 1 โคโลนี ประกอบด้วยไมโครแซเทลไลต์มากกว่า 1 ตำแหน่ง ลักษณะของลำดับเบสที่นับว่าเป็นไมโครแซเทลไลต์พิจาราณาจากจำนวนซ้ำของเบสนั้นๆ คือ mono-, di- และ trinucleotide repeats จะต้องมีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 10, 6 และ 4 หน่วยซ้ำขึ้นไป ตามลำดับ สำหรับ tetra-, penta- และ hexanucleotide repeats จะต้องมีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 3 หน่วยซ้ำขึ้นไป (18) การแยกไมโครแซเทลไลต์จากห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นแบบ convention พบไมโครแซเทลไลต์ 167 ตำแหน่งจากโคโลนีที่ประกอบด้วยไมโครแซเทลไลต์จำนวน 121 โคโลนี (ตารางที่ 3) สำหรับห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นแบบ enrichment พบไมโครแซเทลไลต์ 168 ตำแหน่ง จากโคโลนีที่ประกอบด้วยไมโครแซเทลไลต์จำนวน 102 โคโลนี (ตารางที่ 4)

ลักษณะของไมโครแซเทลไลต์แบ่งตาม Weber, 1990 (35) ได้ 3 แบบด้วยกัน คือ 1. Perfect 2. Imperfect และ 3. Compound repeats ซึ่ง Perfect repeats เป็นไมโครแซเทลไลต์ที่ไม่มีเบสอื่นมาคั่น Imperfect repeats เป็นไมโครแซเทลไลต์ที่มีเบสอื่นๆ 1-3 เบส แทรกอยู่ระหว่างหน่วยซ้ำ และ Compound repeats เป็นไมโครแซเทลไลต์ที่ประกอบด้วยเบสซ้ำมากกว่า 1 ชนิดและมีเบสอื่นๆ แทรกได้ไม่เกิน 3 เบส (รูปที่ 1) ไมโครแซเทลไลต์แบบ Perfect repeats พบสูงสุด โดยพบ 42% สำหรับห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นแบบ convention และ 68.5% สำหรับห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นแบบ enrichment ไมโครแซเทลไลต์แบบ Imperfect repeats พบได้รองลงมา (36.5% และ 19.6% สำหรับห้องสมุดยีนแบบ convention และ enrichment ตามลำดับ) Compound repeats พบได้น้อยที่สุด (21.5% และ 11.9% สำหรับห้องสมุดยีนแบบ convention และ enrichment ตามลำดับ) ไมโครแซเทลไลต์ที่เป็น Compound repeats ส่วนใหญ่มี dinucleotide repeats เป็นส่วนประกอบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3. ลักษณะของ microsatellite sequences ซึ่งพบในโคลนที่ทำการหาลำดับเบสจากห้องสมุดยีนแบบ convention

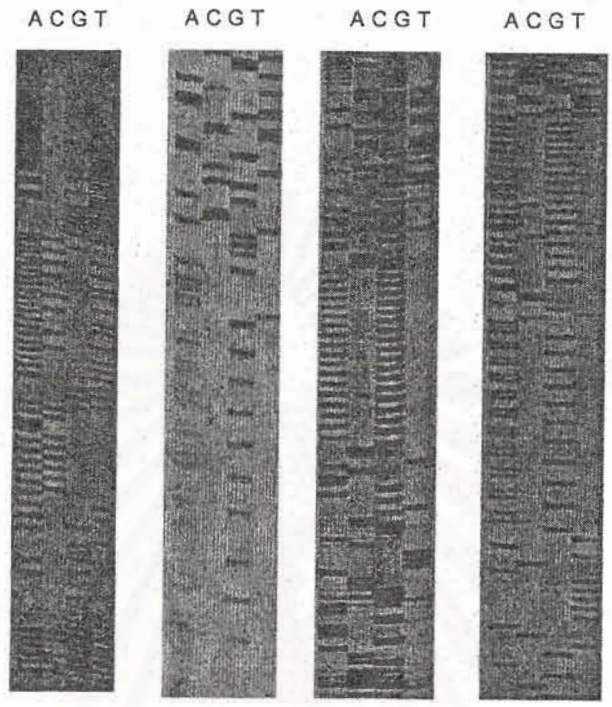
ชนิดของ repeat	จำนวนตำแหน่ง	จำนวนซ้ำ	ประเภทของ repeat		
			Perfect	Imperfect	Compound
A	1	29	1	0	0
$(GA)_n$	30	6-85	15	10	5
$(GT)_n$	10	6-87	3	5	2
$(AT)_n$	9	7-63	4	3	2
$(GAA)_n$	54	5-88	20	27	7
$(GGA)_n$	9	5-17	3	6	0
$(TAA)_n$	11	5-38	7	2	2
$(ATG)_n$	11	5-24	4	4	3
$(CAT)_n$	6	7-30	3	1	2
$(AGC)_n$	1	12	1	0	0
$(TGC)_n$	2	8, 24	1	0	1
$(CATA)_n$	1	5	1	0	0
$(GATA)_n$	21	5-28	6	3	12
$(GGAA)_n$	1	8	1	0	0
รวม	167		70(42%)	61(36.5%)	36(21.5%)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4. ลักษณะของ microsatellite sequences ซึ่งพบในโคลนที่ทำการหาลำดับเบสจากห้องสมุดยีนแบบ enrichment

ชนิดของ repeat	จำนวนตำแหน่ง	จำนวนซ้ำ	ประเภทของ repeat		
			Perfect	Imperfect	Compound
$(AT)_n$	5	14-85	1	4	0
$(GT)_n$	6	16-27	2	1	3
$(GA)_n$	13	6-94	9	3	1
$(CAT)_n$	3	8-15	1	1	1
$(ATG)_n$	3	5-35	3	0	0
$(TAA)_n$	11	5-47	5	4	2
$(ACC)_n$	1	5	1	0	0
$(GAA)_n$	10	5-23	5	3	2
$(GATA)_n$	108	4-58	82	15	11
$(GTAA)_n$	1	8	1	0	0
$(GGAA)_n$	2	4, 14	2	0	0
$(GTCA)_n$	1	7	1	0	0
$(GATC)_n$	1	27	1	0	0
$(AATG)_n$	1	7	1	0	0
$(GACT)_n$	1	14	0	1	0
$(TCTAG)_n$	1	8	0	1	0
รวม	168		115(68.5%)	33(19.6%)	20(11.9%)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1. ตัวอย่างลำดับเบสของไมโครแซเทลไลต์ที่แยกได้จากห้องสมุดยีนของกุ้งกุลาดำ

a. = ไมโครแซเทลไลต์ประเภท perfect และ compound repeats $[(AC)_n...(GT)_n...(TA)_n (TAGA)]_n$

b. และ c. = ไมโครแซเทลไลต์ประเภท perfect repeats $[(GAA)_n$ และ $(GA)_n$ ตามลำดับ]

d. = ไมโครแซเทลไลต์ประเภท imperfect repeats $[(GAA)_n]$

6.3 การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซเทลไลต์และการทดสอบความหลากหลาย

งานวิจัยนี้สามารถแยกไมโครแซเทลไลต์ได้ถึง 335 ตำแหน่ง แต่สามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมได้เพียง 26 ตำแหน่ง โดยส่วนมากปัญหาเกิดเนื่องมาจากปลายข้างหนึ่งของไมโครแซเทลไลต์อยู่ติดส่วน cloning site หรือไมโครแซเทลไลต์ชนิด Compound repeats ซึ่งประกอบด้วยไมโครแซเทลไลต์มากกว่า 1 ชนิดเรียงติดกัน เป็นผลให้ไมโครแซเทลไลต์นั้นๆยาวตลอดทั้งโคลน เครื่องหมายพันธุกรรม 26 ตำแหน่งนี้ พัฒนาได้จากห้องสมุดยีนแบบ convention 23 ตำแหน่ง และพัฒนาจากห้องสมุดยีนแบบ enrichment 3 ตำแหน่ง เมื่อนำมาใช้ในการตรวจยีโนไทป์ พบว่าให้ผลผลิตพีซีอาร์อยู่ในช่วงที่คาดหมาย (รูปที่ 2) ลักษณะของเครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 26 ตำแหน่งแสดงในตารางที่ 5

จากการทดสอบความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมที่พัฒนาได้ โดยการตรวจยีโนไทป์ของกุ้งกุลาดำจากอ่าวไทย เครื่องหมายพันธุกรรมจำนวน 21 ตำแหน่ง สามารถตรวจพบความแตกต่างทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำ ส่วนเครื่องหมายพันธุกรรมที่เหลือไม่มีความแตกต่างของอัลลีล โดย 4 ตำแหน่งให้ผลการตรวจยีโนไทป์ของกุ้งกุลาดำเป็น monomorphic (CUPmo5, CUPmo26, CUPmo27, CUPmo29) และ 1 ตำแหน่ง (CUPmo28) ผลการตรวจยีโนไทป์พบจำนวนอัลลีล 2 อัลลีลทุกตัวอย่างตรวจ เครื่องหมายพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม จะมีจำนวนอัลลีลที่สูงและค่า PIC เข้าใกล้ 1 ซึ่งเครื่องหมายไมโครแซ-เทลไลต์ 21 ตำแหน่งนี้ มีความสามารถตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำได้ในระดับที่ต่างกัน คือ CUPmo 1-4, 6, 7, 9, 17, 20 และ 22 มีความหลากหลายในระดับสูง คือมีจำนวนอัลลีลสูงกว่า 21 อัลลีล ส่วน CUPmo11-13, 15, 19 และ 23-25 มีความหลากหลายในระดับปาน-กลาง มีจำนวนอัลลีลอยู่ในช่วง 7-16 อัลลีล และ CUPmo14, 16 และ 21 มีความหลากหลายในระดับต่ำโดยมีจำนวนอัลลีลเพียง 4 อัลลีล เครื่องหมายพันธุกรรมจำนวน 18 ตำแหน่ง มีค่า Observed heterozygosity ตั้งแต่ 0.43 ขึ้นไป และ 3 ตำแหน่งที่เหลือ มีค่า Observed heterozygosity ค่อนข้างต่ำคือ CUPmo 7, 20 และ 21 มีค่าเท่ากับ 0.16, 0.27 และ 0.28 ตามลำดับ การกระจายความถี่อัลลีลของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 21 ตำแหน่ง แสดงดังรูปที่ 3.

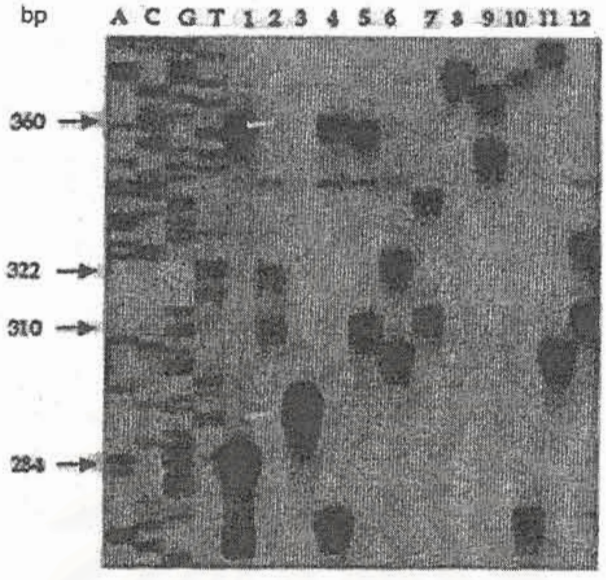
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5. ลักษณะของเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลต์จากการตรวจสอบยีโนไทป์ของกุ้งกุลาดำ

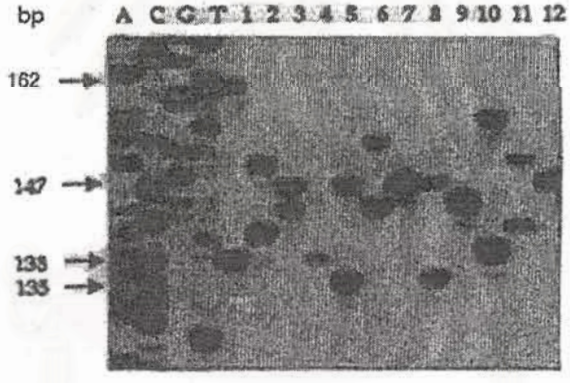
Locus	Repeat sequences	Annealing Temp. (^{o}C)	Size range of alleles	No. of alleles (No. of samples)	Observed heterozygosity	PIC*
CUPmo 1	$(GAA)_{43}$	56	224-326	29(51)	0.73	0.94
CUPmo 2	$(ATCT)_{12}(TA)_{10}(TAGA)_3$	56	137-217	28(51)	0.78	0.93
CUPmo 3	$(ATCT)_{12}(AT)_9(GT)_9$	56	135-223	27(49)	0.63	0.92
CUPmo 4	$(CT)_{10}TG(CT)_{17}(ATCT)_{10}$	54	206-256	21(45)	0.89	0.89
CUPmo 5	$(GATA)_4...(GATA)_4$	56	120	1(10)	0	nd#
CUPmo 6	$(GATA)_6(GA)_{16}$	56	166-242	28(49)	0.69	0.95
CUPmo 7	$(CT)_{15}(ATCT)_9$	56	172-234	22(43)	0.16	0.93
CUPmo 9	$(TA)_{49}$	54	274-380	33(40)	0.90	0.95
CUPmo 11	$(TAA)_9TGA(TAA)_3$	56	132-162	10(47)	0.81	0.80
CUPmo 12	$(GA)_{18}$	54	83-105	8(41)	0.44	0.77
CUPmo 13	$(TCA)_9$	58	271-316	12(43)	0.86	0.85
CUPmo 14	$(GT)_9CAG(GT)_3$	58	275-281	4(46)	0.43	0.74
CUPmo 15	$(TAA)_{10}$	52	267-351	15(44)	0.66	0.93
CUPmo 16	$(CAT)_8$	52	224-233	4(44)	0.48	0.48
CUPmo 17	$(TAA)_3(TGA)_{16}(TAA)_2$	52	282-447	25(40)	0.72	0.93
CUPmo 19	$(TAA)_{10}$	54	300-351	16(46)	0.78	0.90
CUPmo 20	$(GA)_{46}$	50	156-220	26(44)	0.27	0.94
CUPmo 21	$(TTA)_5TTG(TTA)_5$	60	230-239	4(46)	0.28	0.34
CUPmo 22	$(AG)_9AAA(AG)_{52}$	50	184-258	23(40)	0.48	0.92
CUPmo 23	$(GATA)_{10}$	60	299-323	7(40)	0.72	0.68
CUPmo 24	$(ATT)_2GTT(ATT)_9$	50	332-368	12(40)	0.65	0.75
CUPmo 25	$(GA)_7GC(GA)_7AA(GA)_{18}$	62	251-281	12(45)	0.82	0.83
CUPmo 26	$(CA)_9$	62	273	1(20)	0	nd
CUPmo 27	$(GGA)_2GAA(GGA)_5$	66	370	1(20)	0	nd
CUPmo 28	$(GCA)_7$	58	142, 145	2(20)	1	nd
CUPmo 29	$(GA)_8$	62	181	1(20)	0	nd

* Polymorphic information content

Not determined

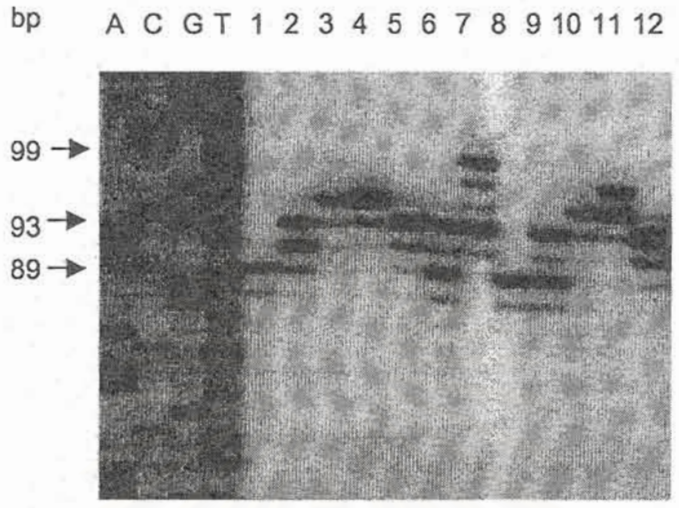


CUPmo 9

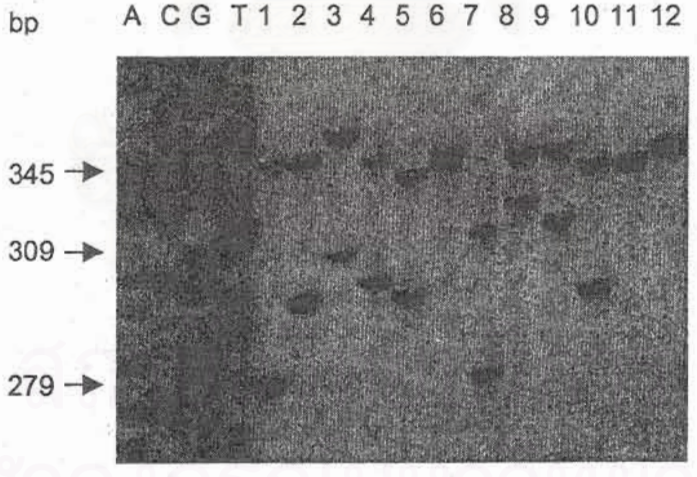


CUPmo 11

รูปที่ 2. Amplification patterns ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่งต่างๆ ขนาดของอัลลีลเทียบกับ sequencing ladder ของ M13mp18 (A,C,G,T)
แถวที่ 1-12 : กุ้งกุลาดำ 12 ตัว



CUPmo 12

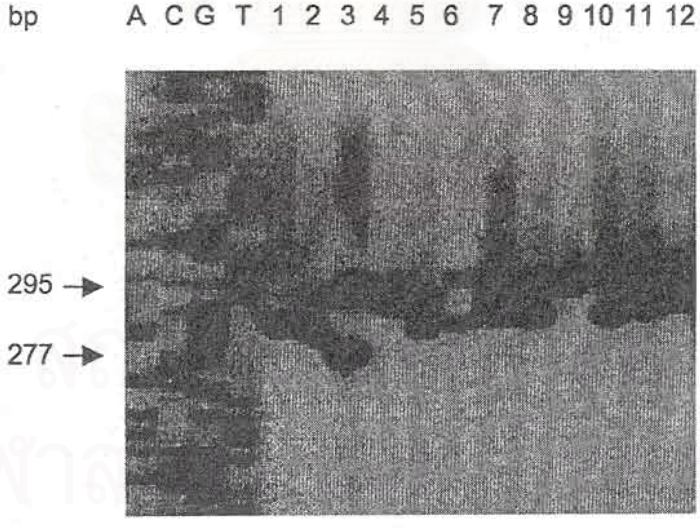


CUPmo 15

รูปที่ 2. (ต่อ)

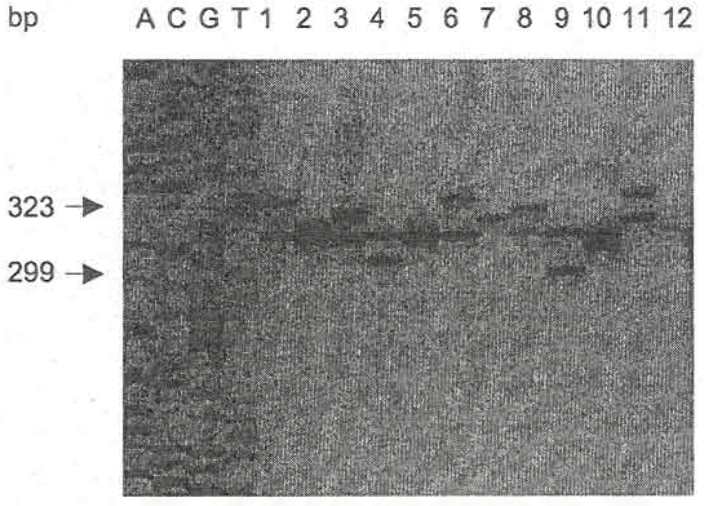
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CUPmo 16



CUPmo 13

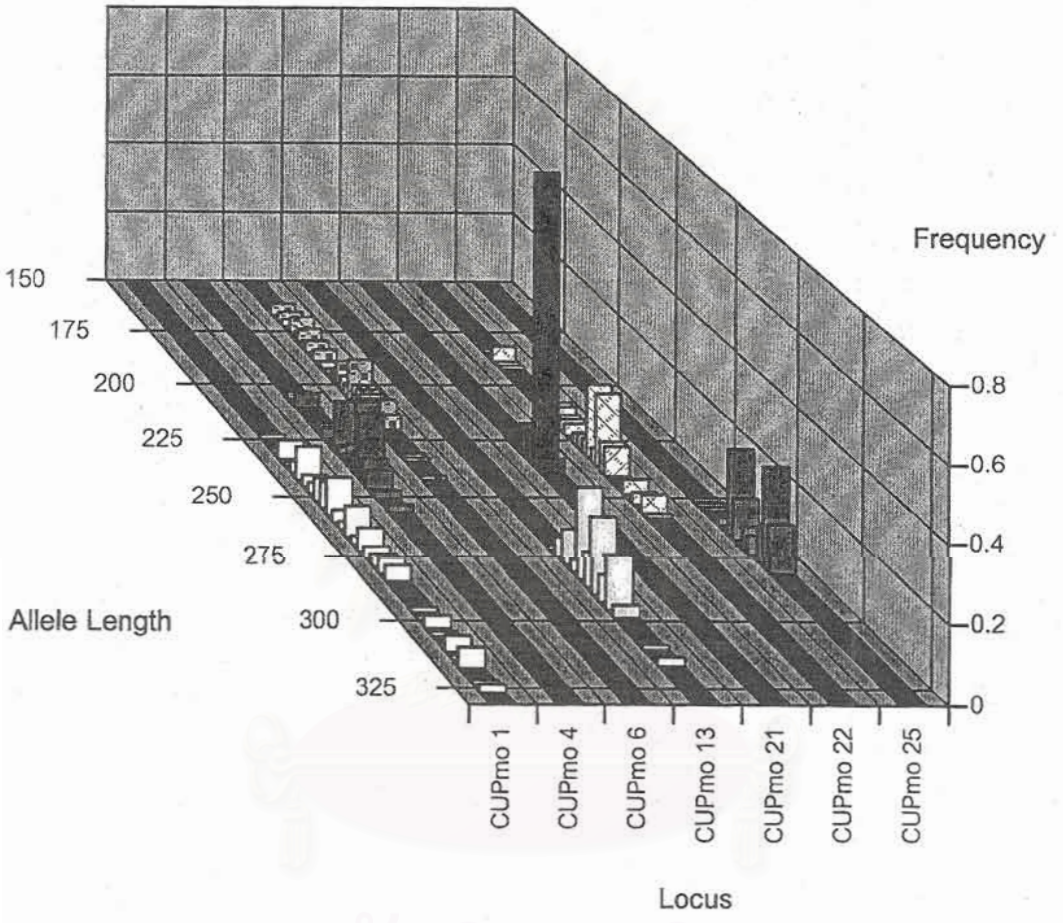
รูปที่ 2. (ต่อ)



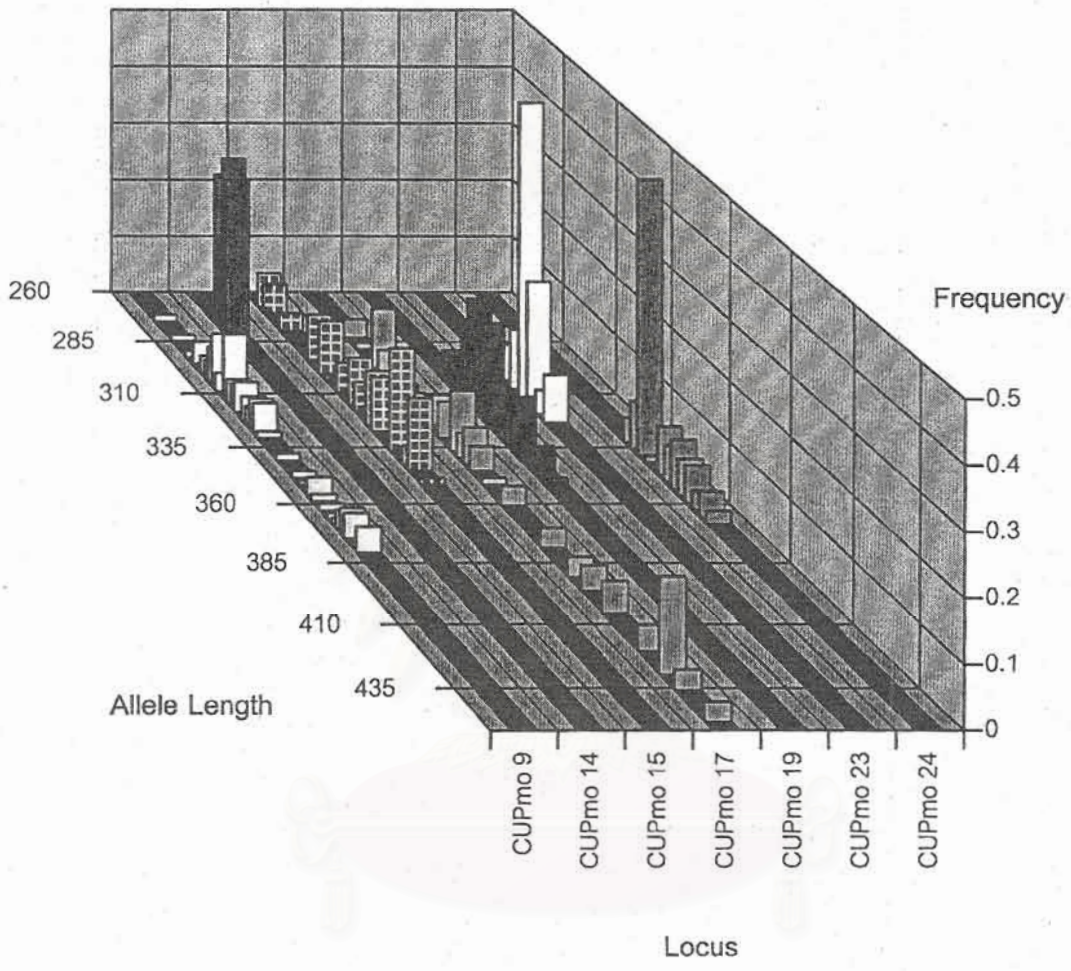
CUPmo 23

รูปที่ 2. (ต่อ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

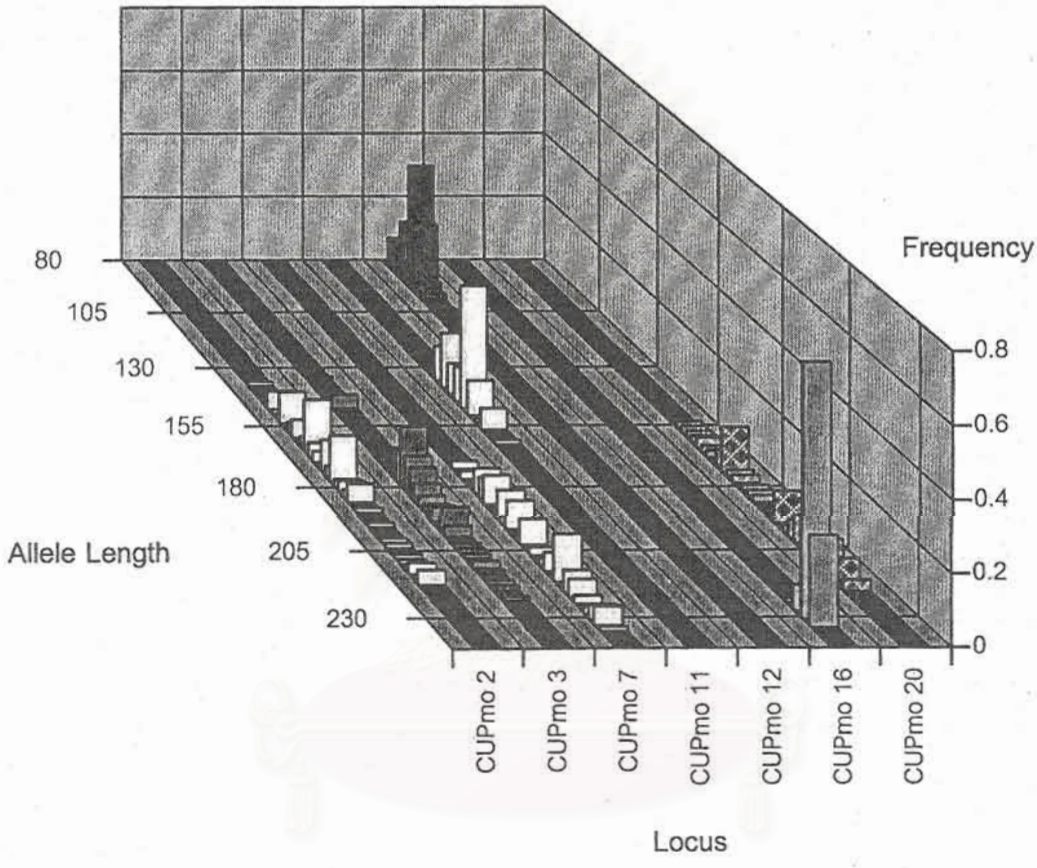


รูปที่ 3. การกระจายความถี่อัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมซึ่งได้จากการตรวจยีโนไทป์ของกุ้งกุลาดำจากอ่าวไทย



รูปที่ 3. (ต่อ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


Frequency
0.8
0.6
0.4
0.2
0
80
105
130
155
180
205
230
Allele Length
CUPmo 2
CUPmo 3
CUPmo 7
CUPmo 11
CUPmo 12
CUPmo 16
CUPmo 20
Locus

รูปที่ 3. (ต่อ)

6.4 การพัฒนาวิธีการตรวจเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์แบบมัลติเพลกซ์พีซีอาร์

มัลติเพลกซ์พีซีอาร์เป็นการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกันหลายบริเวณ ทำให้การตรวจยีโนไทป์ของกุ้งจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ทำได้พร้อมกันหลายตำแหน่ง ช่วยให้การจำแนกลูกกุ้งหรือจำแนกครอบครัวที่อาจต้องใช้เครื่องหมายหลายตำแหน่งมาตรวจแยกทำได้รวดเร็วขึ้น เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่จะเลือกนำมาใช้ตรวจโดยวิธีมัลติเพลกซ์พีซีอาร์จะต้องเป็นโลกัสที่มีขนาดของอัลลีลต่างกัน เพื่อไม่ให้เกิดแถบดีเอ็นเอซ้อนกันในบริเวณเดียวกัน ซึ่งจะทำให้การอ่านอัลลีลผิดพลาดได้ จากขนาดของอัลลีลในตารางที่ 5 ได้ทดสอบการทำมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ทั้งแบบ 2 โลกัส (Duplex) และ 3 โลกัส (Triplex) พร้อมกัน ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 6

<u>มัลติเพลกซ์พีซีอาร์แบบ 2 โลกัส</u> : จากขนาดของอัลลีลในตารางที่ 5 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจแบบ duplex จะต้องไม่มีอัลลีลที่มีขนาดซ้อนกันอยู่ ซึ่งทำการทดสอบทั้งหมด 10 คู่ ได้แก่ คู่ของ CUPmo1 และ CUPmo2 ; CUPmo 4 และ CUPmo9 ; CUPmo 4 และ CUPmo 11; CUPmo6 และ CUPmo11 ; CUPmo 9 และ CUPmo 6; CUPmo 9 และ CUPmo 11; CUPmo 15 และ CUPmo 16; CUPmo 12 และ CUPmo 24; CUPmo 2 และ CUPmo 12; CUPmo 21 และ CUPmo 23

<u>มัลติเพลกซ์พีซีอาร์แบบ 3 โลกัส</u> :ไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบทำ Triplex PCR ได้แก่ ไพร-เมอร์ CUPmo4, CUPmo9 และ CUPmo 11

ปรับสภาวะสำหรับมัลติเพลกซ์พีซีอาร์โดยเพิ่ม dNTP จาก 200 µM เป็น 300 µM ต่อ 1 reaction และปรับความเข้มข้นของเกลือในปฏิกิริยาจาก 1.5 mM เป็น 2.5 mM ผลการทดสอบมัลติเพลกซ์พีซีอาร์แสดงในตารางที่ 6 พบว่าสามารถตรวจสอบได้ในคู่ duplex ของ CUPmo1+2, CUPmo4+11 (รูปที่ 4 และ 5) CUPmo 15+CUPmo 16; CUPmo 12+CUPmo 24; CUPmo 2+CUPmo 12; CUPmo 21+CUPmo 23 ส่วนคู่ duplex อื่นๆ ไม่พบผลผลิตพีซีอาร์

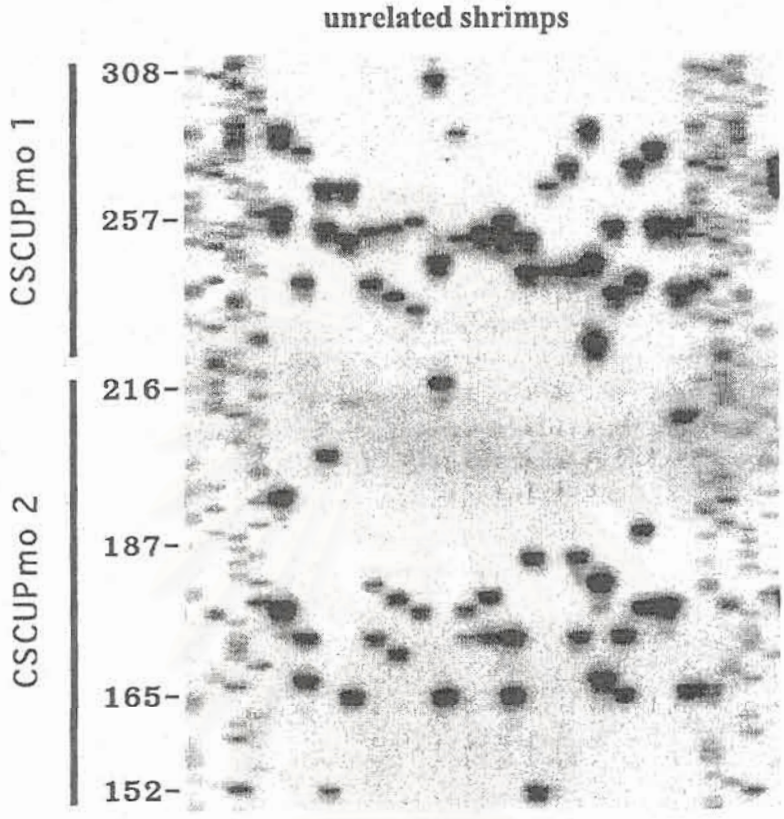
สำหรับ Triplex PCR ของ CUPmo4+9+11 นั้นไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์แม้ว่าจะได้พยายามปรับสภาวะต่างๆแล้ว เพื่อแก้ไขปัญหาจึงได้ลองเปลี่ยนการทำมัลติเพลกซ์พีซีอาร์เป็นการทำ single loading ของผลผลิตพีซีอาร์ของแต่ละโลกัสแทนโดยจะแยกทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มา load พร้อมกันบนอะคริลาไมด์เจล โลกัสที่นำมาทำ single loading สำหรับ 3 โลกัส คือ (CUPmo4+9+11) (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

6.5 การตรวจสอบยีโนไทป์ด้วยสารละลายซิลเวอร์

จากผลการตรวจสอบด้วยสารละลายซิลเวอร์ (รูปที่ 6) พบว่าให้รูปแบบของยีโนไทป์เหมือนกับการตรวจสอบด้วยสารรังสี ดังนั้นสารละลายซิลเวอร์สามารถนำไปใช้แทนสารรังสีได้ แต่ไมโครแซทเทลไลต์บางตำแหน่งที่มี stutter bands เมื่อใช้สารละลายซิลเวอร์ตรวจสอบยีโนไทป์จะมี backgrund สูง

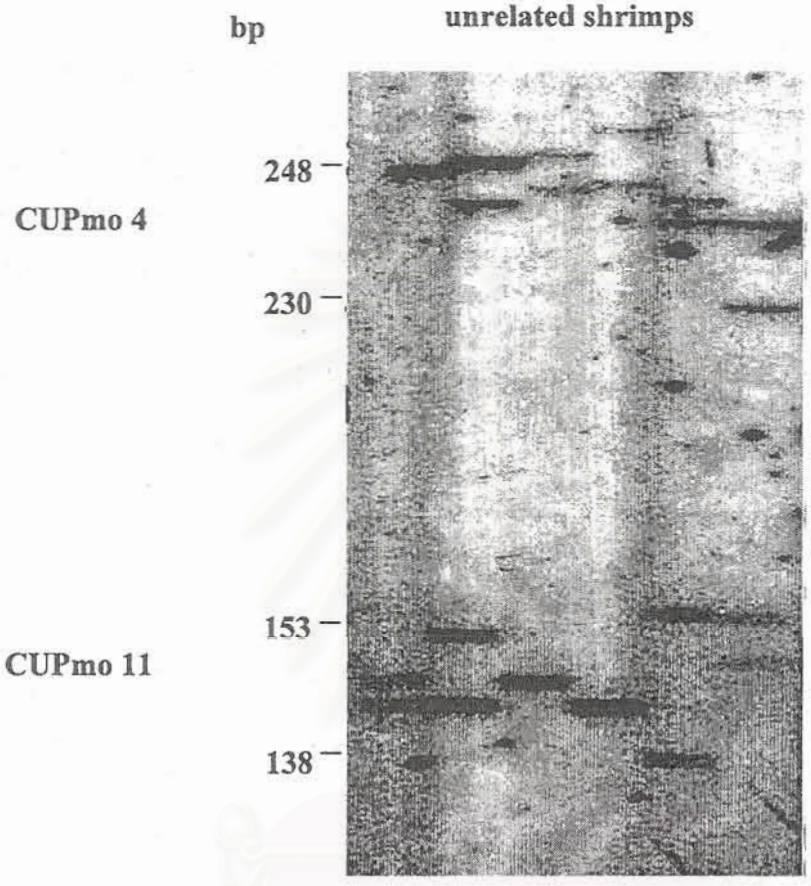
ตารางที่ 6. การทำมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์โลกัสต่างๆ และผลของพีซีอาร์

ชนิดของมัลติเพลกซ์	โลกัสที่ตรวจ	ขนาดของอัลลีล (bp)	ผลของพีซีอาร์
Duplex	CUPmo1 CUPmo2	224-326 147-217	ได้ผลดี
Duplex	CUPmo4 CUPmo11	206-256 129-162	ได้ผลดี
Duplex	CUPmo6 CUPmo11	166-242 129-162	มี non-specific product และอ่านผลได้ยาก
Duplex	CUPmo9 CUPmo4	274-380 206-256	ไม่ได้ผลผลิตพีซีอาร์
Duplex	CUPmo9 CUPmo6	274-380 128-242	ไม่ได้ผลผลิตพีซีอาร์
Duplex	CUPmo9 CUPmo11	274-380 132-162	ไม่ได้ผลผลิตพีซีอาร์
Duplex	CUPmo15 CUPmo16	267-351 224-233	ได้ผลดี
Duplex	CUPmo22 CUPmo24	184-258 332-368	ได้ผลดี
Duplex	CUPmo2 CUPmo12	147-217 83-105	ได้ผลดี
Duplex	CUPmo21 CUPmo23	230-239 299-323	ได้ผลดี
Triplex	CUPmo4 CUPmo9 CUPmo11	206-256 274-380 129-162	เกิด non-specific product ขนาดเล็ก (< 100 bp)

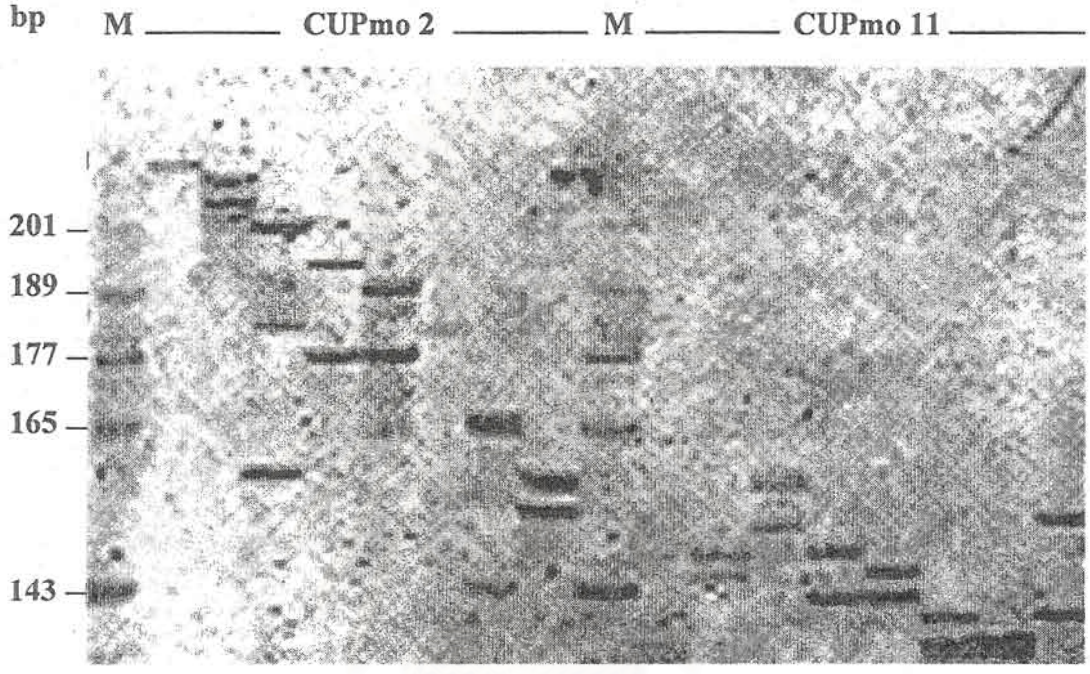


รูปที่ 4. รูปแบบของ microsatellite alleles จากการทำ duplex PCR ของ CUPmo1+2 ขนาดของอัลลีลเทียบกับ sequencing ladder ของ M13mp18 (A,C,G,T)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5. รูปแบบของ microsatellite alleles จากการทำ duplex PCR ของ CUPmo4+11



รูปที่ 6. รูปแบบของ microsatellite alleles จากการตรวจสอบยีโนไทป์ด้วยสารละลายซิลเวอร์ ของ CUPmo 2 และ CUPmo11 ขนาดของอัลลีลเทียบกับ allelic ladders (M)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.6 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

6.6.1 การตรวจความแตกต่างและโครงสร้างทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำในประเทศไทย

การตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมในตัวอย่างกุ้งของประเทศไทยแยกกลุ่มตัวอย่างเป็น 5 กลุ่มโดย 3 กลุ่มเป็นตัวอย่างกุ้งจากอันดามันคือ สตูล ตรัง และ พังงา อีก 2 กลุ่มมาจาก ฝั่งอ่าวไทย คือตราด และ ชุมพร โดยตรวจความผันแปรที่ไมโครแซทเทลไลต์ทั้งหมด 5 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง CUPmo1, CUPmo2, CUPmo 18, Di 25, และ Di 27 พบว่ากุ้งกลุ่มต่างๆ มีจำนวนอัลลีลและการกระจายของอัลลีลแตกต่างกัน โดยจำนวนอัลลีลที่พบจากการตรวจไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 5 ตำแหน่งมีค่าตั้งแต่ 19 ถึง 30 อัลลีล และมีค่า heterozygosity อยู่ในช่วง 0.49-0.83 (ตารางที่7) และโดยรวมจะพบว่ากุ้งอ่าวไทย (ชุมพรและตราด) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่ากุ้งจากอันดามัน (สตูล ตรัง พังงา)

เนื่องจากไมโครแซทเทลไลต์มีความผันแปรสูงและมีบางอัลลีลที่พบน้อยหรือพบเพียงครั้งเดียว ดังนั้นค่าที่จะบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี คือค่าจำนวนอัลลีลที่มีผล (effective number of allele, n_e) ที่คำนวณจากสูตร $n_e = 1/\Sigma P^2$ เมื่อ P = ค่าความถี่ของอัลลีล จากค่า n_e พบว่ากุ้งชุมพรมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงสุด ($n_e = 20.4$) และกุ้งสตูลมีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด ($n_e = 13.1$) (ตารางที่ 8)

จากค่าความถี่ของอัลลีลเมื่อนำมาคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (genetic distance = d) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกุ้งแต่ละกลุ่ม พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย โดยความแตกต่างมากที่สุดระหว่างกุ้งตราดและสตูล (d = 0.30) น้อยที่สุดระหว่างกุ้งสตูลและตรัง (d = 0.024) นำไปจัดทำโครงสร้างความสัมพันธ์ของประชากร โดย Neighbor joining tree (รูปที่ 7) และวิเคราะห์ Heterogeneity analysis จากความถี่ของอัลลีลที่พบในกลุ่มตัวอย่าง (ตารางที่ 9) พบว่าไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากรกุ้งจากอันดามัน ($P>.002$) แต่พบความแตกต่างภายในประชากรจากอ่าวไทยคือกุ้งชุมพรและตราด โดยพบความแตกต่างที่โลกัส CUPmo18 และ Di25 ($P<.001$) และระหว่างกลุ่มประชากรจากอันดามันและอ่าวไทย พบความแตกต่างระหว่างประชากรของอันดามันกับตราด ($P<.001$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างประชากรของอันดามันกับชุมพร ($P>.05$)

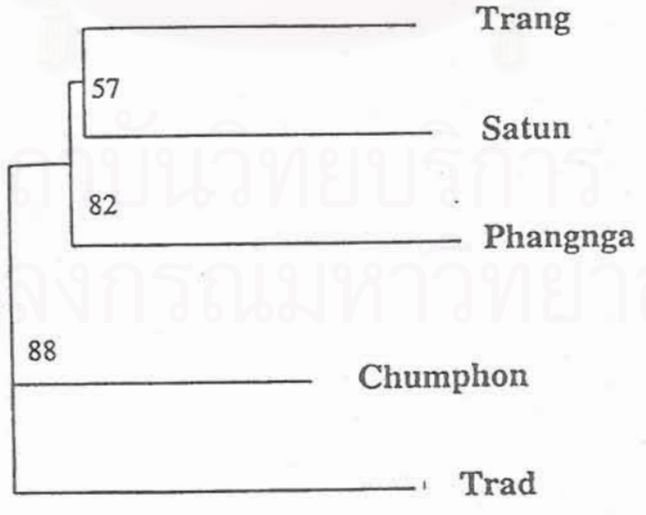
การประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของความแตกต่าง (F_{ST}) ระหว่างกลุ่มประชากรให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยพบว่ากุ้งจากอันดามันมีความแตกต่างจากกุ้งตราด ($P<.001$) แต่ไม่ต่างจากกุ้งชุมพร (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 7. ค่าความแตกต่างผันแปรของไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 5 โลคัสที่พบในประชากรกุ้งกุลาดำของไทย

ตัวอย่าง โลคัส	สตูล	ตรัง	พังงา	ชุมพร	ตราด
CUPmo18					
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
Di25					
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

ตารางที่ 8. ความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรกุ้งที่ตรวจด้วยไมโครแซทเทลไลต์ 5 โลกัส

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีล	จำนวนอัลลีลที่มีผล	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



รูปที่ 7. Neighbor joining tree แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ของประชากรกุ้งทั้ง 5 แหล่งของประเทศไทย

ตารางที่ 9. 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	0.280 ns

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10. การประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของความแตกต่าง (F_{ST}) ระหว่างกลุ่มประชากรจากไมโครแซเทลไลต์ 5 โลกัส

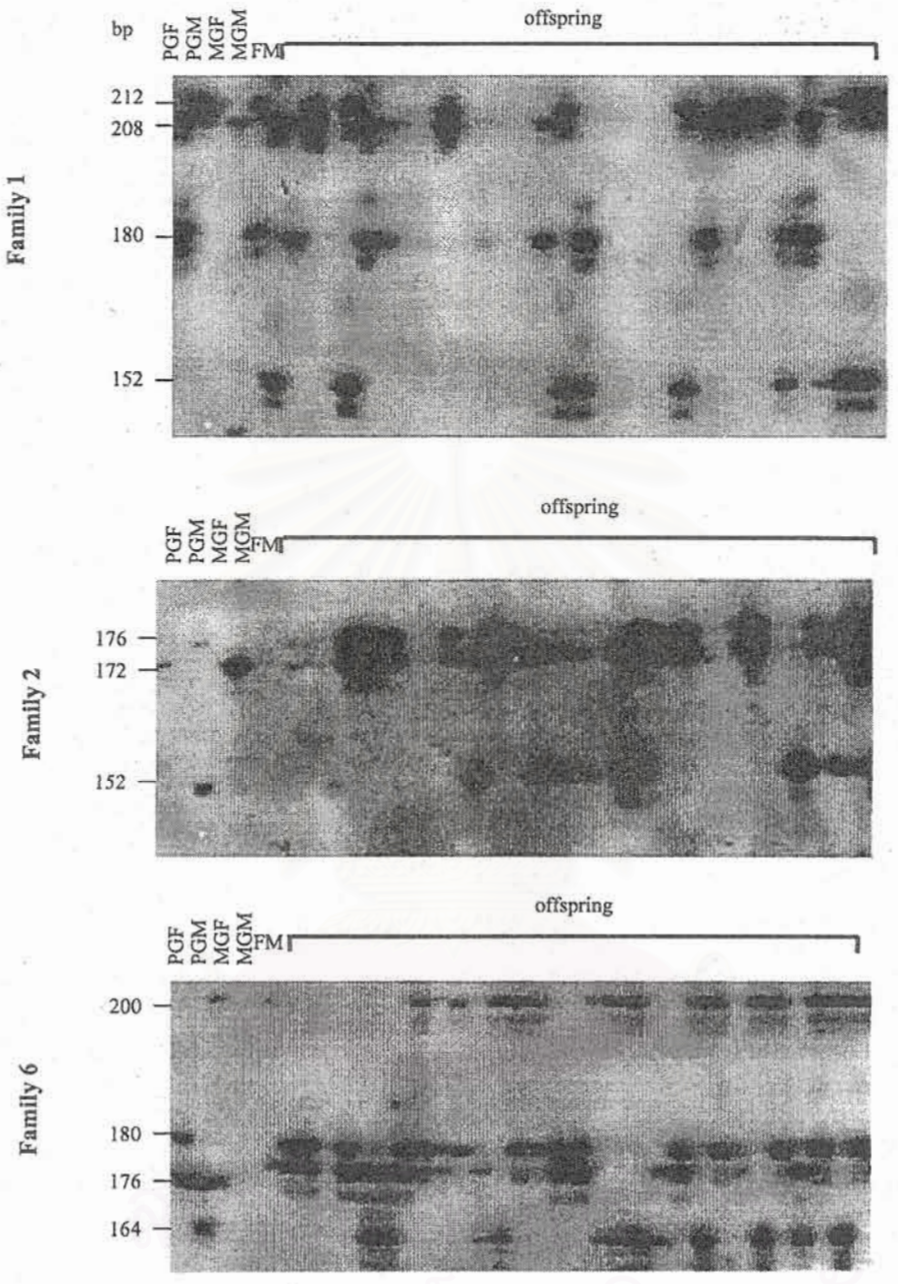
	สตูล	ตรัง	พังงา	ชุมพร	ตราด
สตูล	-				
ตรัง	0.0012^{ns}	-			
พังงา	0.0011^{ns}	0.0012^{ns}	-		
ชุมพร	0.0044^{ns}	0.0043^{ns}	0.0039^{ns}	-	
ตราด	0.0124^{*}	0.0102^{ns}	0.0089^{ns}	0.0118^{*}	
อันดามัน- ชุมพร			0.0035^{ns}		
อันดามัน - ตราด			0.0101		-

ns = ไม่มีนัยสำคัญ, *มีนัยสำคัญที่ระดับความน่าจะเป็นที่ปรับสำหรับการทดสอบหลายครั้งโดยวิธี Sequential Bonferroni

6.6.2 การทำแผนที่จีโนม

ทำการตรวจยีโนไทป์ของ Reference families ด้วย microsatellite markers CUPmo 1, 2, 9 และ 11 (รูปที่ 8) (ภาคผนวก) ผลของยีโนไทป์ที่ได้นำไปสร้าง International Shrimp Map ของกุ้งกุลาดำต่อไป สามารถติดตามข้อมูลได้จาก http://www/shrimpmap.tag.csiro.au

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8. การตรวจยีโนไทป์ที่ตำแหน่ง CUPmo2 จากตัวอย่างกุ้งที่เป็น Reference families (Family 1, 2 และ 6) เพื่อทำแผนที่จีโนม

PGF, PGM = Paternal grandfather and grandmother

MGF, MGM = Maternal grandfather and grandmother

F = Father, M = Mother

7. วิจารณ์ผลการทดลอง

เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีคุณสมบัติดีกว่าเครื่องหมายพันธุกรรมอื่นๆ เนื่องจากจากมีอัตราการเกิดมิวเตชั่นในบริเวณที่เป็นไมโครแซเทลไลต์สูง (10^{-6}-10^{-2} ครั้ง ต่อรุ่น) จึงทำให้มีความหลากหลายของอัลลีลมาก (15, 36) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ไมโครแซเทลไลต์ มีประโยชน์ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับของสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกันได้ (37,38) สามารถใช้คัดเลือกหาพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ลูกที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (31) ไมโครแซเทลไลต์อัลลีลยังมีการถ่ายทอดไปสู่ลูกเป็นไปตามกฎเมนเดล ดังนั้นในโปรแกรมการคัดพันธุ์เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดนี้จึงสามารถใช้ติดตามพ่อ แม่ ลูก เพื่อแยกกลุ่มลูกกุ้งจากหลายครอบครัวที่เลี้ยงรวมในบ่อเดียวกันได้ ซึ่งแตกต่างจากไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากแม่เท่านั้น

ผลการแยกและวิเคราะห์ไมโครแซเทลไลต์ในจีโนมของกุ้งกุลาดำ สามารถแยกไมโครแซเทลไลต์ได้ถึง 335 ตำแหน่ง เมื่อจำแนกลักษณะไมโครแซเทลไลต์ที่แยกได้ (เฉลี่ยจากห้องสมุดยีนแบบ convention และ enrichment) ตาม Weber, 1990 (35) พบไมโครแซเทลไลต์แบบ Perfect repeats มากที่สุด 55.2% รองลงมาคือ Imperfect repeats 28.1% ส่วน Compound repeats พบน้อยที่สุด 16.7% Alcivar-Warren และคณะ, 1999 (39) แยกไมโครแซเทลไลต์จากจีโนมของกุ้งกุลาดำโดยวิธี random sequencing พบ Perfect repeats มากที่สุดเช่นกันคือ 75% ส่วน Imperfect และ Compound repeats พบเพียง 6 และ 3% ตามลำดับ ในการแยกหาไมโครแซเทลไลต์ พวกที่เป็น dinucleotide repeats แม้จะพบมากที่สุดแต่เบสซ้ำชนิดนี้ในกุ้งกุลาดำพบว่ามีความยาวมาก (21, 22) และการแยกความแตกต่างของอัลลีลที่ต่างกันเพียง 2 คู่เบสค่อนข้างยาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะเน้นการแยกหาไมโครแซเทลไลต์ชนิด tri- และ tetranucleotide repeats โดยเลือกใช้ Oligonucleotide probe 9 ตัวคือ $(GAA)_8$, $(GATA)_6$, $(CAT)_8$, $(ATG)_8$, $(GGAT)_6$, $(GGAA)_5$, $(CACC)_5$, $(CATA)_6$ และ $(TCAG)_5$ พบว่าลักษณะเบสซ้ำที่พบมากคือ $(GAA)_n$, $(GATA)_n$, $(CAT)_n$ และ $(ATG)_n$ ส่วนเบสซ้ำแบบอื่นพบน้อยมากหรือไม่พบเลย ดังนั้นเมื่อทำ enrichment libraries จึงเลือกทำ enrichment ไมโครแซเทลไลต์ $(GAA)_n$ และ $(GATA)_n$ ซึ่งพบประมาณ 0.45 และ 0.69% ตามลำดับ (เฉลี่ยจากห้องสมุดยีนแบบ convention) จำนวนซ้ำของไมโครแซเทลไลต์ที่แยกได้ หากเป็น tri- และ tetranucleotide repeats จะมีขนาดไม่ยาวนัก (อยู่ในช่วง 4-50 ซ้ำ) หากเป็นเบสซ้ำแบบ dinucleotide repeats อาจพบยาว > 90 ซ้ำ (21)

จากไมโครแซเทลไลต์ 335 ตำแหน่ง นำมาออกแบบไพรเมอร์พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมได้เพียง 26 ตำแหน่ง โดยปัญหาส่วนใหญ่มาจากปลายข้างหนึ่งของไมโครแซเทลไลต์อยู่ติดส่วน cloning site และไมโครแซเทลไลต์มีขนาดยาวมาก Moore และคณะ (22) รายงานว่าในการแยกไมโครแซเทลไลต์จากจีโนมของกุ้ง *Penaeus japonicus* พบไมโครแซเทลไลต์ส่วนมากยาวถึง 300

คู่เบส ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการออกแบบไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณนี้ ทำให้ได้เครื่องหมายพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์จำนวนน้อย เครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 26 ตำแหน่งมีความหลากหลายแตกต่างกัน โดยมีเครื่องหมาย 4 ตำแหน่งที่เป็น monomorphic markers คือ CUPmo 5, CUPmo 26, CUPmo 27 และ CUPmo 29 ส่วนเครื่องหมาย CUPmo 28 พบจำนวนอัลลีลเพียง 2 อัลลีลขนาด 142 และ 145 คู่เบส ในทุกๆตัวอย่างที่ตรวจสอบ นอกนั้นเป็น polymorphic markers โดยแบ่งเป็นพวกที่มีความหลากหลายสูง คือ CUPmo 1-4, 6, 7, 9, 17, 20 และ 22 คือมีจำนวนอัลลีลสูงกว่า 21 อัลลีล ส่วน CUPmo11-13, 15, 19 และ 23-25 มีความหลากหลายในระดับปานกลาง มีจำนวนอัลลีลอยู่ในช่วง 7-16 อัลลีล และ CUPmo14, 16 และ 21 มีความหลากหลายในระดับต่ำโดยมีจำนวนอัลลีลเพียง 4 อัลลีล เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่มีความหลากหลายแตกต่างกันสามารถนำไปใช้ได้แตกต่างกัน ซึ่งเป็นข้อดีของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้เพราะสามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับการศึกษา (8,15) เช่นพวกที่มีความหลากหลายต่ำหรือพวกที่ไม่มีความหลากหลายอาจนำไปใช้ในการจำแนกสปีชีส์ ส่วนพวกที่มีความหลากหลายปานกลางจะใช้ศึกษาความแตกต่างและโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร ส่วนพวกที่มีความหลากหลายสูงเหมาะที่จะใช้จำแนกครอบครัวในโปรแกรมคัดพันธุ์ (36)

นอกจากนี้เราได้พัฒนาวิธีการตรวจไมโครแซทเทลไลต์ให้ง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้น สามารถนำมาใช้ตรวจตัวอย่างจำนวนมากในภาคสนามได้ โดยการปรับปรุงทั้งในส่วนของการสกัดดีเอ็นเอจากกุ้งรวมทั้งการพัฒนาวิธีมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ เพื่อให้สามารถตรวจความแตกต่างของไมโครแซทเทลไลต์ได้พร้อมกันหลายโลกัส ซึ่งการตรวจวิธีมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ให้ความสะดวก รวดเร็วในการจำแนกครอบครัว ในการพัฒนาวิธีมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ได้เลือกตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์ที่ทดสอบให้มีขนาดของอัลลีลไม่เหลื่อมล้ำกัน เพื่อไม่ให้เกิดความสับสนในการแปลผล และทำการเพิ่มปริมาณปัจจัยต่างๆ เช่น สับสเตรท ไพรเมอร์ และ เอนไซม์ เพื่อให้เพียงพอที่จะใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ การทำมัลติเพลกซ์พีซีอาร์จะช่วยให้สามารถตรวจยีโนไทป์พร้อมๆกันทีละหลายตำแหน่ง ช่วยลดปริมาณงานที่ทำและสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามพบว่าการทำมัลติเพลกซ์พีซีอาร์จะให้ผลผลิตพีซีอาร์ลดลงกว่าเมื่อทำพีซีอาร์ทีละตำแหน่งและมีความยุ่งยากในการปรับสภาวะต่างๆเพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกันทีละหลายตำแหน่งและให้ได้ปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ใกล้เคียงกัน (31, 40, 41)

ไมโครแซทเทลไลต์ที่แยกได้นำมาศึกษาความแตกต่างและโครงสร้างทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำจากแหล่งต่างๆในธรรมชาติ ซึ่งมีประโยชน์ต่อการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำ เพราะจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดการพันธุกรรมที่เหมาะสม ประชากรของสัตว์น้ำมักมีการแบ่งแยกพันธุกรรมที่แตกต่างกันไปตามพื้นที่และแหล่งที่อยู่อาศัย โดยจะมีการปรับพันธุกรรมให้เข้ากับสภาพในพื้นที่และนำไปสู่ลักษณะเฉพาะที่เหมาะสมในการดำรงชีพในพื้นที่แตกต่างกัน (8) การปะปนกันของประชากรที่มีพันธุกรรมต่างกัน เช่นการเคลื่อนย้ายพ่อแม่พันธุ์จากแหล่งที่นิยมไป

เลี้ยงตามพื้นที่ต่างๆ ก่อให้เกิดการผสมผสานทางพันธุกรรมซึ่งอาจทำลายลักษณะที่มีประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงที่ธรรมชาติได้คัดเลือกไว้

จากผลของการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำในประเทศไทยทั้ง 5 กลุ่มที่ศึกษาโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ พบว่ากุ้งของประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ชัดเจนระหว่างกุ้งอันดามันและอ่าวไทย (ตราด) นอกจากนี้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สามารถแยกความแตกต่างภายในกุ้งจากอ่าวไทย คือกุ้งชุมพรและกุ้งตราด แต่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากรกุ้งจากอันดามัน ซึ่งความแตกต่างภายในประชากรของชุมพรกับตราด น่าจะเกิดจากการที่เกษตรกรนำแม่พันธุ์กุ้งหรือลูกกุ้งจากอันดามันไปเลี้ยงในบริเวณจังหวัดชุมพร เนื่องจากเชื่อกันว่ากุ้งจากอันดามันให้ผลผลิตที่ดีกว่า ทำให้กุ้งชุมพรมีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับกุ้งอันดามันมากกว่ากุ้งตราดที่อยู่ในฝั่งทะเลเดียวกัน ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น คืออาร์เอพีดีและไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอให้ผลที่สอดคล้องว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกุ้งอ่าวไทยและอันดามัน แต่ไม่สามารถบอกความแตกต่างภายในประชากรอ่าวไทย (14, 42) ความแตกต่างและโครงสร้างทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำในประเทศไทยที่พบในการศึกษานี้มีประโยชน์ต่อนโยบายการประมงของไทย การเพิ่มความระมัดระวังไม่ให้มีการเคลื่อนย้ายแม่พันธุ์หรือลูกกุ้งจากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่ง ตลอดจนการวางแผนการที่เหมาะสมในการปล่อยลูกพันธุ์กุ้งคืนสู่ธรรมชาติ เพื่อไม่ให้มีการปนเปื้อนระหว่างประชากรที่มีพันธุกรรมแตกต่างกัน รวมทั้งความพยายามที่จะพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำของไทย จะต้องมีการทดสอบให้ชัดเจนว่าพันธุ์ที่มีอยู่นั้นพันธุ์ใดสามารถให้ผลผลิตที่ดีกว่า เมื่ออยู่ในสภาวะการเลี้ยงในบ่อเพาะเลี้ยง แทนความเชื่อที่มีมาตลอดว่ากุ้งอันดามันมีพันธุกรรมที่ดีกว่า ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายประชากรกุ้งอย่างแพร่หลายทั้งในและระหว่างประเทศ ซึ่งเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาได้ในการวิจัยครั้งนี้จะเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการทดสอบพันธุกรรมต่อไป รวมทั้งการนำไปสร้างแผนที่จีโนมเพื่อศึกษายีนในกุ้งกุลาดำต่อไป (22)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. หนังสืออ้างอิง

1. World Shrimp Farming (2000).
2. 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 Biotachnology 5th Asian Fisheries Forum, Chiengmai Thailand. 11-14 November 1998. pp. 73-77.
3. เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ อัญชลี ทัศนาขจร ศิราวุธ กลิ่นบุหงา และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต Domestication และ Genetic Improvement หมายถึงอะไรและมีความสำคัญอย่างไรต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของประเทศไทย ในหนังสือของการสัมมนาวิชาการ "เทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง" จัดโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ 13 ธันวาคม 2540. หน้า 28 ถึง 34
4. Avise, J.C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution.* London : Chapman and Hall.
5. Hoelzel, A.R. (1998). *Molecular Genetic Analysis of Populations*, 2nd ed., Oxford, Oxford University Press.
6. Shaw, C.R., and Prasad, R. (1970). Starch gel electrophoresis of enzymes-a complication of recipes. *Biochem Genet.* 4: 297-320.
7. Richardson, B. J., Baverstock, P.R., and Adams, M. (1986). Allozyme Electrophoresis : a Handbook for Animal Systemics and Population Studies, Sydney : Academic Press.
8. 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.
9. Sodsuk, S. (1996). *Genetic population structure of Penaeus monodon Fabricius using allozyme and mitochondrial DNA analysis*. Ph.D. thesis. University of Stirling, Scotland.
10. 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.
11. Benzie, J.A.H. (2000). Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquac Res.* **31**: 95-119.
12. Williams, J.G.K., Kubilik, A.R., Livak, K.L., Rafaski, J.A., and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.

13. 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 MarBiol Biotech.* **6**: 110-115.

14. Tassanakajon, A. , Pongsomboon, S., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., and Boonsaeng, V. (1998). Genetic structure in wild populations of the black tiger prawn, *Penaeus monodon* using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Mar Biotechnol.* **6**: 249-254.

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

16. Ovenden, J.R. (1990). Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Aust J Mar Freshwater Res.* **41**: 835-853.

17. Weber, J.L., and May, P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.* **44**: 388-396.

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

19. Herbinger, C.M., Doyle, R.W., Taggart, C.T., Lochmann, S., Brooker, A., Wright, J.M., and Cook, D. (1997). Family relationships and effective population size in a natural cohort of cod larvae. *Can J Fish Aquat Sci.* **54**(suppl 1): 11-18.

20. Ferguson, A. (1995). The role of molecular genetic markers in the management of cultured fishes. In G.R. Carvalho and T. J. Pitcher (eds.), *Molecular genetics in fisheries*, pp. 81-95. London: T.J. Press (Padstow) Ltd.

21. 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.

22. Moore, S.S., Whan, V., Davis, G., Byrne, K., Hetzel, D.J.S., and Preston, N. (1999). The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* and their use in parentage determination and likage mapping. *Aquaculture.* **173**: 19-32.

23. Garcia, D.K., Dhar, A.K., and Alcivar-Warren, A. (1996). Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Mol Mar Biol Biotechnol.* **5**: 71-83.

24. Davis, L.G., Dibner, M.D., and Battey, J.F. (1986). Preparation of genomic DNA. *Basic method in molecular biology*, pp. 42-43. New York : Elsevier Science Publishing Company.

25. Rudbeck, L., and Dissing, J. (1998). Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *Biotechniques*. **25**: 588-592.

26. Shepard, A.R., and Rae, J.L. (1997). Magnetic bead capture of cDNAs from double-stranded plasmid cDNA libraries. *Nucleic Acids Res*. **25**: 3183-3185.

27. Park, Y., and Kohel, R.J. (1994). Enrichment of microsatellites from citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques*. **16**: 656-662.

28. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Habor Laboratory.

29. Sanger, F., Nicklen, S., and Caulson, A.K. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. USA. **74**: 5463-5467.

30. Senior, M.L., Murphy, J.P., Goodman, M.M., and Stuber, C. W. (1998). Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Sci*. **38**: 1088-1098.

31. Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., and Vogt, P.H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. **23**: 504-511.

32. Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., and Gresshoff, P.M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. **196**: 80-83.

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

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

35. Weber, J.L. (1990). Informativeness of human $(dC\text{-}dA)_n$ $(dG\text{-}dT)_n$ polymorphisms. *Genomics*. 7: 524-530.

36. O'Reilly, P., and Wright, J.M. (1995). The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *Journal of Fish Biology*. **47**: 29-55.

37. McConnell, S.K., O'Reilly, P., Hamilton, L., Wright, J., and Bentzen, P. (1995). Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo sola)*: genetic differentiation of north American and European populations. *Can J Fish Aquat Sci*. **52**:1863-1872.

38. Stoner, D.S., Quattro, J.M., and Weissman, I. (1997). Highly polymorphic microsatellite loci in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Mol Mar Biol Biotechnol.* **6**: 163-171.

39. Xu, Z., Dhar, A.K., Wyrzykowski, J., and Alcivar-Warren, A. (1999). Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. *Animal genetics*. **30**: 150-156.

40. Lins, A.M., Sprecher, C.J., Puers, C., and Schumm, J.W. (1996). Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci-silver stain and fluorescence detection. *Biotechnique*. **20**:882-889.

41. Rithidech, K.N., Dunn, J.J., and Gordon, C.R. (1997). Combining multiplex and touchdown PCR to screen murine microsatellite polymorphisms. *Biotechnique*. **23**:36-44.

42. Klinbunga, S., Penman, D.J., McAndrew, B.J., and Tassanakajon, A. (1999). Mitochondrial DNA diversity in three populations of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mar Biotechnol*. **1**:113-121.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. Research Output

1. Publication ในวารสาร

ก. ระดับนานาชาติ

(1) Pongsomboon, S., Whan, V., Moore, S., and **Tassanakajon, A.** (2000). Characterization of tri- and tetranucleotide microsatellite in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Sci Asia*. **26**: 1-8.

(2) Supangul, P., Sootanan, P., Klinbunga, S., Kamonrat, W., Jarayabhand, P., and **Tassanakajon, A.** (2000). Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp *(Penaeus monodon)* in Thailand. *Mar Biotechnol.* **2**:339-347.

(3) **Tassanakajon, A.,** Supungul, P., Klinbunga, S., Jarayabhand, P., and Boonsaeng, V. Microsatellite variation in wild populations of the black tiger prawn, *Penaeus monodon* in Thailand. In : Larkin, P.J. (ed). *Agricultural Biotechnology : Laboratory, Field and Market.* Proceeding of the 4th Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology, Darwin 13-16 July 1998. Canberra, UTC Publishing. pp. 255-257.

ข. ในประเทศ

(1) อัญชลี ทัศนาขจร "การใช้ PCR ในการคัดสายพันธุ์กุ้งกุลาดำ" ในหนังสือของในการสัมมนาวิชาการเชิงปฏิบัติการเรื่อง "เทคนิค PCR กับการเพาะเลี้ยงกุ้ง" จัดโดยบริษัทวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้ง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล 21 มกราคม 2541 หน้า 4/1 ถึง 4/6

(2) อัญชลี ทัศนาขจร, เปรมฤทัย สุพรรณกูล, เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์, ศิราวุธ กลิ่นบุหงา และวิชัย บุญแสง "The application of Microsatellite Markers in Shrimp Breeding Program" ในหนังสือของการสัมมนาวิชาการ "เทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง" จัดโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ 13 ธันวาคม 2540. หน้า 28 ถึง 34

(3) สิริพร พงษ์สมบูรณ์, อัญชลี ทัศนาขจร, เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์, ศิราวุธ กลิ่นบุหงา และวิชัย บุญแสง "การตรวจหาความผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ" ในหนังสือของการสัมมนาวิชาการ

"เทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง" จัดโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ. 13
ธันวาคม 2540. หน้า 35 ถึง 43.

2. การตีพิมพ์เป็นหนังสือ

---

3. การจดทะเบียนสิทธิบัตร (โปรดระบุทั้งสิทธิบัตรที่จดทะเบียนแล้ว และกำลังดำเนินการจดทะเบียน)

ชื่อสิทธิบัตร .....

หมายเลขสิทธิบัตร .....

จดทะเบียนที่ .....

ประเทศที่จดสิทธิบัตร .....

4. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

(1) Tiptawonnukul, A., Rimphanitchayakit, V., Cook, D., Jarayabhand, P., Boonsaeng, V., and Tassanakajon, A. Microsatellite sequences in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*). Sixth International Symposium on Genetic in Aquaculture, June 1997, Stirling, Scotland.

(2) Tassanakajon, A., Tiptawonnukul, A., Rimphanitchayakit, V., Jarayabhand, P., and Boonsaeng, V. Development and use of microsatellite markers in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*). 2nd Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference and 3rd Asia-Pacific Conference on Agal Biotechnology. May, 1997 Phuket, Thailand

(3) Pongsomboon, S., Whan, V., Moore, S.S., and Tassanakajon, A. Isolation and characterization of tri- and tetranucleotide repeats in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. Book of Abstract. World Aquaculture'99, 26 April-2 May 1999. Sydney, Australia. pp. 606.

(4) Wilson, K.J., Moore, S.S., Lehnert, S.A., Whan, V., Ballment, B., Benzie, J.A.H., Rothlisberg, P., Chu, K.H., Sobral, B.W.S., Bierne, N., Pongsomboon, S., and Tassanakajon, A. A genetic linkage map of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. : An international collaboration coordinated by AIMS and CSIRO, Australia. Book of Abstract. World Aquaculture'99, 26 April-2 May 1999. Sydney, Australia. pp. 815.

(5) พิทักษ์ สูตรอนันต์, **อัญชลี ทัศนาขจร**, ศิราวุธ กลิ่นบุหงา. การจำแนกพันธุกรรมในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius โดยเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 25 กำหนดการและบทคัดย่อ โรงแรมอมรินทร์ลากูน พิษณุโลก 2542 : 692-693.

(6) **Tassanakajon, A.** Development of DNA markers and genetic studies of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Felix Hotel, Kanchanaburi 2000.

5. ผลงานอื่นๆ

(1) จากผลงานวิจัยในโครงการวิจัยนี้ ทำให้หัวหน้าโครงการ รศ. ดร. อัญชลี ทัศนาขจร ได้รับรางวัล "ทะกุจิ" นักวิจัยดีเด่น ประจำปี พ.ศ. 2543 จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. การนำไปใช้ประโยชน์

การประยุกต์ใช้ผลงานวิจัย (โปรดระบุ ผู้ใช้/หน่วยงาน, ช่วงเวลา, สถานที่ ที่นำผลงานไปใช้)

1. การนำไปใช้ประโยชน์

☐ เชิงพาณิชย์

- มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ โดยโครงการ

- มีการนำไปประยุกต์ใช้โดย ภาคธุรกิจ/บุคคลทั่ว

ร่วมมือกับศูนย์เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเครือเจริญโภคภัณฑ์ นำ microsatellite markers ที่พัฒนาได้ไปช่วยในการจำแนกครอบครัวกุ้งในการคัดพันธุ์กุ้งกุลาดำ เพื่อสร้างพ่อ-แม่พันธุ์จากบ่อเพาะเลี้ยง (Domestication)

☐ เชิงนโยบาย

- มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย

- เกิดมาตรการใหม่

☐ เชิงสาธารณะ

- มีเครือข่ายความร่วมมือเกิดขึ้น/เชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆ ทั้งในและต่างประเทศ

(1). ร่วมมือกับ รศ.ดร. เผดิมศักดิ์ จาระยะพันธุ์ ผู้อำนวยการสถาบันทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำวิธีการตรวจจำแนกพันธุกรรมที่พัฒนาได้ไปใช้เป็นเครื่องมือในการติดตามข้อมูลรายครอบครัว เพื่อประเมินค่าอัตราพันธุกรรม (อัตราการเจริญเติบโต) ของกุ้งในโปรแกรมคัดเลือกเพื่อการผสมพันธุ์กุ้งกุลาดำ

(2). ร่วมมือกับ Dr. Stephen Moore จาก CSIRO Molecular Animal Genetic Centre ประเทศออสเตรเลีย เพื่อนำไมโครแซทเทลไลต์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปใช้ในการทำแผนที่จีโนมของกุ้ง

- สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง

มีการให้สัมภาษณ์ลงนิตยสารสัตว์น้ำฉบับเดือนกุมภาพันธ์ 2541 เกี่ยวกับการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมตรวจพ่อแม่กุ้งในการคัดพันธุ์

☐ เชิงวิชาการ

- การพัฒนาการเรียนการสอน

นำผลงานวิจัยไปใช้ประกอบในการสอนวิชา 2310554 Genetic Engineering หัวข้อที่สอนคือ Molecular Markers

- สร้างนักวิจัยใหม่

(1) จำนวนนักศึกษาที่จบ

ก. ระดับปริญญาโท จำนวน 2 คน ขอให้ระบุหัวข้อวิทยานิพนธ์ และปีที่จบของแต่ละคน

1. เปรมฤทัย สุพรรณกูล. 2541. ความแปรผันทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของกุ้งกุลาดำในประเทศไทยโดยตัวตรวจสอบชนิดไมโครแซทเทลไลต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
2. พิทักษ์ สูตรอนันต์. 2542. การพัฒนาชุดจำแนกพันธุกรรมในกุ้งกุลาดำโดยเทคนิคไมโครแซเทลไลต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ข. ระดับปริญญาเอก จำนวน 1 คน ขอให้ระบุหัวข้อวิทยานิพนธ์ และปีที่จบของแต่ละคน

1. นส. สิริพร พงษ์สมบูรณ์ การแยกและวิเคราะห์ความแปรผันของไมโครแซเทลไลต์ชนิดไตรและเตตร้านิวคลีโอไทด์ในกุ้งกุลาดำ (คาดว่าจะจบในปีการศึกษา 2544)

(2) ผลการสร้างนักวิจัยในลักษณะอื่นๆ (ถ้ามี)

- ได้มีการจ้างนักวิจัย 1 คน เข้ามาช่วยในโครงการวิจัย คือ น.ส. สุรีรัตน์ แซ่ตั้ง โดยเข้ามารับผิดชอบในการตรวจสอบพ่อแม่พันธุ์ ก่อนทำการคัดเลือกผสมพันธุ์โดยใช้เทคนิคไมโครแซเทลไลต์ ซึ่ง น.ส. สุรีรัตน์ ได้เรียนรู้เทคนิคทางอณูชีววิทยาต่างๆ และมีพัฒนาการในงานวิจัยดีมาก ปัจจุบัน น.ส. สุรีรัตน์ เป็นนิสิตปริญญาโทปีที่ 2 ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับทุน TGIST
- นิสิตที่ทำงานวิจัยในโครงการนี้ที่จบไปแล้วได้เข้าทำงานเป็นอาจารย์ที่ ม.บูรพา 1 คน อีก 1 คน เรียนต่อในระดับปริญญาเอก โดยได้รับทุนกาญจนาภิเษก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. ภาคผนวก

ผลการตรวจยีโนไทป์ของ Reference families ในการทำแผนที่จีโนม ไพรเมอร์ CUPmo 1

A. Family 1

ขนาด allele (bp) : a = 278, b = 264, A =270, B = 238, C = 234									
ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์
K1	-	K11	BC	K21	BC	K31	AC	K41	BC
K2	BC	K12	-	K22	BC	K32	BC	K42	AC
K3	AC	K13	BC	K23	BC	K33	BC		ยีโนไทป์
K4	BC	K14	BC	K24	BC	K34	BC	ปู่	ac
K5	-	K15	BC	K25	BC	K35	BC	ย่า	bc
K6	AC	K16	AC	K26	-	K36	AC	ตา	-
K7	-	K17	-	K27	AC	K37	AC	ยาย	AC
K8	AC	K18	AC	K28	-	K38	BC	พ่อ	-
K9	AC	K19	BC	K29	AC	K39	BC	แม่	AB
K10	AC	K20	AC	K30	BC	K40	BC		

B. Family 2

ขนาด allele (bp) : a = 298, b = 268, A = 274, B =272, C = 246, D = 240									
ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์
K1	AD	K11	AD	K21	AB	K31	CD	K41	CD
K2	AD	K12	AB	K22	CD	K32	BC	K42	-
K3	BC	K13	CD	K23	AD	K33	-		ยีโนไทป์
K4	AB	K14	BC	K24	BC	K34	AD	ปู่	aB
K5	BC	K15	-	K25	AD	K35	AD	ย่า	BD
K6	AD	K16	CD	K26	AD	K36	AB	ตา	Ab
K7	CD	K17	CD	K27	CD	K37	-	ยาย	-
K8	BC	K18	CD	K28	-	K38	AB	พ่อ	BD
K9	AB	K19	BC	K29	AB	K39	BC	แม่	-
K10	BC	K20	BC	K30	CD	K40	AD		

C. Family 6

ขนาด allele (bp) : a = 234, A = 310, B =308, C = 262									
ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์
K1	BB	K11	AC	K21	BB	K31	AA	K41	BC
K2	AA	K12	AA	K22	AC	K32	AA	K42	BC
K3	-	K13	AC	K23	AC	K33	AA		ยีโนไทป์
K4	AA	K14	-	K24	-	K34	AA	ปู่	Aa
K5	AC	K15	-	K25	AC	K35	AA	ย่า	BC
K6	AA	K16	AC	K26	AC	K36	BB	ตา	-
K7	BB	K17	AC	K27	-	K37	BB	ยาย	-
K8	BB	K18	-	K28	AA	K38	AA	พ่อ	-
K9	AC	K19	AC	K29	BC	K39	AC	แม่	-
K10	AA	K20	BC	K30	BC	K40	-		

ไพรเมอร์ CUPmo 2

A. Family 1

ขนาด allele (bp) : a = 144, A = 212, B = 208, C = 180, D = 152									
ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์
K1	BC	K11	BC	K21	AD	K31	AB	K41	AD
K2	AB	K12	AB	K22	BC	K32	AB	K42	CD
K3	-	K13	-	K23	AB	K33	BC		ยีโนไทป์
K4	AD	K14	BC	K24	AB	K34	AD	ปู่	BC
K5	BC	K15	AD	K25	AB	K35	-	ย่า	AA
K6	BC	K16	CD	K26	CD	K36	AB	ตา	-
K7	AB	K17	CD	K27	BC	K37	CD	ยาย	Ba
K8	CD	K18	AB	K28	AD	K38	CD	พ่อ	AC
K9	AB	K19	AD	K29	AD	K39	AB	แม่	BD
K10	-	K20	BC	K30	AD	K40	AB		

B. Family 2

ขนาด allele (bp) : A =176, B =172, C =152, X = 212									
ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์
K1	-	K11	BC	K21	AB	K31	AB	K41	BC
K2	AB	K12	AB	K22	AB	K32	AB	K42	AB
K3	AB	K13	AB	K23	AB	K33	BC		ยีโนไทป์
K4	BC	K14	BC	K24	AB	K34	AB	ปู่	BB
K5	AB	K15	BC	K25	-	K35	AB	ย่า	-
K6	AB	K16	BC	K26	XC	K36	BC	ตา	AC
K7	AB	K17	AB	K27	AB	K37	AB	ยาย	-
K8	AB	K18	BC	K28	BC	K38	BC	พ่อ	BB
K9	AB	K19	AB	K29	AB	K39	BC	แม่	-
K10	AB	K20	AB	K30	BC	K40	AB		

C. Family 6

ขนาด allele (bp) : a = 174, A = 200, B =180, C =176, D =164									
ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์
K1	BC	K11	CD	K21	BC	K31	AB	K41	BC
K2	BC	K12	AD	K22	AD	K32	BC	K42	AB
K3	-	K13	AB	K23	AB	K33	BC		ยีโนไทป์
K4	BC	K14	AB	K24	BC	K34	AD	ปู่	Ba
K5	CD	K15	CD	K25	AD	K35	BC	ย่า	aD
K6	CD	K16	CD	K26	AB	K36	AB	ตา	Aa
K7	BC	K17	AD	K27	CD	K37	BC	ยาย	-
K8	BC	K18	AD	K28	AB	K38	BC	พ่อ	-
K9	BC	K19	AD	K29	CD	K39	AD	แม่	AC
K10	AB	K20	CD	K30	AB	K40	CD		

ไพรเมอร์ CUPmo 11

A. Family 1

ขนาด allele (bp) : A =148, B =144, C =142									
ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์
K1	-	K11	BC	K21	BB	K31	AC	K41	BC
K2	-	K12	BC	K22	AC	K32	BC	K42	BC
K3	-	K13	BC	K23	BB	K33	BB		ยีโนไทป์
K4	AB	K14	BB	K24	BC	K34	BB	ปู่	BC
K5	BB	K15	BB	K25	BC	K35	AC	ย่า	BB
K6	BB	K16	BB	K26	BB	K36	BC	ตา	-
K7	AC	K17	-	K27	AB	K37	AB	ยาย	Ba
K8	BB	K18	BB	K28	-	K38	AB	พ่อ	BC
K9	AB	K19	BC	K29	BB	K39	AB	แม่	AB
K10	-	K20	BB	K30	AB	K40	AC		

B. Family 2

ขนาด allele (bp) : A = 146, B =135									
ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์
K1	BB	K11	AB	K21	BB	K31	AB	K41	BB
K2	BB	K12	AB	K22	BB	K32	AB	K42	BB
K3	AB	K13	AB	K23	-	K33	-		ยีโนไทป์
K4	AB	K14	-	K24	-	K34	-	ปู่	-
K5	BB	K15	-	K25	AB	K35	BB	ย่า	-
K6	BB	K16	BB	K26	BB	K36	BB	ตา	AB
K7	-	K17	AB	K27	AB	K37	AB	ยาย	-
K8	AB	K18	BB	K28	-	K38	BB	พ่อ	AB
K9	AB	K19	AB	K29	BB	K39	AB	แม่	BB
K10	-	K20	BB	K30	BB	K40	BB		

C. Family 6

ขนาด allele (bp) : A =147, B =138									
ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์
K1	AA	K11	AB	K21	AB	K31	AB	K41	AB
K2	AA	K12	AA	K22	AB	K32	AB	K42	AB
K3	-	K13	AA	K23	AB	K33	AB		ยีโนไทป์
K4	AB	K14	AA	K24	AA	K34	AB	ปู่	AB
K5	AB	K15	AB	K25	AA	K35	AA	ย่า	AA
K6	AB	K16	AA	K26	AB	K36	AA	ตา	-
K7	AA	K17	AB	K27	AB	K37	AA	ยาย	-
K8	AA	K18	AA	K28	AA	K38	AB	พ่อ	-
K9	AB	K19	-	K29	AA	K39	AB	แม่	-
K10	AA	K20	AB	K30	AA	K40	AA		

ไพรเมอร์ CUPmo 9

A. Family 1

ขนาด allele (bp) : A = 372, B = 265, C = 367, D = 357, E = 346, F = 344									
ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์
K1	-	K11	CF	K21	FB	K31	FB	K41	-
K2	CF	K12	-	K22	EB	K32	CF	K42	EB
K3	EB	K13	EB	K23	-	K33	FB		ยีโนไทป์
K4	FB	K14	CF	K24	-	K34	CE	ปู่	AB
K5	EB	K15	CF	K25	FB	K35	EB	ย่า	CD
K6	CE	K16	-	K26	FB	K36	EB	ตา	-
K7	-	K17	-	K27	CE	K37	CE	ยาย	CF
K8	-	K18	-	K28	EB	K38	CF	พ่อ	CB
K9	CE	K19	FB	K29	EB	K39	FB	แม่	EF
K10	-	K20	CE	K30	EB	K40	CE		

B. Family 2

ขนาด allele (bp) : A = 352, B = 263, C = 300, D =216									
ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์
K1	-	K11	AC	K21	BD	K31	BD	K41	AB
K2	BD	K12	AC	K22	AB	K32	BD	K42	-
K3	CD	K13	-	K23	BD	K33	-		ยีโนไทป์
K4	BD	K14	AC	K24	AC	K34	AB	ปู่	-
K5	-	K15	-	K25	-	K35	-	ย่า	-
K6	BD	K16	AC	K26	AC	K36	BD	ตา	-
K7	CA	K17	-	K27	AB	K37	AC	ยาย	-
K8	CA	K18	AC	K28	BD	K38	AB	พ่อ	-
K9	AB	K19	BD	K29	BD	K39	CD	แม่	-
K10	-	K20	BD	K30	BD	K40	AB		

C. Family 6

ขนาด allele (bp) : A = 330, B =308, C = 352, D = 376									
ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์	ลูก	ยีโนไทป์
K1	CD	K11	CD	K21	CB	K31	-	K41	CB
K2	CD	K12	-	K22	-	K32	-	K42	CB
K3	-	K13	CB	K23	-	K33	AD		ยีโนไทป์
K4	-	K14	-	K24	-	K34	AD	ปู่	AB
K5	AB	K15	AB	K25	CB	K35	CD	ย่า	-
K6	-	K16	AB	K26	AB	K36	-	ตา	AB
K7	-	K17	-	K27	-	K37	-	ยาย	-
K8	-	K18	-	K28	-	K38	-	พ่อ	-
K9	-	K19	-	K29	-	K39	CB	แม่	-
K10	CD	K20	-	K30	AD	K40	-		

Publication ในวารสารระดับนานาชาติ

(1) Pongsomboon, S., Whan, V., Moore, S., and **Tassanakajon, A.** (2000). Characterization of tri- and tetranucleotide microsatellite in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Sci Asia*. **26**: 1-8.

(2) Supangul, P., Sootanan, P., Klinbunga, S., Kamonrat, W., Jarayabhand, P., and **Tassanakajon, A.** (2000). Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp *(Penaeus monodon)* in Thailand. *Mar Biotechnol.* 2:339-347.

(3) **Tassanakajon, A.,** Supungul, P., Klinbunga, S., Jarayabhand, P., and Boonsaeng, V. Microsatellite variation in wild populations of the black tiger prawn, *Penaeus monodon* in Thailand. In : Larkin, P.J. (ed). *Agricultural Biotechnology : Laboratory, Field and Market.* Proceeding of the 4th Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology, Darwin 13-16 July 1998. Canberra, UTC Publishing. pp. 255-257.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Characterization of Tri- and Tetranucleotide Microsatellites in the Black Tiger Prawn, *Penaeus monodon*

S Pongsomboon[a], V Whan[b], SS Moore[b] and A Tassanakajon[a,*]
[a] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.
[b] CSIRO Tropical Agriculture, St Lucia, 4072 Queensland, Australia.
* Corresponding author: Tel: +66-2-218 5439 Fax: +66-2-218 5436 E-mail: anchalee.k@chula.ac.th

Received 24 Sep 1999
Accepted 18 Feb 2000

ABSTRACT In order to characterize tri- and tetranucleotide microsatellites in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, a genomic library of *P. monodon* was screened with the repeats $(GAA)_n$, $(GATA)_n$, $(GGAT)_n$, $(GGAA)_n$ and $(CACC)_n$. In the 79 positive clones isolated, the repeats $(GATA)_n$ was found at the highest frequency, followed by the $(GAA)_n$ while the other sequence types were rare or not found. Sequencing of the microsatellite positive clones revealed that the predominant category of $(GAA)_n$ and $(GATA)_n$ microsatellites were perfect repeats, with the number of repeats ranging from 5 to 45 for $(GAA)_n$ and 4 to 16 for $(GATA)_n$. Primers were designed for seven microsatellite loci and 6 pairs of primers produce scorable PCR products. Analysis of polymorphism in wild *P. monodon* caught off the Gulf of Thailand revealed that all six microsatellite loci were highly polymorphic with 21 to 29 alleles and heterozygosities of 16 to 89%. Cross-amplification using these microsatellite markers on related penaeid shrimps suggested low level of sequence similarity in microsatellite regions among penaeids.

KEYWORDS: microsatellite, *Penaeus monodon*, black tiger prawn.

INTRODUCTION

Microsatellites are tandemly repetitive DNA sequences with very short nucleotide motifs (1-6 bp) and their repeat arrays are generally no longer than 300 bp.[1] They are abundant and distributed throughout the eukaryotic genome. Variation in the numbers of repeating units was demonstrated[2] and microsatellite polymorphisms can be assayed by the polymerase chain reaction (PCR).[3] Allelic variants of a microsatellite locus are codominant and show Mendelian inheritance. Microsatellites are being employed as genetic markers in a variety of organisms.[2,4] Their applications include genome characterization and mapping,[5,6] parentage and identity testing,[7,8] genetic differentiation and population studies.[9,10]

Microsatellite markers are being increasingly applied in fisheries and aquaculture.[11] The development of microsatellite markers have been reported in fish and marine invertebrate species including Atlantic salmon,[12] Atlantic cod,[13] seabass,[14] oyster[15] and lobster.[16]

In the commercially important marine shrimps, microsatellites have been characterized in *Penaeus vannamei*,[17,18] *P. japonicus*[19] and *P. monodon*.[20,21] Shrimp microsatellites, particularly the dinucleotide repeats, have been found to consist of very long repeat arrays which has resulted in difficulties in developing useful microsatellite markers. Tri- and tetranucleotide repeats, have become useful genetic markers in penaeids. These markers are easier to analyse as fewer stutter bands, characteristic of dinucleotide repeats, have been observed.

In this study, we further investigated sequence types and characteristics of tri- and tetranucleotide microsatellites in the black tiger prawn, *P. monodon* genome. We also report allelic variations and heterozygosities of 6 useful markers in wild population of *P. monodon* and examine whether these microsatellite loci are conserved in other penaeid species.

MATERIALS AND METHODS

Samples and DNA extraction

Wild *P. monodon* used to survey for polymorphism were taken from the east coast of Thailand (The Gulf of Thailand). Other penaeid species, *P. vannamei*, *P. japonicus*, *P. semisulcatus*, *P. mergiensis* and *P. indicus* which were tested for cross-amplification were also wild-caught animals. For cloning purposes, genomic DNA was extracted from the pleopod of a shrimp using the phenol/chloroform

extraction described in Sambrook *et al.*[22] DNAs used in genotyping were extracted using simple chelex method described by Walsh *et al.*[23]

Cloning and screening of tri- and tetranucleotide microsatellites

High molecular weight DNA was sonicated to yield approximately 500 bp fragments. The DNA fragments were treated with T4 polynucleotide kinase (Promega) and Klenow Polymerase (Promega) to repair ends. Approximately 150 ng of this DNA fragments was ligated into 50 ng of pUC18/*Sma*I (Pharmacia) at 16°C overnight. The ligation mixture was transformed into Epicurian Coli XL-10-Gold™ Ultracompetent cells (Stratagene). Transformed cells were grown up overnight on LB agar plates containing 50 µg/ml ampicillin with X-gal and IPTG.

Recombinant colonies were transferred onto Hybond-N⁺ nylon membranes (Amersham) and hybridized with microsatellite probes as described by Moore *et al.*[19] The synthetic oligonucleotide probes, $(GATA)_6$, $(GGAT)_6$, $(GGAA)_5$, $(CACC)_5$ and a concatemer probe $(GAA)_n$ were used in library screening. The $(GAA)_n$ probe was labelled with [α-^{32}P]-dCTP by random priming method[22] while the oligoprobes were 5'-end labelling with [γ-^{32}P]-ATP and T4 polynucleotide kinase (Promega). The radiolabelled oligoprobes were hybridized to the colony-lifted membranes in a buffer containing 1M NaCl, 42 mM Tris-HCl pH 7.4, 1.2 mM EDTA, 0.2% SDS, 1% BSA and 0.1% sodium pyrophosphate, at Tm-5°C overnight but the $(GAA)_n$ concatemer were hybridized at 65°C overnight.

The filters probed with the end labelled oligonucleotides were washed in 2 x SSC, 0.1% SDS for 10 min at the hybridization temperature and twice for 10 min at room temperature in 0.2 x SSC, 0.1% SDS. Filters probed with $(GAA)_n$ were treated in the same way except all washes were performed at 65°C.

Sequencing and primer synthesis

Positive colonies were picked from the plates and grown in terrific broth.[22] Plasmid DNA was extracted by modified alkaline lysis/PEP precipitation,[22] sequenced using the ABI Prism™ Ready Reaction Dye Deoxy Cycle Sequencing Kit and analysed on a ABI 373 Automated Sequencer. Primers were designed from the unique sequences flanking microsatellites loci using the computer program MACVECTOR version 4.5.1 primer design software (International Biotechnologies Inc Kodak). The primers were synthesized by Geneworks, Adelaide, Australia.

PCR amplification

PCR conditions for each primer pair were optimized by testing at three different annealing temperatures: 50; 56; and 60°C, using the Robo Cycler Gradient Temperature Thermocycler (Stratagene). Other PCR conditions were fixed at 1 cycle of 95°C for 3 min, 30 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing for 2 min and extension at 72°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 10 min. One of each pair of primers was end-labelled with [γ-^{32}P]-ATP (Amersham) using T4 polynucleotide kinase. PCR was performed in a 20 µl reaction volume containing 5-50 ng of genomic DNA, 1X PCR buffer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 250 nM of each primer and 0.44 U of *Taq* polymerase. PCR products were separated on 6% denaturing acrylamide gels. Gels were dried and exposed to x-ray film overnight.

Data analysis

The number of alleles at each microsatellite locus, the proportion of individual samples that are heterozygous (direct count heterozygosity, H_{obs}) and the unbiased estimate of heterozygosity (H_{exp}), were assessed for each locus using a modified version of BIOSYS-1 program.[24] Hardy-Weinberg expectation test for each locus was a Markov chain "approximation to exact test" following Guo and Thompson[25] and carried out using the GENEPOP program.[26]

Results

Isolation of tri- and tetranucleotide repeats in *P. monodon*

The results of genomic library screening for microsatellite repeats $(GAA)_n$, $(GATA)_n$, $(GGAT)_n$, $(GGAA)_n$ and $(CACC)_n$ are summarized in Table 1. A total of 79 positive clones were found in the screening. The percentages of positive clones were 0.24% for $(GAA)_n$, 1.21% for $(GATA)_n$, 0.04% for $(GGAT)_n$, 0.05% for $(GGAA)_n$ and 0% for $(CACC)_n$. The results suggested that the trinucleotide $(GAA)_n$ and the tetranucleotide repeats $(GATA)_n$ were present in significant numbers in the *P. monodon* genome but the repeats $(GGAT)_n$, $(GGAA)_n$ and $(CACC)_n$ appeared to be rare or did not exist. Sequencing of those positive clones revealed 71 microsatellite containing clones and most of these clones contained more than one microsatellite array. According to Stalling *et al*,[5] a sequence is considered to be a microsatellite when

Table 1. Screening of the partial genomic library of *P. monodon* with various tri- and tetranucleotide probes.

Probe	Colonies screened	No of positive clones	Frequency (%)
$(GAA)_n$	9,900	24	0.24
$(GATA)_6$	4,200	51	1.21
$(GGAT)_6$	7,560	3	0.04
$(GGAA)_5$	1,900	1	0.05
$(CACC)_5$	1,900	0	0

the number of repeats is greater than 10 for mononucleotide, 6 for dinucleotide, 4 for trinucleotide, and 3 for tetranucleotide, pentanucleotide and hexanucleotide. A total of 163 microsatellite arrays were identified from 71 clones and among these microsatellites, 32 were $(GAA)_n$ and 36 were $(GATA)_n$ repeats. Seventy-seven dinucleotide microsatellites, including $(CT)_n$, (AT)n and $(GT)_n$, were found within those positive clones adjacent to the repeat arrays of either $(GAA)_n$ or $(GATA)_n$.

Microsatellite characteristics

The $(GAA)_n$ and $(GATA)_n$ microsatellites were classified into 3 categories, perfect, imperfect, and compound repeats as defined by Weber (1990).[27] Perfect repeats are uninterrupted stretches of repeat units, while imperfect repeats have one to three intervening bases with repeat sequence on either side. Compound repeats consist of several different repeat types and are separated by less than three bases. Compound repeats were further subdivided into perfect and imperfect sequences (Table 2). Perfect repeats were found at the highest percentages for both $(GAA)_n$ and $(GATA)_n$. For $(GAA)_n$, 66% of the repeats were perfect microsatellite, while 53% of those $(GATA)_n$ isolated were perfect microsatellites. Compound repeats were also found at high percentage (42%) for (GATA)n while only 9% of $(GAA)_n$ were compound repeats. A range of repeat numbers were 5-45 for $(GAA)_n$ and 4-16 for $(GATA)_n$. The maximum repeat number may be underestimated because there were 4 clones which had the cloning sites occurred within the repeats.

Table 2. Repeat range and percentage of perfect, imperfect and compound repeats in *P. monodon* microsatellites.

Repeat	Total no	Range of repeat no	Category of Repeat						
			Perfect		Imperfect		Compound		
			No	%	No.	%	No of perfect	No of Imperfect	%
$(GAA)_n$	32	5-45	21	66	8	25	1	2	9
$(GATA)_n$	36	4-16	19	53	2	5	7	8	42

Table 3. Repeat sequences, PCR primers, and optimized annealing temperature for 6 microsatellite loci in *P. monodon*.

Locus	Repeat sequences	Primer sequences*	Annealing Temp (°C)
CSCUPmo1	$(GAA)_{43}$	F = ATGATGGCTTTGGTAAATGC	
		R = CGTACTTCCTCTTCATAGGTATC	56
CSCUPmo2	$(ATCT)_{12}(TA)_{10}(TAGA)_3$	F = CCAAGATGTCCCCAAGGC	
		R = CTGCAATAGGAAAGATCAGAC	56
CSCUPmo3	$(ATCT)_{12}(AT)_9T(GT)_9$	F = TGCGTGATTCCGTGCATG	
		R = AGACCTCCGCATACATAC	56
CSCUPmo4	$(CT)_{10}TG(CT)_{17}(ATCT)_{10}$	F = TTTCTTTCTTCTCGTGATCCC	
		R = GACGGCATGAGGAATAGAGG	52
CSCUPmo6	$(GATA)_6(GA)_{16}$	F = TAGTGTTACTCAGGTGCAGC	
		R = GCGTGTATTTGTGATTTCAC	56
CSCUPmo7	$(CT)_{15}(ATCT)_9$	F = ACGAATGAATGCGGTGGTGC	
		R = TCGGTGCCCAGTTGTATGAGAG	56

* F indicates forward; R, reverse.

However, most of the repeat numbers for the two microsatellite types were less than 15 repeats.

Many compound repeats contain more than 2 different repeat types separated by 1 to 3 bases indicated the complexity of *P. monodon* microsatellites. $(GATA)_n$ microsatellites are frequently associated with dinucleotides $(AT)_n$ and $(CT)_n$ and tetranucleotide $(CATA)_n$ repeats.

Primer design and microsatellite polymorphism

Although most tri- and tetranucleotide microsatellites exhibited less than 15 repeats, they were often associated with other dinucleotide microsatellites which contained very long repeat arrays. Moreover, many compound microsatellites consisted of several different repeat types and some microsatellites were adjacent to the cloning sites so unique sequences flanking the repeats for primer design were not available. Only 7 pairs of primers were designed, 1 from $(GAA)_n$ and 6 from $(GATA)_n$ repeats. Six primers produced scorable PCR products with size in the expected range. The repeat type, primer sequences and annealing temperature for each microsatellite locus are shown in Table 3. Examples of amplified alleles of unrelated individuals using CSCUPmo1 (alleles 224-326 bp) and CSCUPmo2 (alleles 137-217 bp) were shown in Figs 1 and 2.

DNA samples from wild *P. monodon* caught off the Gulf of Thailand were analysed at the six microsatellite loci. All six loci were polymorphic with 21 to 29 alleles and heterozygosities of 16 to 89% (Table 4). A comparison of the observed heterozygosities with expected values suggest that there was a deficiency of heterozygotes and consequently all loci except the locus CSCUPmo4, were not in Hardy-Weinberg equilibrium ($p<0.05$).

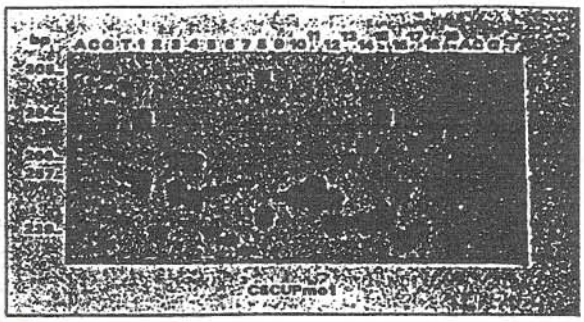


Fig 1. PCR amplified alleles for CSCUPmo1 locus from unrelated *P monodon*.
Lanes 1-19: 19 unrelated animals
The size of PCR products were estimated using M13 sequencing ladder (lanes A, C, G, and T).

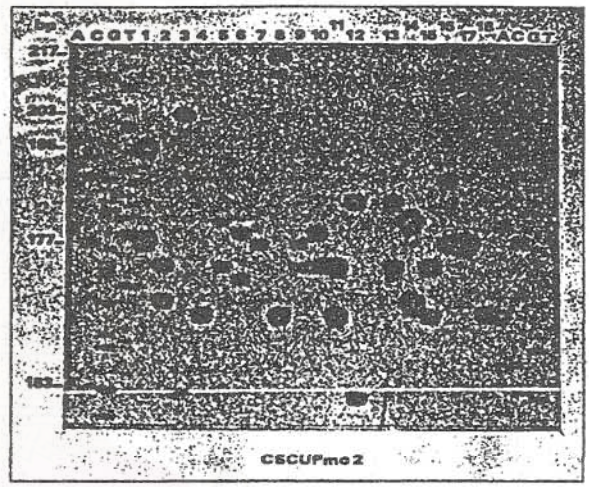
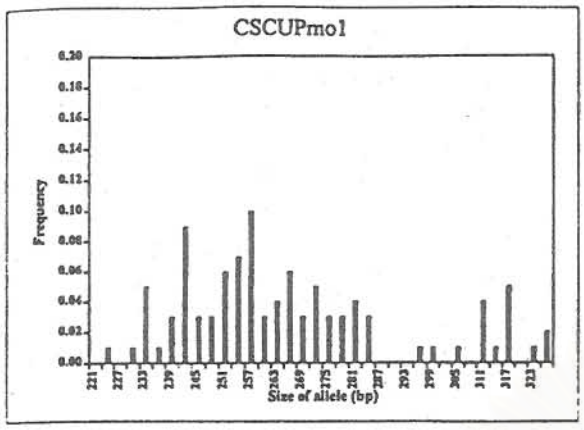


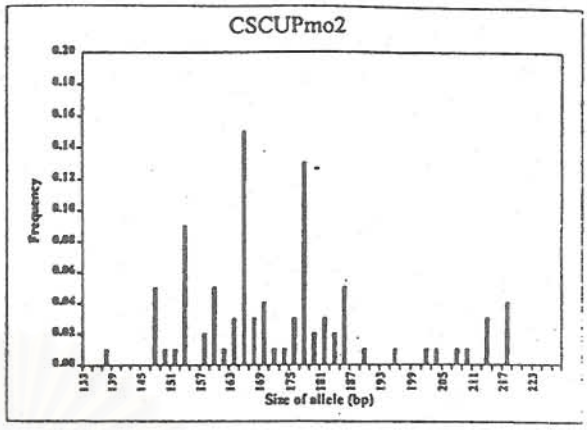
Fig 2. PCR amplified alleles for CSCUPmo2 locus from unrelated *P monodon*.
Lanes 1-18: 18 unrelated animals
The size of PCR products were estimated using M13 sequencing ladder (lanes A, C, G, and T).

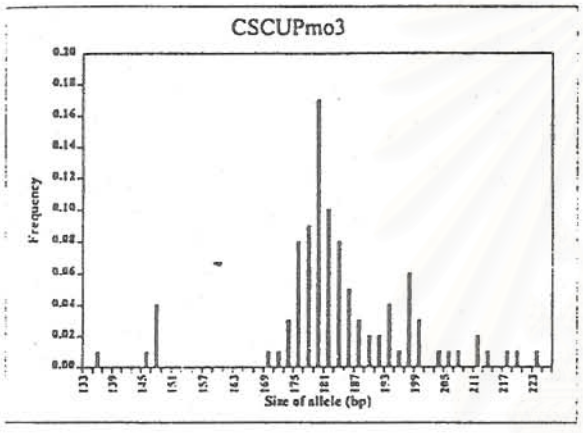
Table 4. Allele size and heterozygosity at 6 microsatellite loci detected by PCR amplification.

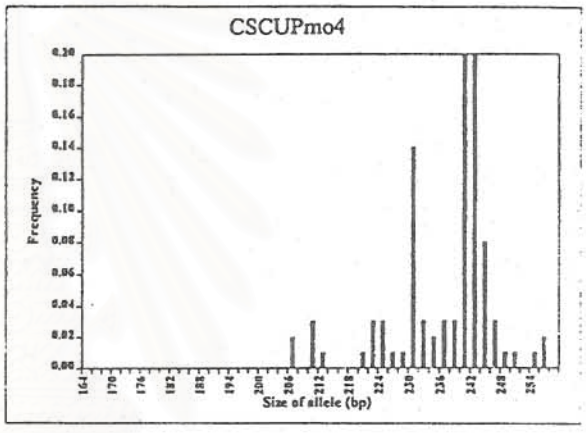
Locus	Sample size	Observed alleles	Size range (bp)	H_{obs}*	H_{exp}#	H-W† (*p* value)
CSCUPmo1	51	29	224-326	0.73	0.96	<0.0001
CSCUPmo2	51	28	137-217	0.78	0.94	0.0024
CSCUPmo3	49	27	135-223	0.63	0.93	<0.0001
CSCUPmo4	45	21	206-256	0.89	0.89	0.2138
CSCUPmo6	49	27	166-242	0.69	0.96	<0.0001
CSCUPmo7	43	21	172-234	0.16	0.94	<0.0001

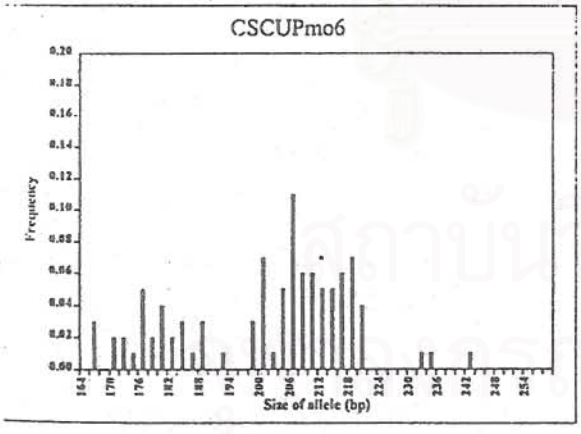
*Observed heterozygosity; # Expected heterozygosity.
†Probability of agreement to Hardy-Weinberg equilibrium.











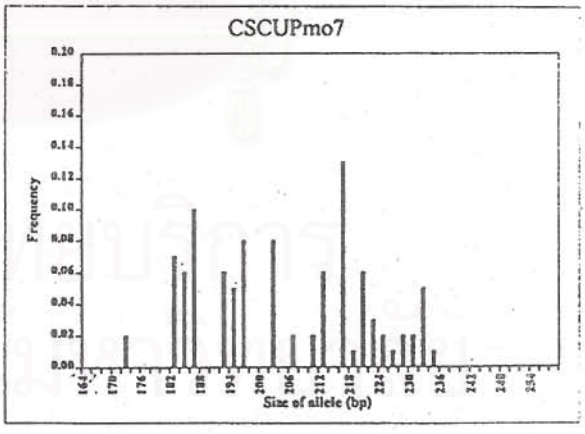


Fig 3. Distribution of allele frequencies in wild *P. monodon* from The Gulf of Thailand at six microsatellite loci: CSCUPmo1; CSCUPmo2; CSCUPmo3; CSCUPmo4; CSCUPmo6; and CSCUPmo7.

The six microsatellite loci varied in allele size range from 135-326 bp. The allele frequency distributions for the six microsatellite loci in wild *P. monodon* are shown in Fig 3. All loci showed wide variation in allele size range. Allele size differences of 3 bp were found in CSCUPmo1 and 2 bp differences were found in the other 5 loci. There were gaps in the range of allele sizes, particularly at CSCUPmo3, there was a jump from 147 to 169 bp. The frequencies of the common alleles did not exceed 20% in any one of the loci.

Conservation of microsatellite markers

Conservation of microsatellites was examined by testing for amplification of the six microsatellite loci in five penaeid species: *P. vannamei*, *P. japonicus*, *P. semisulcatus*, *P. merguiensis* and *P. indicus*. The PCR conditions used were those optimal for amplification of microsatellite loci from *P. monodon* and thus may not be optimal in the other species. Primers from *P. monodon* microsatellite loci CSCUPmo1, CSCUPmo2 and CSCUPmo6 weakly amplified five other penaeid species (five individuals for each species) yielding faint bands of amplified alleles suggesting at least partial conservation of the priming sites (data not shown). The CSCUPmo3 and CSCUPmo7 primers amplified non-specifically in other penaeids yielding unscorable DNA patterns while no product was detected after PCR with the CSCUPmo4 primers.

Discussion

Tri- and tetranucleotide microsatellites have been demonstrated to be highly polymorphic and are stably inherited in the human genome.[28] They are becoming increasingly popular markers because the allele differences are easier to distinguish than those of dinucleotide repeats and less stutter bands have been observed in the amplification products. In this study, the abundance of different tri- and tetranucleotide repeats in the *P. monodon* genome were examined. By screening the genomic library with 5 repeat types and sequencing of positive clones, only the repeats $(GATA)_n$ and $(GAA)_n$ were found at significant amounts. Xu *et al*[21] have found various sequence types of tri- and tetranucleotide microsatellites in *P. monodon* by direct sequencing of recombinant clones without probe screening. The simple repeat$(GATA)_n$ was first identified and isolated from snake satellite DNA[29] and subsequently it has been found throughout the eukaryotic genomes. The low frequency of positive clones found in the screening suggests that enrichment of microsatellite sequences prior to screening would be useful.[30]

Classification of the repeats $(GATA)_n$ and $(GAA)_n$ based on Weber's criteria,[27] revealed that perfect microsatellites were the predominant categories for both types of repeats. This was different than that found in the dinucleotide repeats of *P. mondon* reported previously[20] where imperfect microsatellites were found to be the most abundant. The dinucleotide microsatellites contained very long repeat arrays and most often were interrupted with one to three bases on either side while tri- and tetranucleotide repeats contained short uninterrupted repeats.

From the 71 microsatellite clones sequenced, only 7 primer pairs were designed due to the complexity of microsatellite arrays. Six usable markers were obtained. All six loci were highly polymorphic exhibiting more than 20 alleles at each locus. The high level of polymorphism makes these microsatellite loci ideal for genome mapping, determining of parentage and pedigree analysis.[11] The allele differences between consecutive alleles for all loci depended on the repeat type. For CSCUPmo1, which was a perfect $(GAA)_n$ repeat, consecutive alleles differ by 3 bp. For the other loci, which were compound repeats of $(GATA)_n$ linked to different types of dinucleotide repeats, the alleles were different by multiples of 2 bases. This suggests that the polymorphism detected at these loci is occurring both within the dinucleotide and the tetranucleotide repeat arrays. The stutter bands which often appear on the dinucleotide microsatellite alleles were also observed in all loci except CSCUPmo1. The appearance of shadow or stutter bands has been shown to be due to slipped-strand mispairing during PCR[31] and the stutter bands tend to decrease with increasing unit length.[28]

Observed heterozygosities were lower than the expected values in all six loci and significant deviation from Hardy-Weinberg proportion was observed in all except the CSCUPmo4 locus. The deficiency of heterozygotes observed could be a result of small sample size[32] or the presence of null alleles.[33] The sample size of 50, which is normally adequate for an allozyme study, may not cover all possible genotypes generated by microsatellite loci which have a high number of alleles per locus. The extreme heterozygote deficiency found at the CSCUPmo7 locus could possibly be caused by mis-scoring of the stutter alleles or the presence of null alleles.

The weak amplification obtained with *P. monodon* primers when used with other penaeid species suggests a low level of sequence similarity in microsatellite regions among penaeid shrimps. This

supports the finding of Moore *et al* [19] that primers are likely to be largely species specific among a number of penaeids. However, the usefulness of *P. monodon* microsatellites in closely related species should be further investigated by changing the primer binding sites in each locus. Xu *et al*[21] have reported that 3 out of 10 *P monodon* microsatellites amplified alleles in *P.vanamei* indicating the potential of some microsatellites for cross-species amplification.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Sirawut Klinbunga for comments on the manuscript and for providing DNA samples of *P. vannamei* and *P. semisulcatus*. We also thank Dr Amornrat Pongdara for kindly provided DNA samples of *P. merguiensis* and *P. indicus*. We express our thanks to Dr Vichien Rimphanitchayakit for valuable suggestions on the manuscript and to Pitak Sootanan and Sureerat Tang for technical assistance. This research was supported by a grant from the Thailand Research Fund to A Tassanakajon. Student support to S Pongsomboon from Graduate Research and Education Consortium (GREC), Thailand's National Science and Technology Development Agency was greatly appreciated.

References

1. Tautz D and Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryote genome. *Nucleic Acids Res* 12, 4127-38.
2. Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17, 6463-71.
3. Weber JL and May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44, 388-96.
4. Lagercrantz U, Ellegren H and Andersson L (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res* 21, 1111-15.
5. Stalling RL, Ford AF, Nelson D, Torney DC, Hildebrand CE and Moyzis RK (1991) Evolution and distribution of $(GT)_n$ repetitive sequences in mamalian genomes. *Genomics* 10, 807-15.
6. Lee JW and Kocher TD (1996) Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. *J Fish Biol* 49, 169-71.
7. Marklund S, Ellegren H, Eriksson S, Sanberg K, and Anderson L (1994) Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim Genet* 25, 19-23.
8. Herbinger CM, Doyle RW, Taggart CT, Lochmann S, Brooker A, Wright JM and Cook D (1997) Family relationships and effective population size in a natural cohort of cod larvae. *Can J Fish Aquat Sci* 54 (suppl 1), 11-8.
9. McConnell S, O'Reilly P, Hamilton L, Wright JM and Bentzen P (1995) Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiation of North American and European populations. *Can J Fish Aquat Sci* 52, 1863-72.
10. Goldstein DB and Clark AG (1995) Microsatellite variation in North-American populations of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 23, 3882-6.
11. O'Reilly P and Wright JM (1995) The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *J Fish Biol* 47 (suppl. A), 29-55.
12. Slettan A, Olsaker I. and Lie O (1993) Isolation and characterization of variable $(GT)_n$ repetitive sequences from Atlantic salmon, Salmo-salar L. *Anim Genet* 24, 195-7.
13. Brooker AL, Cook D, Bentzen P, Wright JM and Doyle RW (1994) Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. *Can J Fish Aquat Sci* 51, 1959-66.
14. Garcia de Leon FJ, Dallas JF, Chatain B, Canonne M, Versini JJ and Bonhomme F (1995) Development and use of microsatellite markers in sea bass, *Dicentrachus labrax* (Liiaeus, 1758) (Perciformes : Serrandidae). *Mol Mar Biol Biotechnol* 4, 62-8.
15. Naciri V, Vigouroux Y, Dallas J, Desmorais E, Delsert C and Bonhomme F (1995) Identification and inheritance of $(GA/TC)_n$ and $(AC/GT)_n$ repeats in the European flat oyster, *Ostrea edulis* (L.). *Mol Mar Biol Biotechnol* 4, 83-9.
16. Tam YK and Kornfield I (1996) Characterization of microsatellite markers in *Homarus* (Crustacea, Decapoda). *Mol Mar Biol Biotechnol* 5, 230-8.
17. Bagshaw JC and Buckholt MA (1997) A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Gene* 184, 211-4.
18. Wolfus GM, Garcia DK and AlcivarWarren A (1997) Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 152, 35-47.
19. Moore SS, Whan V, Davis G, Byrne K, Hetzel DJS and Preston N (1999) The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* and their use in parentage determination and linkage mapping. *Aquaculture* 173, 19-32.
20. 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.
21. Xu Z, Dhar AK, Wyrzykowski J and Alcivar-Warren A (1999) Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) *Anim Genet* 30, 150-6.
22. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
23. Walsh SP, Metzger DA and Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10, 506-13.
24. Swofford DL and Selander RB (1981) BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systemics. *J Hered* 72, 281-3.
25. Guo SW and Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions of multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-72.
26. Raymond M and Rousset F (1995) GENEPOP (ver1.2): a population genetics software for exact test and eumenicism. *J Hered* 86, 248-9.
27. Weber JL (1990) Informativeness of human (dC-dA)ni(dG-dT)n polymorphisms. *Genomics* 7, 524-30.
28. Edwards A, Civitello A, Hammond HA and Caskey CT (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 49, 746-56.
29. Epplen JT, McCarrey JR, Sutou S and Ohno S (1982) Base

29. Epplen JT, McCarrey JR, Sutou S and Ohno S (1982) Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 3798-802.
30. Ostrander EA, Jong PM, Rine J and Duyk G (1992) Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3419-23.
31. Hauge XY and Litt M (1993) A study of the origin of shadow bands seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. *Hum Mol Genet* 2, 411-5.
32. Lessios HA (1992) Testing electrophoretic data for agreement with Hardy-Weinberg expectations. *Mar Biol* 112, 517-23.
33. Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR and Barrett JA (1995) Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol Ecol* 4, 249-52.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY:

Laboratory, Field and Market

Proceedings of the
4th Asia-Pacific Conference on
Agricultural Biotechnology

13-16 July 1998
Darwin Australia

Editor: P.J. Larkin

Microsatellite variation in wild populations of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Thailand

Anchalee Tassanakajon, Premruthai Supangul, Sirawut Klinbunga, Pademsak Jarayabhand, and Vichai Boonsaeng

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
Fax: (662) 2185436; e mail: fsciakm@chulkn.car.chula.ac.th

Introduction

The black tiger prawn, *Penaeus monodon* is one of the most commercially important marine shrimp accounting for 46% of total world cultured shrimp production (Hanpongkittikun et al, 1995). In Thailand, the cultivation of *P. monodon* has developed rapidly over the last decade to the current production of approximately 200,000 metric tons per year. Although good success in the farming industry has been achieved, the business encountered several difficulties. One of the major obstacles is that farming of *P. monodon* relies entirely on wild-caught spawners resulting in unreliable supplies of seed stock and extensive exploitation of wild broodstock. Domestication of this important species would provide a great benefit to the industry. Recently, our research group at Chulalongkorn University has initiated a selective breeding program of *P. monodon*. Basic knowledge on genetic diversity and population structure of *P. monodon* in Thailand is required to select the shrimp stocks for establishing a sensible breeding program.

In this study, microsatellite markers were employed to assess the genetic diversity in wild populations of *P. monodon* collected from 5 different geographic locales from 2 main fishery regions: the Andaman Sea on the west and the Gulf of Thailand on the east coast.

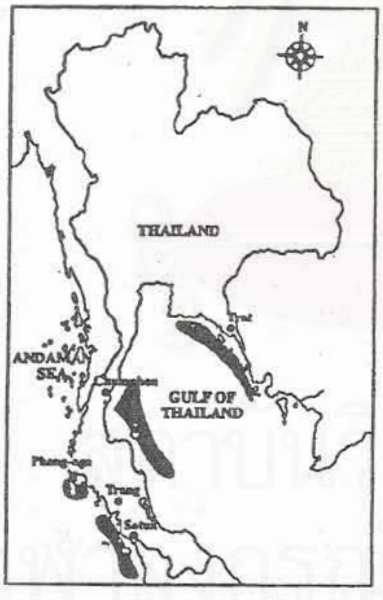


Figure 1. Map showing collection sites (Satun, Trang, Phang-nga, Chumphon and Trat). Shaded areas show locations where black tiger prawn broodstocks are commonly caught for farming in Thailand.

Methods

Samples and DNA extraction

Samples were wild-caught broodstocks collected from 5 different locations comprising Trat and Chumphon in the Gulf of Thailand and Satun, Trang and Phangnga in the Andaman Sea (Fig. 1). Genomic DNA was extracted from pleopods of individual shrimps as described by Tassanakajon et al. (1997).

PCR analysis

PCR amplification was as previously described by Tassanakajon et al. (1998) using three set of *P. monodon* microsatellite primers, CUPmo18, Di 25 and Di 27. The primer sequences for CUPmo18

were as described previously (Tassanakajon et.al., 1998). The sequences of primers for Di 25 and Di 27 were kindly provided by Dr. F. Bonhomm (Genetique de Population Marines, Station Mediterraneene de l' Environment, Sete, France). The PCR products were resolved on 6% denaturing acrylamide gel and the alleles were sized relative to a sequence ladder generated from M13mp18.

Data analysis

The number of alleles at each locus, the proportion of individual samples that are heterozygous (direct-count heterozygosity, H_{obs}) and the unbiased estimate of heterozygosity (H_{exp}; Nei, 1978), were assessed for each locus using a modified version of BIOSYS-1 program. Hardy-Weinberg expectation test for each locus was a Markov chain "approximation to exact test" following Guo and Thompson (1992) and carried out using the GENEPOP program. Effective number of alleles per locus was averaged over three loci, and for each locus the number of effective alleles was $1/\Sigma p^2_i$ where p_i is the allele frequency (Crow and Kimura, 1965).

Table 1. Number of alleles, size range of alleles, heterozygosities and effective number of alleles at three microsatellite loci (CUPmo18, Di 25, Di 27) for each sample.

loci	Collection sites				
	Satun	Trang	Phang-nga	Chumphon	Trat
CUPmo18					
N	32	35	30	42	39
N° of allele	23	24	21	28	20
size range	106-162	104-172	106-160	104-168	106-144
[1]H_{obs}	0.56	0.49	0.77	0.83	0.77
[2]H_{exp}	0.94	0.95	0.95	0.95	0.92
[3]n_e	16.20	18.53	14.37	18.31	15.01
[4]P-val	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0003	0.0004
Di 25					
N	36	35	28	37	48
N° of allele	24	23	19	23	20
size range	140-208	140-208	136-208	142-202	140-188
[1]H_{obs}	0.78	0.77	0.61	0.70	0.69
[2]H_{exp}	0.95	0.95	0.94	0.94	0.92
[3]n_e	14.93	15.3	13.29	14.05	11.10
[4]P-val	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Di 27					
N	32	32	25	49	40
N° of allele	20	25	20	28	28
size range	114-174	122-176	122-178	118-172	124-178
[1]H_{obs}	0.75	0.71	0.8	0.84	0.95
[2]H_{exp}	0.94	0.95	0.95	0.96	0.96
[3]n_e	12.91	17.08	15.06	20.36	19.34
[4]P-val	0.0002	0.0001	0.0031	0.0001	0.4748
[5]averaged n_e	14.68	16.97	14.24	17.57	15.15

[1] Observed heterozygosity
[2] Expected heterozygosity
[3] Effective number of alleles
[4] Probability of agreement to Hardy-Weinberg equilibrium
[5] Effective number of alleles averaged for 3 microsatellite loci

Results and discussion

Numbers of alleles, size range odf alleles, heterozygosities and effective number of alleles at the 3 microsatellite loci were as shown in Table 1. A total of 37 alleles were observed at locus CUPmo18 with the size range from 104-172 bp, 32 alles at locus Di 25 with the size range from 136-208 bp, and 31 alleles at locus Di 27 with the size range from 114-178 bp. All loci which are perfect (GT) repeats exhibited consecutive allelels that differed by multiple number of two bp.

The observed and expected heterozygosities in all samples, at all loci ranging from 0.49-0.95 are shown in Table 1. Significant deviation from HW expectation were detected in all samples for all loci examined except those in Trat at locus Di 27 (P = 0.4748). Heterozygote deficits could be due to several factors such as the presence of null alleles, non-random mating, mixed populations etc. (Lessios, 1992). In this study, deviations from HW expectations may arise from small sample sizes and many rare allelles. The effective number of alleles per locus was smaller than the actual number of alleles per locus due to the presence of rare alleles at all locus since the former takes into account the allele frequencies to which rare alleles contributes negligibly to the estimates. The effective number of alleles averaged for 3 loci indicate relatively high genetic variability in all samples examined.

To investigate whether genetic differentiation exists between the populations on the west and the east coasts, the samples from each coast were pooled (Satun, Trang, Phang-nga as 1 group and Chumphon and Trat as the other). Significant differences in allele frequencies were observed between the populations from the Andaman Sea and the Gulf of Thailand at CUPmo18 and Di 25 ($P<0.0001$) but no genetic differentiation was found at Di 27 ($P=0.066$). At all three loci, significant differences in allele frequencies were observed ($P<0.005$), indicating population subdivision between the Andaman Sea and the Gulf of Thailand populations. These results were concordant with those from RAPD and mtDNA-RFLP analysis (Tassanakajon et al., 1997, Klinbunga, 1996)

Acknowledgments

This research was supported by a grant from the Thailand Research Fund and Chulalongkorn University. Additional support for a student was from the Biodiversity Research and Training program.

References

Crow JF and Kimura M (1965) Evolution and sexual and asexual population. *American Nature* 99:439-450.

Guo SW and Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions of multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.

Hanpongkittikun A, Siripongwutikorn S and Cohen DL (1995) Black Tiger Shrimp (Penaeus monodon) quality changes during ice storage. *ASEAN Food Journal* 10:125-127.

Klinbunga S (1996) Genetic variation and population structure of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Ph.D. thesis University of Stirling. UK 327 pp

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 23:341-369.

Tassanakajon A, Pongsomboon S, Rimphanitchayakit V, Jarayabhand P and Boonsaeng V (1997) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 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*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* (in press).

Mar. Biotechnol. 2, 339–347, 2000
DOI: 10.1007/s101260000012

MARINE BIOTECHNOLOGY

© 2000 Springer-Verlag New York Inc.

Microsatellite Polymorphism and the Population Structure of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand

Premruethai Supungul,[1] Pitak Sootanan,[1] Sirawut Klinbunga,[2] Wongpathom Kamonrat,[3] Padermsak Jarayabhand,[4] and Anchalee Tassanakajon[1,*]

[1]*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*
[2]*Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Development Agency, Bangkok 10400, Thailand*
[3]*Ornamental Fishes Research Institute, Department of Fisheries, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand*
[4]*Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

Abstract: Genetic variation and differentiation of Thai *Penaeus monodon* from five geographic locations (Chumphon, Trad, Phangnga, Satun, and Trang) were investigated using five microsatellite loci (*CUPmo18, Di25, Di27, CSCUPmo1,* and *CSCUPmo2*). The number of alleles across the five loci ranged from 19 to 30, and heterozygosities ranged from 0.49 to 0.95. The mean number of alleles and effective number of alleles per locus were 21.0 to 26.6 and 13.1 to 20.4, respectively. The average heterozygosity across all investigated samples was 0.78, indicating high genetic diversity in this species. Geographic heterogeneity analysis of the results from two of the loci, *CUPmo18* and *Di25,* showed significant differences among the Gulf of Thailand (Trad and Chumphon) but not the Andaman samples. Comparison between regions revealed significant heterogeneity of the Andaman and Trad *P. monodon* ($P < .001$), whereas those from Chumphon and the Andaman were genetically similar ($P > .05$). Significant genetic differentiation was consistently observed between the Andaman-Trad samples ($F_{ST} = 0.0101$, $P < .0001$) and the Chumphon-Trad samples ($F_{ST} = 0.0101$, $P < .0001$). On the basis of our analyses, the investigated samples from five geographic locations were allocated to three distinct populations composed of the Andaman Sea (A), Chumphon (B), and Trad (C).

Key words: microsatellite marker, genetic variation, black tiger shrimp, *Penaeus monodon.*

Introduction

Among commercial shrimp species listed by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) is the most commonly cultured in Southeast Asia (Bailey-Brook and Mass, 1992). Farming of this species in Thailand has increased tremendously during the last decade, leading to the production of at least 200,000 metric tons annually. Since 1992, Thailand has ranked as the leader in farmed *P. monodon* production (Lin and Nash, 1996).

The farming cycle has yet to be completed as the seed of *P. monodon* used in the shrimp industry comes entirely from wild broods. Rapid expansion of *P. monodon* farming has led to heavy exploitation of the female broodstock in

Received October 1, 1999; accepted January 18, 2000.

*Corresponding author: telephone 662-2185439; fax 662-2185436; e-mail Anchalee.K@chula.ac.th

natural populations (Klinbunga et al., 1999). Accordingly, basic knowledge about genetic diversity and population differentiation of *P. monodon* is required to avoid selection of an inbred *P. monodon* broodstock in our selective breeding program (Jarayabhand et al., 1998) and to help identify release sites if a restocking program of this species is required.

The development of molecular genetic markers in *P. monodon* has been an important approach toward studying population genetics and dynamics of this economically important species. Analysis of genetic diversity using allozymes indicated a low level of genetic heterozygosity in *P. monodon* (Benzie et al., 1992; Sodsuk, 1996).

The mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism (mtDNA-RFLP) of *P. monodon* yielded a greater level of genetic variation, providing potential genetic markers for mixed fisheries and stock assessment (Benzie et al., 1993; Bouchon et al., 1994). More recently, genetic population structures of *P. monodon* in Thailand from three different geographic locations (Surat and Trad from the Gulf of Thailand and Satun from the Andaman Sea) were reported (Klinbunga et al., 1999).

Tassanakajon et al. (1997 and 1998a) illustrated geographic population differentiation of *P. monodon* in Thailand using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. The Andaman *P. monodon* (west) showed significant genetic differences compared with the Gulf of Thailand *P. monodon* (east), indicating genetic subdivision between *P. monodon* from these main fisheries regions in Thailand.

Microsatellites are short DNA tandem repeats (usually 2–6 nucleotides), abundantly dispersed along the eukaryotic genome (O'Reilly and Wright, 1995). The polymorphism of microsatellites varies greatly among loci but is usually higher than that of allozymes and mtDNA (Wright and Bentzen, 1994). The range of polymorphism allows for the versatility necessary to select suitable loci for a particular application. For example, highly polymorphic loci exhibiting large numbers of alleles are ideal for gene mapping and pedigree analysis, whereas less polymorphic loci can be used to analyze population differentiation (O'Reilly and Wright, 1995).

The use of microsatellites to analyze genetic variation and population differentiation of aquatic organisms has been increasingly reported during the last few years (McConnell et al., 1995), but it has not been reported for wild *P. monodon* of Thailand or elsewhere. We recently characterized microsatellites of *P. monodon*, and our preliminary results indicated that the average heterozygosity levels determined by two $(GT)_n$ microsatellite loci (*CUPmo18* and *CUPmo386*) were relatively high implying the potential to use these genetic markers for population genetic studies in *P. monodon* (Tassanakajon et al., 1998b).

The objective of this study was to evaluate the levels of genetic variation and divergence of wild *P. monodon* collected from five geographically different locales in Thailand at five microsatellite loci (*CUPmo18*, *Di25*, *Di27*, *CSCUPmo1*, and *CSCUPmo2*). The variation and differentiation patterns are compared with those previously reported using RAPD and mtDNA analyses.

Materials and Methods

Field Sampling

Two hundred and forty-two individuals of wild *P. monodon* were captured alive from five geographic locales in Thailand: i.e., Chumphon ($N = 54$) and Trad ($N = 49$) at the Gulf of Thailand and Phangnga ($N = 38$), Satun ($N = 49$), and Trang ($N = 52$) at the Andaman Sea (Figure 1). Pleopods were dissected from each individual and stored at −80°C until required.

DNA Extraction

Genomic DNA was extracted from frozen pleopods of *P. monodon* using a phenol/chloroform–proteinase K method according to Tassanakajon et al. (1998a). The concentration of extracted DNA was spectrophotometrically estimated using a DU 650 spectrophotometer (Beckman Instruments Inc.).

Polymerase Chain Reaction and Gel Electrophoresis

Primers of three microsatellite loci of *P. monodon* used in the present study were developed in our laboratory: the loci *CUPmo18* (Tassanakajon et al., 1998b) and *CSCUPmo1* and *CSCUPmo2* (Pongsomboon et al., 2000). Primers of the two loci *Di25* and *Di27* (Brooker et al., 2000) were kindly provided by Dr. F. Bonhomme, Laboratoire Genome et Populations, Universite de Montpellier, France. Polymerase chain reaction (PCR) conditions were optimized for each microsatellite primer pair. The amplifications of *CUPmo18*, *CSCUPmo1*, and *CSCUPmo2* were as described by Tassanakajon et al. (1998b). Amplifications of *Di25* and *Di27* were performed using a touchdown PCR. The reaction mixture

Figure 1. Map of Thailand showing sampling sites for five geographic samples of *Penaeus monodon* used in this study.

was denatured at 94°C for 4 minutes followed by nine cycles at 94°C for 1 minute, annealing at the respective temperatures for 1 minute, and extension at 72°C for 1 minute. The annealing temperature (65°C for *Di25*, 54°C for *Di27*) was gradually decreased by 2°C for every three cycles. Finally, PCR was performed for 20 cycles of 94°C for 30 seconds, annealing (initial annealing temperature, 6°C) for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. Amplification was conducted in a 10-μl reaction volume containing 0.45 μM of the forward primer, 0.38 μM of the reverse primer, 0.067 μM of the [γ^{32}-P]ATP labeled reverse primer, 20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ 200 μM each of the four dNTPs, 15 ng of DNA template, and 0.75 U of *Taq* polymerase.

PCR products were electrophoretically separated on 8% denaturing polyacrylamide gels and visualized by autoradiography (Maniatis et al., 1982). The sizes of alleles were estimated by reference to an M13 sequence ladder. A number of individuals exhibiting known homozygous allele sizes were included in other gels to ensure that the estimated allele sizes were consistent among the gels.

Data Analysis

The effective number of alleles at each locus (Crow and Kimura, 1965) and observed and expected heterozygosity (Nei, 1987) were calculated. Allele frequencies at each locus of *P. monodon* from all geographic locations were analyzed against Hardy-Weinberg equilibrium using Fisher's exact test implemented in GENEPOP (Raymond and Rousset, 1995). Geographic heterogeneity in the distribution of allele frequencies among compared samples was determined with the Markov chain approach using χ^2 probability values (Gua and Thompson, 1992). The probability of F_{ST} of pairs of samples (Weir and Cockerham, 1984) being significantly different from 0 was determined using GENEPOP. Critically significant levels for the tests were adjusted using a sequential Bonferroni approach (Rice, 1989)

The genetic distance between geographic samples was based on the Cavalli-Sforza and Edwards (1967) chord distance because for microsatellites it is among the best genetic distance measures to recover the true tree topology (Takezaki and Nei, 1996). Allele frequencies were bootstrapped 1000 times using SEQBOOT. The resulting data were used to calculate the Cavalli-Sforza and Edwards distance using GENDIST. A neighbor-joining tree (Saitou and Nei, 1987) was constructed to illustrate the relations among geographic samples using NEIGHBOR and CONSENSE. All phylogenetic programs described were routinely implemented in PHYLIP (J. Felsenstein, University of Washington, Seattle, 1993)

Results

Genetic Diversity Within Samples and Hardy-Weinberg Equilibrium

Genetic variations of *P. mondon* from five geographic locations were investigated at five microsatellite loci. The number of alleles, size range, and heterozygosity for each microsatellite locus are shown in Table 1. All five loci were highly polymorphic and exhibited a high number of alleles per locus. Genetic variability within the five locations at the five loci is shown in Table 2. The mean numbers of alleles per locus were comparable in all geographic samples, but

Table 1. Microsatellite Polymorphism in Five Geographical Samples of *Penaeus monodon* in Thailand

Sample locus	Satun	Trang	Phangnga	Chumphon	Trad
CUPmo18					
*N**	32	35	30	42	39
Size range (bp)	106–162	104–172	106–160	104–168	106–144
No. of alleles	23	24	21	28	20
Heterozygosity†	0.56	0.49	0.77	0.83	0.77
Di25					
*N**	36	35	28	37	48
Size range (bp)	140–208	140–208	136–208	142–202	140–188
No. of alleles	24	23	19	23	20
Heterozygosity†	0.78	0.77	0.61	0.70	0.69
Di27					
*N**	32	38	25	49	40
Size range (bp)	114–174	122–176	122–178	118–172	124–178
No. of alleles	20	25	20	28	28
Heterozygosity†	0.75	0.71	0.80	0.84	0.95
CSCUPmo1					
*N**	32	35	31	38	51
Size range (bp)	221–338	236–332	236–314	218–326	224–326
No. of alleles	25	27	23	30	28
Heterozygosity†	1.00	0.71	0.90	0.82	0.75
CSCUPmo2					
*N**	31	34	31	36	51
Size range (bp)	143–217	147–219	147–221	147–217	137–217
No. of alleles	18	20	22	24	28
Heterozygosity†	0.84	0.85	0.81	0.89	0.78

*Sample size.
†Observed heterozygosity.

the Gulf of Thailand *P. monodon* (Chumphon and Trad) showed more alleles than did the Andaman *P. monodon* (Satun, Trang, and Phangnga). The effective number of alleles within each sample varied considerably, from 13.1 in Satun to 20.4 in Chumphon (Table 2). In all samples the observed heterozygosity was relatively high and not significantly different (0.71–0.82).

In 19 of 25 possible tests, significant deviation from the Hardy-Weinberg expectation was observed following correction for multiple tests using the sequential Bonferroni procedure ($P < .001$). All of these exhibited an excess of homozygotes.

Table 2. Genetic Variability Among Samples at Five Microsatellite Loci

Sample	Mean no. of alleles	Effective no. of alleles	Mean heterozygosity: Observed (H_o)	Mean heterozygosity: Expected (H_e)
Satun	22.0	13.1	0.79	0.94
Trang	23.8	16.4	0.71	0.95
Phangnga	21.0	14.3	0.78	0.95
Chumphon	26.6	20.4	0.82	0.95
Trad	24.8	15.9	0.79	0.94

Genetic Distances and Phylogenetic Relations

Allelic frequencies at five microsatellite loci in each pair of geographic samples were used to calculate the genetic distance between samples. A low level of genetic differences was observed between pairs of *P. monodon* samples in Thailand. The greatest genetic distance was observed between Trad and Satun ($d = 0.030$), whereas the shortest distance was between Satun and Trang ($d = 0.024$).

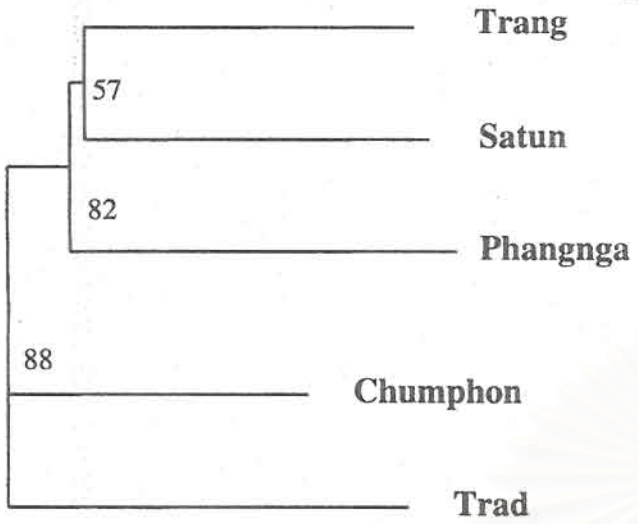


Figure 2. A neighbor-joining tree illustrating relations between five geographic samples of *Penaeus monodon* in Thailand based on the Cavalli-Sforza and Edwards chord distance. Values at the node represent the percentage of times that the particular node occurred in 1000 trees generated by bootstrapping the original allele frequencies.

A neighbor-joining tree showed close clustering of Satun, Trang, and Phangnga at the Andaman Sea, indicating their genetically close relations, whereas Chumphon and Trad at the Gulf of Thailand should be regarded as different populations (Figure 2).

Geographic Heterogeneity and Population Differentiation

Heterogeneity analysis of allele frequencies among samples is shown in Table 3. Three microsatellite loci (*Di27, CSCUPmo1,* and *CSCUPmo2*) did not show any significant differences in the distribution of allele frequencies in all possible pairwise comparisons ($P > .002$). At the remaining loci (*CUPmo18* and *Di25*), we detected significant genetic heterogeneity of the investigated *P. monodon* samples. Whereas the *P. monodon* from the three Andaman Sea locations were not genetically different, geographic heterogeneity between *P. monodon* from the two Gulf of Thailand locations, Trad and Chumphon, was observed at both loci ($P < .001$). Comparison between regions indicated statistically significant differences between each of the Andaman *P. monodon* samples and Trad ($P < .001$) but no significant differences when each of those was compared with Chumphon (Table 3).

Genetic population subdivisions among *P. monodon* samples were detected by F_{ST} estimate, but the corresponding value for each pairwise comparison averaging the overall loci was usually below 0.01. Comparisons between the Andaman and Trad *P. monodon* revealed significant differences at both *CUPmo18* and *Di25*, suggesting some degree of genetic differentiation between samples ($P < .001$). Lack of significant genetic differentiation between the Andaman and Chumphon *P. monodon* was also found consistently with this estimate (Table 4).

Discussion

Information on genetic variation and population differentiation of *P. monodon* is crucial for appropriate conservation and management of this species. Analysis of genetic diversity of *P. monodon* from the Southeast Asian areas using allozyme markers has revealed a low level of genetic differentiation (Sodsuk, 1996). Using microsatellite markers, high levels of genetic diversity were observed in five different geographic samples of *P. monodon* in Thailand. The average observed heterozygosity of 0.78 in *P. monodon* was still lower than that of wild *P. vannamei* collected from Salinas (Ecuador) when analyzed with the *M1* locus (H_o = 1.0). Conversely, the average effective number of alleles of *P. monodon* in this study was slightly higher than that of the Ecuadorian *P. vannamei,* implying similarly high levels of diversity of allele frequencies in these two species (Wolfus et al., 1997). Moreover, the lack of drastic reduction of the mean number of alleles and heterozygosity in any sample examined indicated no recent bottlenecks in these *P. monodon* samples.

Highly significant deviations from Hardy-Weinberg expectations due to homozygote excess were found in almost all geographic samples at all five microsatellite loci. A similar phenomenon has been reported in other aquatic organisms including the whiting *Merlangius merlangius* (Rico et al., 1997), the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* (Stoner et al., 1997), and the turbot *Scophthalmus maximus* (Coughlan et al., 1998). Mendelian segregation was confirmed at all five loci using pedigree samples ($P > .05$, data not shown). The results showed the absence of nonamplifying (null) alleles at these loci.

Misscoring of microsatellite alleles due mainly to interference of stutter bands may also account for the deviation from Hardy-Weinberg expectations for the investigated samples (O'Reilly and Wright, 1995), but the alleles were determined on the basis of highest intensity, and therefore,

Table 3. Geographic Heterogeneity Analysis for Pairwise Comparisons of Microsatellite Allele Frequencies of *Penaeus monodon*

	Probability values				
Pairwise comparison	*CU* Pmo18	*Di25*	*Di27*	*CSCU Pmo1*	*CSUS Pmo2*
Satun–Trang	.060*	.200*	.030*	.160*	.436*
Satun–Phangnga	.248*	.037*	.034*	.415*	.247*
Satun–Chumphon	.143*	.180*	.212*	.128*	.012*
Satun–Trad	<.001	<.001	.031*	.314*	.910*
Trang–Phangnga	.004*	.169*	.368*	.313*	.155*
Trang–Chumphon	.003*	.015*	.407*	.279*	.268*
Trang–Trad	<.001	.001	.154*	.070*	.793*
Phangnga–Chumphon	.084*	.004*	.186*	.260*	.062*
Phangnga–Trad	<.001	.008*	.573*	.160*	.629*
Chumphon–Trad	<.001	.001	.249*	.646*	.029*
Andaman Sea–Chumphon	.042*	.021*	.040*	.014*	.280*
Andaman Sea–Trad	<.001	<.001	.054*	.014*	.280*

*Not significant after adjusting; P value > .002.

Table 4. Pairwise F_{ST} Estimates Among Five Geographic Samples of *Penaeus monodon* Based on Five Microsatellite Loci

	Satun	Trang	Phangnga	Chumphon	Trad
Satun	—				
Trang	.0012*	—			
Phangnga	.0011*	.0012*	—		
Chumphon	.0044*	.0043*	.0039*	—	
Trad	.0124†	.0102*	.0089*	.0118†	—
The Andaman Sea–Chumphon		.0035*			
The Andaman Sea–Trad		.0101			

*Not significant.
†Significant at the probability level adjusted for multiple tests using sequential Bonferroni procedure.

accurate scoring and genotype assignation should not interfere to a large extent. Also, each geographic sample may contain a mixture of adults from separate breeding stocks as a result of extensive transplantation of *P. monodon* larvae in Thailand annually (Sodsuk, 1996) Each wild *P. monodon* breeding female may spawn more than once a year and produce 248,000 to 811,000 eggs per spawning (Motoh, 1981), and this enormous number of eggs may be sufficient to replace part of the entire adult population (Primavera, 1988).

In *P. vannamei,* the total lifetime nauplii production of 74 breeding females was examined. Approximately 50% of live nauplii were generated by only seven families. The female offspring of the two most productive females produced approximately four times the live nauplii as that of randomly chosen females (Wyban and Bentzen, 1991). The variance of family size resulting from reproductive success of *P. monodon* may be large (Klinbunga, 1996). Hedgecock (1994) proposed that sweepstake recruitment might lead to family effects causing Hardy-Weinberg disequilibrium among marine organisms. Nonetheless, on the basis of these data, it is not possible to unambiguously conclude which explanation for homozygote excess among *P. monodon* is correct.

Genetic relations inferred from the bootstrapped neighbor-joining tree showed differentiation between the

Andaman and Trad *P. monodon*. Chumphon proved genetically more closely related to Andaman than to Trad, the geographically closer region. Analysis of the genetic relations of *P. monodon* from the same geographic locations using RAPD analysis of three polymorphic primers. UBC268, UBC273, and UBC299, indicated a similar phenomenon (P. Menasaveta et al., personal communication).

Three microsatellite loci (*Di27*, *CSCUPmo1*, and *CSCUPmo2*) did not reveal any significant genetic heterogeneity in all possible comparisons after the probability level was adjusted by the sequential Bonferroni procedure (Rice, 1989). In contrast, *CUPmo18* and *Di25* indicated that the Andaman Sea and Trad *P. monodon* were genetically different) as were Trad and Chumphon ($P < .001$), whereas Andaman Sea and Chumphon *P. monodon* were genetically similar. This suggested that these *P. monodon* samples were not a large panmictic population but, rather, had been dispersed to different gene pools, indicating the existence of intraspecific population structures of *P. monodon*. The results of this study were in agreement with our results based on the RAPD approach for the same set of *P. monodon* specimens, confirming that intraspecific differentiation of five geographic *P. monodon* samples in Thailand did not originate from artifacts or accidents due to sampling errors (Tassanakajon et al., 1998a).

Strong genetic differentiation between different regions of *P. monodon* (Satun from the west and Surat and Trad from the east coasts) has previously been reported using RFLP of the mtDNA digested with 11 restriction endonucleases (*Ava*II, *Bam*HI, *Bgl*II, *Cla*I, *Dra*I, *Eco*RV, *Hind*III, *Pvu*II, *Sac*I, *Sca*I, and *Xba*I). In contrast to the results of the present study, allele distribution frequencies among the east coast samples (Surat and Trad) were not statistically significant ($P > .05$). These three samples were allocated to two separate populations; the Andaman Sea (Satun) and the Gulf of Thailand (Surat and Trad) (Klinbunga et al., 1999).

Considering population-specific alleles, a number of microsatellite alleles found in the Andaman sample were not available in Trad, but some of those existed in Chumphon. The failure to detect significant allele distribution frequencies between Chumphon and each of the west coast samples might have resulted from mixing of the gene pools of different *P. monodon* stocks as a consequence of extensive transplantation of *P. monodon* in Thailand (Sodsuk, 1996). Collection of more *P. monodon* samples from farther south of the Thai-Malaysian Peninsula and increasing the microsatellite loci may clarify the differentiation patterns of *P. monodon* in these areas.

Low degrees of population differentiation were observed in this species. A high level of gene flow during planktonic larval stages of *P. monodon* may be responsible for this limited differentiation. Notably, the present population differentiation of *P. monodon* may be underestimated as it results from both unintentional transplantation and restocking programs of this species in Thailand. On the basis of the present study, five *P. monodon* samples could be allocated to three different populations: A (the Andaman Sea), B (Chumphon), and C (Trad). More importantly, further screening of wild *P. monodon* covering a larger geographic scale (e.g., Southeast Asia) should be undertaken to elucidate the patterns of intraspecific genetic structure in this species at macrogeographic scales. Although a limited level of subdivision has been observed, three isolated *P. monodon* populations should, from the management point of view, be treated as separately exploited stocks (Carvalho and Hauser, 1994).

Acknowledgments

The authors thank Ms. Petra Hirsch for editing the manuscript. This work was supported by a grant from The Thailand Research Fund (BRG9/2541) to A. Tassanakajon. Student fellowships granted to P. Supungul by the Biodiversity Research and Training Program (BRT 540049) and to P. Sootanan by Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST) are also acknowledged.

References

Bailey-Brook, J.H., and Mass, S.M. (1992). Penaeid taxonomy, biology and zoogeography. In: *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*, Fast, W.A., and Lester, L.J. (eds.). Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 9–23.

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.

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.

Bouchon, D., Souty-Grosset, C., and Raimond, R. (1994). Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *P. japonicus* Bate. *Aquaculture* 127:131–144.

Brooker, A.L., Benzie, J.A.H., Blair, D., and Versini, J.J. (2000). Population structure of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Australian waters using microsatellite markers. *Mar Biol* 136:149–157.

Carvalho, G.R., and Hauser, L. (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev Fish Biol Fisheries* 4:326–350.

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

Coughlan, J.P., Imsland, A.K., Galvin, P.T., Fitzgerland, R.D., Naevdal, G., and Cross, T.F. (1998). Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study. *J Fish Biol* 52:916–922.

Crow, J.F., and Kimura, M. (1965). Evolution in sexual and asexual populations. *Am Nat* 99:439–450.

Guo, S.W., and Thompson, E.A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion of multiple alleles. *Biometrics* 48: 361–372.

Hedgecock, D. (1994). Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In: *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*, Beaumont, A.R. (ed.). London: Chapman and Hall, 122–134.

Jarayabhand, P., Uraiwan, S., Klinbunga, S., Tassanakajon, A., Srimukda, P., Pattanachan, P., Panakulchaiwit, R., and Menasveta, P. (1998). Estimated heritability for early growth rate of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, Fabricius. In: *Advances in Shrimp Biotechnology*, Flegel, T.W. (ed.). Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 67–70.

Klinbunga, S. (1996). *Genetic variation and population structure of the giant tiger shrimp (Penaeus monodon Fabricius)*. Ph.D. thesis, University of Stirling, Scotland.

Klinbunga, S., Penman, D.J., McAndrew, B.J., and Tassanakajon, A. (1999). Mitochondrial DNA diversity in three populations of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mar Biotechnol* 1:113–121.

Lin, C.K., and Nash, G.L. (1996). *Asian Shrimp News, Collected Volume, 1989–1995*. Bangkok: Asian Shrimp Culture Council.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Habor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.

McConnell, S.K., O'Reilly, P., Hamilton, L., Wright, J., and Bentzen, P. (1995). Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo solar*): genetic differentiation of north American and European populations. *Can J Fish Aquat Sci* 52:1863–1872.

Motoh, H. (1981). Studies on the Fisheries Biology of the Giant Tiger Prawn, *Penaeus monodon* in the Philippines. Technical paper no. 7. Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Department Center.

Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.

O'Reilly, P., and Wright, J.M. (1995). The evolving technology DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *J Fish Biol* 47(suppl A):29–55.

Pongsomboon, S., Whan, V, Moore, S.S., and Tassanakajon, A., (2000). Characterization of tri-and tetranucleotide microsatellites in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Sci Asia* (in press).

Primavera, J.H. (1988). Maturation, reproduction, and broodstock technology. In: *Biology and Culture of Penaeus monodon*. Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asia Fisheries Development Center, 37–57.

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

Rice, W.R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 41:223–235.

Rico, C., Ibrahim, K.M., Rico, I., and Hewitt, G.M. (1997). Stock composition in North Atlantic populations of whiting using microsatellite markers. *J Fish Biol* 51:462–475.

Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425.

Sodsuk, S. (1996). Genetic Population Structure of *Penaeus monodon* Fabricius using Allozyme and Mitochondrial DNA Analysis. Ph.D. thesis. University of Stirling, Scotland.

Stoner, D.S., Quattro, J.M., and Weissman, I. (1997). Highly polymorphic microsatellite loci in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 6:163–171.

Takezaki, N., and Nei, M. (1996). Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144:389–399.

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 Biotechnol* 6:110–115.

Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Jarayabhand, P., Klinbunga,

S., and Boonsaeng, V. (1998a). Genetic structure in wild populations of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Mar Biotechnol* 6:249–254.

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

Weir, B.S., and Cockerham, C.C. (1984). Estimation *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370.

Wolfus, G.M., Garcia, D.K., and Alcivar-Warren, A. (1997). Applications of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 153:35–47.

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

Wyban, J.M., and Bentzen, P. (1991). *Intensive Shrimp Production Technology*. Honululu: The Oceanic Institute, 34–37.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย