ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*, Fabricius ในประเทศไทย

นางสาววรรณลักษณ์ วุทธิจินดา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-384-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC DIVERSITY OF BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon*, Fabricius IN THAILAND

MISS WANALUX WUDTHIJINDA

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-332-384-8

17 ก.ค. 2545

Thesis Title	**Genetic diversity of Black Tiger Prawn *Penaeus monodon*, Fabricius in Thailand**
By	**Miss Wannalux Wudthijinda**
Program	**Biotechnology**
Thesis Advisor	**Assoc.Prof. Padermsak jarayabhand, Ph.D**
Thesis Co-advisor	**Assoc. Prof. Anchalee Tassanakajon, Ph.D**

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the Master Degree

.....Dean of Graduate School
(Prof. Supawat Chutivongse,M.D.)

Thesis Committee

.....Chairman
(Asst.Prof. Vichien Rimphanitchayakit,Ph.D)

.....Thesis Advisor
(Assoc. Prof. Padermsak Jarayabhand,Ph.D)

.....Thesis Co-advisor
(Assoc. Prof. Anchalee Tassanakajon,Ph.D)

.....Member
(Sirawut Klinbunga, Ph.D)

วรรณลักษณ์ วุทธิจินดา : ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*, Fabricius ในประเทศไทย (Genetic diversity of *Penaus monodon*, Fabricius in Thailand) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. อัญชลี ทัศนาขจร, 96 หน้า. ISBN 974-332-384-8.

จากการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรกุ้งกุลาดำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 5 แหล่งของประเทศไทย ประกอบด้วยประชากรจากทะเลอันดามัน 3 แหล่งคือ จังหวัด สตูล, ตรัง และพังงา และจากอ่าวไทย 2 แหล่งคือ จังหวัด ชุมพร และ ตราด ด้วยเทคนิค RAPD-PCR โดยเลือกใช้ 3 ไพรเมอร์ คือ UBC268, UBC273 และ UBC299 ได้รูปแบบของดีเอ็นเอจำนวน 30, 32 และ 26 รูปแบบตามลำดับ โดยกลุ่มประชากรตราดมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากประชากรกลุ่มอื่น จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากทั้ง 3 ไพรเมอร์ มี 53 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 200 - 600 คู่เบส นอกจากนี้ยังพบว่าไพรเมอร์ UBC268 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 260 คู่เบส ที่พบเฉพาะในกุ้งตราดเกือบทั้งหมด (90.9%) และพบบางตัวในชุมพร (8%) แต่ไม่พบในกุ้งประชากรอันดามัน

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลหาค่า similarity index ภายในและระหว่างกลุ่มประชากรรวมทั้งค่าเฉลี่ยของ genetic distance ที่ได้จาก 3 ไพรเมอร์ และนำมาสร้างความสัมพันธ์ในเชิงแผนภูมิ โดยวิธี UPGMA สามารถแยกประชากรกุ้งกุลาดำของไทยออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ตราด และ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ชุมพร, พังงา, ตรัง และสตูล การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำด้วยการทดสอบไคสแควร์ โดย Monte Carlo simulation พบว่ากลุ่มประชากรจากอันดามันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มประชากรจากอ่าวไทย ($P< 0.0001$) และภายในกลุ่มประชากรจากอ่าวไทย คือ กุ้งกุลาดำจากจังหวัดชุมพรและตราดยังมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.0001$) เพราะฉะนั้นจากการวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ไคสแควร์สามารถแบ่งกลุ่มกุ้งกุลาดำได้ 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ตราด, กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สตูล, ตรัง, พังงา และกลุ่มที่ 3 ชุมพร

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C827307 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: *P. monodon* / RAPD / genetic variation / population structure

WANNALUX WUDTHIJINDA : GENETIC DIVERSITY OF BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon*, Fabricius IN THAILAND. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PADERMSAK JARAYABHAND, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. ANCHALEE TASSANAKAJON, Ph.D., 96 p. ISBN 974-332-384-8.

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to examine genetic population structure of *Penaeus monodon* in Thailand using three primers (UBC268, UBC273 and UBC299). Five geographic samples ; Satun, Trang and Phangnga located in the Andaman Sea and Chumphon and Trat located in the Gulf of Thailand were collected. A total of 53 RAPD fragments ranging from 200-1600 bp in size were scored. Eighty-eight RAPD patterns were observed for overall samples (30, 32 and 26 patterns from UBC268, UBC273 and UBC299, respectively). Considering private haplotypes and distribution frequencies, *P. monodon* from Trat were genetically different from the remaining samples. The primer UBC268 generated a fragment of 260 bp in lengh found in almost all of Trat (90.2%) and Chumphon specimens (8%) but completely disappeared in those from the Andaman Sea (Satun, Trang and Phangnga).

Dendrograms constructed using unweight pair-group method with arithmetic average (UPGMA) allocated 5 geographic *P. monodon* samples to two genetically isolated groups constituting of Trat and Satun, Trang, Phungnga and Chumphon. Geographic heterogeneity analysis using pseudo chi-square test based on Monte Carlo simulation, indicated highly significant genetic differences of *P. monodon* between the Andaman Sea and the Gulf of Thailand ($P < 0.0001$). Within the population in the Gulf of Thailand, Chumphon and Trat, there was also significant genetic differences ($P \leq 0.0001$). Five geographic samples of *P. monodon* could be regarded to be 3 separated stocks ; A (Trat), B (the Andaman Sea) and C (Chumphon).

ภาควิชา BIOTECHNOLOGY ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา BIOTECHNOLOGY ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

AKNOWLEDGMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Padermsak Jarayabhand for his guidance, supervision, encouragement and supports throughout my study and I am very grateful to my co-advisor, Asscoc. Prof. Dr. Anchalee Tassanakajon for her great helps, guidances and suggestions in my thesis.

This thesis would not have been completed without a good helpful from Dr. Sirawut Klinbunga, I would like to express my very appreciation to him for guidance, suggestions in laboratory, data computerized analysis, comments on my thesis and supports throughout my study. I am also very thankful to Asst. Prof. Dr. Vichien Rimphanitchayakit for his recommendation. The special thanks to Miss Siriporn Pongsomboon, Miss Premruethai Supungul and Miss Putchanee Hunsonti for their good helpful in laboratory techniques and friendly to me. Thanks are also extended to Mr. Shorudja Ninubon and his friends in helping my collection of shrimp samples. The special thanks to member of laboratory at Marine Biotechnology Research Unit (MBRU) and Biochemistry in R707 and R708 for collboration and kindness and thanks to member of Veterinary Medical Aquatic Animals Research Center (VMARC), Chulalongkorn University for understanding and care thougout my study.

I wish to acknowledge to contributions of the National center for Genetic Engineering and Biotechnology (BT-39-06-ATI-06-05) to Assoc. Prof. Dr. Padermsak Jarayabhand for financial support for all laboratory equipments and chemicals, and TRF Senior Research Scholar (Prof. Dr. Piamsak Menasveta), the Thailand Research Fund for an additional finance.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my mother, father and members of my family; Mr. Sutthisan and Sirada Thansuwanwong for their love, care and understanding extended throughout my study.

CONTENTS

	Page
Thai abstract	iv
English abstract	v
Acknowledgements	vi
Contents	vii
List of tables	ix
List of figures	xi
List of abbreviations	xii
Chapter I Introduction	1
1.1 Biology of *Penaeus monodon*	2
1.2 Distribution	10
1.3 Genetic diversity of *P. monodon* : a basic discipline for fisheries management	11
1.4 Molecular genetic markers as tools for genetic diversity studies	13
1.5 Objectives	21
Chapter II Materials and Methods	22
2.1 Equipments	22
2.2 Chemicals	23
2.3 Enzyme	24
2.4 Oligonucleotide primers	24
2.5 Sampling	24
2.6 DNA extraction	26
2.7 Determination of DNA concentration	27
2.8 Screening of primers used in this study	28
2.9 RAPD method	29
2.10 Agarose gel electrophoresis analysis	29

2.11 Statistical procedures for determination of genetic variation by RAPD analysis 30

Chapter III Results..... 33

3.1 DNA extraction..... 33

3.2 Determination of genetic variation in wild population of *P. monodon* using RAPD analysis 35

3.3 Genetic similarities, distances and differentiation in Thai *P. monodon*..... 52

Chapter IV Discussion..... 62

Chapter V Conclusions..... 73

References..... 74

Appendices..... 81

Biography..... 96

LIST OF TABLES

Table **Page**

1.1 Shrimp production from ocean capture, pond culture and culture areas in Thailand..... 4

1.2 Exported quantity of fresh and frozen shrimp (*P. monodon*) from Thailand since 1987-1997..... 5

1.3 Imported quantity of fresh and frozen shrimp from Thailand separated by country since 1992-1995 (in metric tons) 6

1.4 Imported quantity of fresh and frozen shrimp from Thailand separated by country since 1996-1997 (in metric tons) 6

1.5 Quantity of shrimp exported from various countries to USA and Japan in 1997 (in metric tons) 7

3.1 Nucleotide sequences, number of scored bands and size ranges of fragment (bp) resulted from primers UBC268, UBC273 and UBC299 observe overall samples..... 37

3.2 Total number of bands, percentage of polymorphic and monomorphic bands within a geographic sample observed when *P. monodon* from 5 conspecific samples were analyzed by the primer UBC 268..... 39

3.3 Total number of bands, percentage of polymorphic and monomorphic bands within a geographic sample observed when *P. monodon* from 5 conspecific samples were analyzed by the primer UBC 273 43

3.4 Total number of bands, percentage of polymorphic and monomorphic bands within a geographic sample observed when *P. monodon* from 5 conspecific samples were analyzed by the primer UBC 299..... 47

3.5 Geographic distributions of RAPD genotypes in 5 geographic samples of wild *P. monodon* in Thailand..... 50

3.6 Estimated similarity (S) within each of 5 geographic samples of wild *P. monodon*..... 54

3.7 Estimated similarity (S_{ij}) between each of 5 geographic samples of wild *P. monodon*..... 55

3.8 The average genetic distances (below diagonal) and genetic similarities with a correction of within sample similarity effects (above diagonal) of all primers between 5 geoghaphic samples of wild *P. monodon*..... 55

3.9 Analysis of geographic heterogeneity in genotype frequency distribution generated from RAPD patterns of wild *P. monodon* using a Monte Carlo simulation..... 61

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1.1 Lateral view showing important part of *P. monodon* 8

1.2 Life cycle of penaeid shrimps..... 9

1.3 Geographic distribution of *P. monodon* 10

2.1 Map of Thailand illustrating sample collection sites..... 25

3.1 Ethidium bromide staining of a 0.8 % agarose gel showing DNA extracted from pleopods of *P. monodon*..... 34

3.2 Examples of RAPD patterns using the primer UBC268.....40

3.3 RAPD patterns generated from the primer UBC268.....41

3.4 Examples of RAPD patterns using the primer UBC273..... 44

3.5 RAPD patterns generated from the primer UBC273 45

3.6 Examples of RAPD patterns using the primer UBC299.....48

3.7 RAPD patterns generated from the primer UBC299 49

3.8 UPGMA dendrogram showing relationships among the 5 geographic samples of wild *P. monodon* based on genetic distance of the primers UBC268 ..56

3.9 UPGMA dendrogram showing relationships among the 5 geographic samples of wild *P. monodon* based on genetic distance of the primers UBC273.. 57

3.10 UPGMA dendrogram showing relationships among the 5 geographic samples of wild *P. monodon* based on genetic distance of the primers UBC299.. 58

3.11 UPGMA dendrogram showing relationships among the 5 geographic samples of wild *P. monodon* based on genetic distance of the average over-all primers.....59

LIST OF ABBREVIATIONS

A, T, G, C	=	Nucleotides containing the bases adenine, thymine, guanine, and cytosine, respectively
bp	=	Base pair
°C	=	Degree celsius
cm	=	Centimetre
dATP	=	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	Deoxycytosine triphosphate
dGTP	=	Deoxyguanosine triphosphate
dTTP	=	Deoxythymidine triphosphate
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EDTA	=	Ethylene diamine tetracetic acid (disodium salt)
EtBr	=	Ethidium bromide
Fig	=	Figure
HCl	=	Hydrochloric acid
kb	=	Kilobase pair
$MgCl_2$	=	Magnesium chloride
min	=	Minute
ml	=	Millititre (10^{-3} litre)
mM	=	Millimolar
Mt	=	Metric tons
mg	=	Milligram
mtDNA	=	Mitochondrial DNA
ng	=	Nanogram
OD	=	Optical density
PCR	=	Polymerase chain reaction
RAPD	=	Randomly amplified polymorphic DNA

RFLP	=	Restriction fragment length polymorphism
RNase A	=	Ribonuclease A
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
sec	=	Second
TE	=	Tris- EDTA
Tris	=	Tris (hydroxy methyl) aminomethane
V	=	Volt
W	=	Watt
UV	=	Ultraviolet
µg	=	Microgram
µl	=	Microlitre
µM	=	Micromolar