การตรวจหาความแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นางสาว สิริพร พงษ์สมบูรณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-763-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17150735

DETECTION OF GENETIC VARIATION IN POPULATIONS OF BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon* BY DNA FINGERPRINTING

Miss Siriporn Pongsomboon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-636-763-3

Thesis Title	Detection of Genetic Variation in Populations of Black Tiger Prawn *Penaeus monodon* by DNA Fingerprinting
By	Miss Siriporn Pongsomboon
Department	Biotechnology
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Anchalee Tassanakajon, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Asst. Prof. Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree/

..... Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

..... Chairman

(Assoc. Prof. Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Assoc. Prof. Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

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

..... Member

(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

สิริพร พงษ์สมบูรณ์ : การตรวจหาความแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DETECTION OF GENETIC VARIATION IN POPULATIONS OF BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon* BY DNA FINGERPRINTING) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. อัญชลี ทัศนาขจร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ, 128 หน้า. ISBN 974-636-763-3.

ในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรม ของกลุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำในแหล่งน้ำธรรมชาติ ด้วยเทคนิค RAPD-PCR ได้ทำการตรวจสอบระหว่างกลุ่มตัวอย่างจากทะเลอันดามันและอ่าวไทย กลุ่มตัวอย่างจากทะเลอันดามัน ทำการเก็บจากจังหวัด สตูล, ตรัง และ เมดาน (ประเทศอินโดนีเซีย) กลุ่มตัวอย่างจากอ่าวไทยทำการเก็บจากจังหวัดชลบุรี (ต. อ่างศิลา) และ ตราด

จากการคัดเลือกไพรเมอร์ซึ่งมีขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 300 ไพรเมอร์ ได้คัดเลือกไพรเมอร์ 7 ตัว นำไปใช้ในการตรวจสอบความแปรผันของดีเอ็นเอ จากตัวอย่างกุ้งกุลาดำทั้งสิ้น 75 ตัว แบ่งเป็นกุ้งจากสตูล-ตรัง 17 ตัว, ตราด 28 ตัว, อ่างศิลา 15 ตัว และ เมดาน 15 ตัว พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ ทั้ง 7 ตัว รวม 80 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 200-2000 คู่เบส เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอ พบว่าเป็น 57.7, 52.2, 45.6 และ 53.4% ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการคำนวณค่าทางสถิติ ได้แก่ similarity index ภายในและระหว่างกลุ่มประชากร, genetic distance และ การทดสอบไคสแคว์ นอกจากนี้นำค่า genetic distance มาสร้าง dendrogram จากค่า similarity index ภายในกลุ่มประชากร และ เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่า จากกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม กลุ่มตัวอย่างจากอ่างศิลา มีความแปรผันทางพันธุกรรมน้อยสุด ค่า similarity index ระหว่างกลุ่มประชากร และ dendrogram แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างกุ้งกุลาดำจากเมดาน มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากตัวอย่างกุ้งจากประเทศไทย ทั้ง 3 กลุ่ม นอกจากนี้ยังพบว่า ไพรเมอร์ 428 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 950 คู่เบส ที่พบเฉพาะในกุ้งที่มาจากทะเลอันดามัน คือ จาก สตูล-ตรัง และเมดาน ซึ่งแถบดีเอ็นเอนี้น่าจะนำมาใช้เป็น marker ในการจำแนกกลุ่มประชากรจากฝั่งทะเลอันดามันและอ่าวไทยได้

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม มีทั้งสิ้น 214 แบบ ซึ่งพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับกลุ่มตัวอย่าง มีจำนวน 160 แบบ มีความจำเพาะกับแหล่งน้ำ จำนวน 10 แบบ จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับกลุ่มตัวอย่าง พบว่า 97 แบบ ปรากฏในตัวอย่างกุ้งเพียง 1 ตัว เท่านั้น เมื่อนำลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ มาวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ไคสแคว์ พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างจาก เมดานกับกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่มของประเทศไทย ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายด้วยทุกๆไพรเมอร์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.0001$) เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างของประเทศไทยด้วยกัน พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายด้วยไพรเมอร์ 101, 268, 428, 457, และ 459 มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างจากทะเลอันดามันกับอ่าวไทย ($P=0.0049$, $P<0.0001$, $P<0.0001$, $P=0.0014$, และ $p=0.0156$) เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ไคสแคว์ สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างจากสตูล-ตรัง ออกจาก ตราด และ อ่างศิลาได้ แสดงถึงกลุ่มตัวอย่างในประเทศไทยมีความแตกต่างกัน

ภาควิชา — ลายมือชื่อนิสิต สิริพร พงษ์สมบูรณ์

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อัญชลี ทัศนาขจร

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิเชียร ริมพณิชยกิจ

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C 727043 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: *Penaeus monodon* / RAPD / GENETIC VARIATION

SIRIPORN PONGSOMBOON : DETECTION OF GENETIC VARIATION IN POPULATIONS OF BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon* BY DNA FINGERPRINTING. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ANCHALEE TASSANAKAJON, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. VICHIEN RIMPHANITCHAYAKIT, Ph.D. 128 pp. ISBN 974-636-763-3.

Randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) was used to examine genetic variation of four geographically separated wild populations of *Penaeus monodon* from two regions: the Andaman Sea and the Gulf of Thailand. Samples from the Andaman Sea were collected from Satun-Trang and Medan (Indonesia) and samples from the Gulf of Thailand were collected from Chonburi (Angsila district) and Trad.

A total of 75 individuals were tested, which included 17, 28, 15 and 15 from Satun-Trang, Trad, Angsila and Medan respectively. A screen of 300 random decaoligonucleotide primers identified 7 primers, which were selected for the analysis of black tiger prawn DNA. A total of 80 reproducible RAPD fragments ranging in size from 200-2000 bp were scored and 62 fragments (77.5%) were polymorphic. The percentages of polymorphic bands were 57.7, 52.2, 45.6 and 53.4% for samples from Satun-Trang, Trad, Angsila and Medan respectively. The index of similarity within and between populations and genetic distances were performed based on the RAPD data. The values of genetic distance were used to construct dendrograms using arithmetic mean (UPGMA). The results of similarity index within population illustrated that the Angsila sample was the most similar among themselves. The results of similarity index between populations and UPGMA dendrograms showed that the Medan sample was significantly different from the 3 samples of Thai *P. monodon*. The results show that primer 428 detected a RAPD marker that was found only in samples from the Andaman Sea; Satun-Trang and Medan suggesting the use of this marker as a region-specific marker.

RAPD patterns among the 4 samples gave 214 genotypes. One hundred and sixty of these were population-specific genotypes and 10 were region-specific genotypes. Ninety-seven of these genotypes were represented by a single individual. In chi-square analysis of the genotypes show that Thai and Indonesian *P.monodon* were significant different for all primers ($P<0.0001$) and Thai *P.monodon* from the Andaman Sea and the Gulf of Thailand were also different for primers 101, 268, 428, 457 and 459 ($P = 0.0049$, <0.0001, <0.0001, 0.0014 and 0.0156 respectively).

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา – ลายมือชื่อนิสิต สิริพร พงษ์สมบูรณ์

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

Acknowledgement

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Anchalee Tassanakajon for her guidance, supervision, encouragement and supports throughout my study.

I am very grateful to Assistance Professor Dr. Vichien Rimphanitchayakit for his great helps, guidances, and suggestions in laboratory techniques. The special thanks are also extended to Dr. Sirawut Klinbunga for his help in data computerized analysis. Thanks are also expressed to all my friends of the Biochemistry and Biotechnology department especially in R707 and R708 for their helps in the laboratory and friendships that help me enjoy and happy through out my study. Collaboration and kindness that help me enjoy and happy throughout my study. And to Miss Somjai Wongtripop for her kind assistance in collecting shrimp samples. I wish to acknowledge to contributions of the Thailand Research Fund. for financial support for all laboratory equipments and chemicals, and the Programme for Biodiversity Research and training in Thailand for my finance.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents and members of my family for their love, care, understanding and encouragement extended throughout my study.

TABLE OF CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENT..... vi

TABLE OF CONTENTS..... vii

LIST OF TABLES..... viii

LIST OF FIGURES..... x

LIST OF ABBREVIATIONS..... xi

CHAPTER

I INTRODUCTION..... 1

II MATERIALS AND METHODS..... 28

III RESULTS..... 37

IV DISCUSSION..... 79

V CONCLUSIONS..... 90

BIBLIOGRAPHY..... 92

APPENDIX..... 99

BIOGRAPHY.....128

LIST OF TABLES

Table **Page**

1.1 World total shrimp production: 1982-1993..... 3

1.2 World cultured shrimp production 1993-1995..... 4

1.3 Exports of Thailand shrimp:1986-1995..... 4

3.1 The sequences of random primers included in the screening and amplification strength values for *P.monodon*..... 44

3.2 Nucleotide sequences of seven selected primers, number of amplified bands and range of sizes (bp) shown in the RAPD analysis in *P.monodon* 52

3.3 Total number of bands, percentage of polymorphic and monomorphic bands found in the 4 geographic samples of *P.monodon*..... 53

3.4 The number of each amplified band found in each of the 4 geographic sample of *P. monodon* 58

3.5 Estimated similarity (S) for each primer within the 4 geographic samples of *P.monodon*..... 69

3.6 Estimated similarity (S_{ij}) for each primer between the 4 geographic samples of *P.monodon*..... 69

3.7 Estimated of genetic distance for each primer between the 4 geographic samples of *P. monodon*..... 70

3.8 Geographic heterogeneity in genotype frequency distributions generated from randomly amplified polymorphic DNA patterns of *P. monodon*..... 75

3.9 Analysis of geographic heterogeneity in genotype frequency distributions generated from randomly amplified polymorphic DNA of *P. monodon* using a Monte Carlo simulation..... 78

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1.1 Lateral view of *P.monodon* showing important parts..... 6

2.1 Map of collection sites for *P.monodon* samples..... 30

3.1 Ethidium bromide staining of 0.7% agarose gel showing DNA extracted from pleopods of *P.monodon*..... 38

3.2 Optimization of PCR parameters for RAPD analysis of *P. monodon* using primer 174..... 41

3.3 RAPD patterns obtained from amplification of *P. monodon* DNA with various primers..... 43

3.4 RAPD patterns using primer 101..... 62

3.5 RAPD patterns using primer 174..... 62

3.6 RAPD patterns using primer 268..... 63

3.7 RAPD patterns using primer 428..... 63

3.8 RAPD patterns using primer 456..... 64

3.9 RAPD patterns using primer 457..... 64

3.10 RAPD patterns using primer 459..... 65

3.11 Phenograms showing relations of the 4 geographic samples of *P.monodon*, generated according to UPGMA method of cluster analysis based on distance matrix in table 3.7..... 71

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	=	base pair
°C	=	degree Celcius
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EtBr	=	ethidium bromide
Fig	=	figure
$\bar{H}$	=	mean heterozygosities
M	=	molar
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
min	=	minute
MT	=	metric ton
$MgCl_2$	=	magnesium chloride
mg	=	milligram
nm	=	nanometre
ng	=	nanogram

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

O.D.	=	optical density
PCR	=	polymerase chain reaction
RAPD	=	randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
sec	=	second
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
µM	=	micromolar

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย