การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและจำแนกชนิดพันธุ์ปลาเสือตอลายใหญ่และปลาเสือตอลายเล็ก

อภิรดี หันพงศ์กิตติกูล[1] วงศ์ปฐม กมลรัตน์[2] ยงยศ หรี่คะนอง[1] และเกียรติคุณ เจริญสวรรค์[3]

[1]สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด

[2]สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด

[3]ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสุพรรณบุรี

บทคัดย่อ

การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 10 ตำแหน่ง จากปลาเสือตอลายใหญ่ และปลาเสือตอลายเล็กซึ่งเป็นปลาหายากและใกล้สูญพันธุ์ของไทย โดยวิธี สร้างห้องสมุดจีโนมและคัดเลือกด้วย ตัวตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ ได้แก่ $(GACA)_9$, $(GATA)_9$, $(AAAT)_9$, $(GATG)_9$,$(CAA)_{14}$ $(CA)_{20}$, $(GT)_5$, $(ATT)_{14}$, $(CT)_{15}$ และ (AAG) ทำการทดสอบในตัวอย่างปลาชนิดละ 8 ตัวอย่างจากโรงเพาะฟัก พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเ อ็นเอ ทั้ง 10 ตำแหน่งที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ได้ในปลาทั้งสองชนิด ได้แก่ DP01 DP14 DP26 DP27 DP31 DU01 DU02 DU03 DU06 และ DU14 มีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งระหว่าง 1-10 อัลลิล มีค่าเฮทเทอโรไซโกซิตีระหว่าง 0.00-1.00 สามารถนำไปใช้ทั้งในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร และกา รประเมินขนาดประชากรสืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงและแหล่งน้ำธรรมชาติ นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดปลา ทั้งสองชนิด ในกรณีที่ลักษณะทางอนุกรมวิธานแยกไม่ได้

คำสำคัญ: เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ปลาเสือตอลายเล็ก ปลาเสือตอลายใหญ่ การจำแนกชนิด

*ผู้รับผิดชอบ: อาคารปรีดากรรณสูต ชั้น ๖ กรมประมง เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๐ โทร. ๐ ๒๕๕๘ ๐๑๔๘ e-mail: kunpagne@hotmail.com

Microsatellite DNA primer development of *Datnioides undecimradiatus* (Roberts & Kottelat, 1994) and *Datnioides pulcher* (Kottelat, 1998) for their applications to population genetics and species identification

Apiradee Hanpongkittikul[1*] Wongpathom Kamonrat[2]
Yongyote Reekanong[1] and Kiattikun Charoensawan[3]
[1]Inland Fisheries Resources Research and Development Institute
[2]Inland Fisheries Research and Development Bureau
[3]Suphanburi Inland Fisheries Research and Development Center

Abstract

Development of 10 polymorphic microsatellite primers from the genomic DNA libraries of Siamese Tiger Perch (*Datnioides pulcher* (Kottelat, 1998)) and *Datnioides undecimradiatus* (Roberts & Kottelat, 1994) using random clones from a small genomic library using $(GACA)_9$, $(GATA)_9$, $(AAAT)_9$, $(GATG)_9$,$(CAA)_{14}$ $(CA)_{20}$, $(GT)_5$, $(ATT)_{14}$, $(CT)_{15}$ and (AAG) probe. The potential use of these primers was analyzed on 8 sample individuals of each species obtaining from hatchery stocks. The resulted indicated the number of alleles ranged from 1 to 10 alleles/locus while heterozygosity ranged from 0.00 to 1.00. All 10 primer pairs (DP01 DP14 DP26 DP27 DP31 DU01 DU02 DU03 DU06 and DU14) were amplified the DNA of both *D. undecimradiatus* and *D. microlepis* Therefore, these markers can be used for population genetic studies and for the assessment of true effective breeding population sizes in aquaculture stocks and natural water. Furthermore, several primers exhibited size differentiation between the two speceies which can be used as alternative taxonomic tool for identifying the two species when their taxonomic characters cannot be clearly identified.

Key words: cross-species amplification, microsatellite, *Datnioides microlepis* *Datnioides undecimradiatus*, identification

*Corresponding author: Preedakanasuta building Department of Fisheries Bangkok 10900 Tel. 0 2558 0178 e-mail: kunpagne@hotmail.com

ความสำคัญและที่มา

ปลาเสือตอเป็นปลาน้ำจืดที่พบแพร่กระจายในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ไทย กัมพูชา อินโดนีเซีย เป็นต้น ในปัจจุบันประชาชนนิยมเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม ได้รับความนิยมติดอันดับ ต้นๆ ของปลาสวยงามที่นักเลี้ยงปลาให้ความสนใจ เนื่องจากมี รูปร่างและมีสีสัน สวยงาม ประกอบกับ เป็นปลาหายากและใกล้สูญพันธุ์ ทำให้มีราคาสูง ส่งผลให้ปลาเหล่านี้ ถูกจับขึ้นมาขายเป็นจำนวนมาก เป็นการเร่งให้ปริมาณปลาเสือตอในธรรมชาติลดน้อยลงกว่าในอดีต

เมื่อกล่าวถึงปลาเสือตอมักจะหมายความรวมถึงปลาในสกุล Datnoides 2 ชนิด คือ ปลาเสือตอลายใหญ่ (*D. pulcher* (Kottelat, 1998)) และปลาเสือตอลายเล็ก (*D. undecimradiatus* (Roberts & Kottelat, 1994)) ซึ่งมีความแตกต่างกันที่ปลาเสือตอลายเล็ก หัวมีส่วนลาดกว่า เกล็ดมีขนาดใหญ่กว่า และ แถบดำที่ พาดลำตัว แคบกว่าของปลาเสือตอลายใหญ่ (Vidthayanon, 2008) (ภาพที่ 1) ปลาเสือตอลายใหญ่ในประเทศไทยเคยพบชุกชุมในลุ่มน้ำเจ้าพระยาโดยเฉพาะในบึงบอระเพ็ด แต่ปัจจุบันไม่มีรายงานพบมานาน และเข้าใจว่าสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติแล้ว ส่วนปลาเสือตอลายเล็ก ในประเทศไทย พบในแม่น้ำ มูลตอนล่างและแม่น้ำ โขง พบมากที่ แถบจังหวัดหนองคายและนครพนม เนื่องจากปลาเสือตอ อยู่ในภาวะที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ กฎหมายจึงได้กำหนดให้จัดอยู่ในบัญชีสัตว์ป่าคุ้มครองชนิดที่เพาะพันธุ์ได้ ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ .ศ. 2535 และสำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมได้ขึ้นบัญชี ให้ปลาเสือตอ ลายใหญ่จัดเป็นสัตว์น้ำที่อยู่ในสถานภาพใกล้สูญพันธุ์ อย่างยิ่ง (critically endangered) และจัดปลาเสือตอลายเล็กไว้ในสถานภาพ มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (vulnerable) ตามเงื่อนไขของ IUCN Redlist of Threatened Species (version 2012.1) (Vidthayanon, 2011; Biard, 2011) ปลาเสือตอทั้ง 2 ชนิดที่พบเห็นกันอยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่มาจากการนำเข้าจากต่างประเทศเกือบทั้งหมด โดยเฉพาะจากประเทศกัมพูชา และอินโดนีเซีย

ความรู้ทางพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์น้ำมีความจำเป็นต่อการบริหารจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน โดยเฉพาะในชนิดพัน ธุ์ที่มีการแพร่กระจายจำกัดและมีวคามเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์สูง ในปัจจุบัน เครื่องหมายพันธุกรรมชนิด ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ สามารถนำมาใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ที่มีประสิทธภาพสูง และได้มีการศึกษาปลาน้ำจืดหลายชนิด เช่น ปลานิล *Oreochromis niloticus* (Lee and Kocher, 1996), ปลาดุกยักษ์ *Clarias gariepenus* (Galbusera *et al*., 1996), ปลาดุกอุย *Clarias macrocephalus* (Na-nakorn *et al*., 1999) ปลาไน *Cyprinus carpio* (Aliah *et al*., 1999), ปลากดเหลือง *Mystus nemurus* (Usmani *et al*., 2001), ปลาตะเพียนขาว *Puntius gonionotus* (Kamonrat *et al*., 2002), ปลากัด (สุดาวัลย์ และอุทัยรัตน์, 2546), *Labeo rohita* (Das *et al.,* 2005), ปลาบึก *Pangasianodon gigas* (Na-nakorn *et. al*., 2006), ปลาบู่ทราย (นภาพร และคณะ , 2551) ปลากดแก้ว *Hemibagrus wyckioides* และปลาหมอไทย *Anabas testudineus* (Kamonrat *et al*., 2010) เป็นต้น แต่ยังไม่มีการพัฒนาไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์ความผันแปรไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสำหรับปลาเสือตอลายใหญ่ และปลาเสือตอลาย เล็ก

การศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาไพรเมอร์สำหรับไมโครแซทเทลไลท์ ในปลาเสือตอลายใหญ่และลายเล็ก เพื่อการศึกษาพันธุศ าสตร์ประชากร การจำแนก ชนิดและ ประชากร และประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในธรรมชาติ และโรงเพาะฟัก การตรวจสอบพ่อแม่พันธุ์ และเป็นข้อมูลประกอบการบริหารจัดการทรัพยากรและ การอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมใน และนอกถิ่นที่อยู่อาศัย

(*in situ* and *ex-situ* conservation) วางแผนการคัดเลือก และแลกเปลี่ยนพ่อแม่พันธุ์ระหว่างโรงเพาะฟักอีกด้วย นอกจากนี้สายดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับการวิเคราะห์ชนิดพันธุ์หนึ่งอาจนำไป ประยุกต์ใช้กับชนิดพันธุ์อื่นๆ ที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกันได้ (cross-species amplification) (Kamonrat et al., 2008)

ภาพที่ 1 ภาพปลาเสือตอลายใหญ่ (*Datniodes pulcher* (Kottelat, 1998)) (ซ้าย) และปลาเสือตอลายเล็ก (*Datnioides undecimradiatus* (Roberts & Kottelat, 1994)) (ขวา)
ที่มา: http://www.arkive.org/datnioides/ และ ปรับปรุงจาก www.youfish.com

วัตถุประสงค์

พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสำหรับ การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและการจำแนกชนิดพันธุ์ในปลาเสือตอลายใหญ่และปลาเสือตอลายเล็ก

วิธีการศึกษา

พัฒนาไพรเมอร์สำหรับการศึกษาความผันแปรของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่งต่างๆ ในปลาเสือตอลาย ใหญ่ และปลาเสือตอลายเล็ก ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ สกัดดีเอ็นเอ , ตัดดีเอ็นเอ, สร้าง library, คัดเลือกโคลนที่ต้องการใช้โดยวิธี colony hybridization, หาลำดับเบส การออกแบบ primer และการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยกระบวนการพีซีอาร์

วิธีการดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างปลาเสือตอ

ตัวอย่างปลาเสือตอลายใหญ่ และตัวอย่างปลาเสือตอลายเล็ก จำนวนชนิดละ 8 ตัวอย่าง ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดชัยนาท ดำเนินการรวบรวมตัวอย่างครีบ และเก็บรักษาไว้ในเอทานอล 99.99% (absolute ethanol) บันทึกข้อมูลของตัวอย่างในระบบฐานข้อมูล

เพื่อควบคุมการเก็บฝากและสืบค้นของธนาคารเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำ สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำจนกว่าจะวิเคราะห์ตัวอย่าง

การพัฒนาไพรเมอร์

การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ คือ ออกแบบ ไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลท์ที่พบโดยวิธีสร้างห้องสมุดจีโนม (enriched-genome DNA library) ของปลาเสือตอลายใหญ่และลายเล็กชนิด ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ

1. Genomic DNA preparation เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอ จากเนื้อเยื่อปลาเสือตอลายใหญ่และลายเล็ก ชนิดละ 1 ตัวอย่าง โดยวิธี Phenol chloroform extraction ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Taggard *et al.* (1992) โดยทำการตัดแบ่งส่วนของเนื้อเยื่อปลา ตามปริมาณที่ต้องการ (ประมาณ 50 mg) บดเนื้อเยื่อให้ละเอียด นำไปใส่ใน 10 ml extraction buffer (100 mM Tris-Cl, pH 8; 250 mM NaCl; 1 % SDS และ 100 ug/ml Proteinase K บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติม buffered phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1) 10 ml แล้วค่อยๆ เขย่าให้เข้ากันเบาๆเป็นเวลาประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000× g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม chloroform/ isoamyl alcohol (24:1) 10 ml เขย่าเบาๆให้เข้ากันประมาณ 20 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000× g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นก็ดูดส่วนใสด้าน บนใส่หลอดใหม่แล้วทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้ง เติม 95 % ethanol ที่แช่เย็น 20 ml ลงไปผสมกับส่วนใสที่ได้ ตะแคงหลอดไปมา หลังจากนั้นก็ทิ้งส่วนใสไปเหลือแต่ก้อนดีเอ็นเอ (ถ้าไม่เห็นก้อนดีเอ็นเอ ให้นำหลอดดังกล่าวนี้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ - 40°C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000× g เป็นเวลา 20 นาที) ต่อมาเติม 70 % ethanol 500 ml ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000× g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งและปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งเอง จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8; 1 mM EDTA,pH 8) 500 ul และนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 50-60 °C จนดีเอ็นเอละลายหมด

2. ตัดดีเอ็นเอ (DNA fragment preparation and Adaptor ligated)

นำ Genomic DNA ประมาณ 250 ng มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ RsaI พร้อมทั้งทำปฏิกิริยาการต่อปลายดีเอ็นเอด้วย MluI-Adaptor โดยเอนไซม์ T_4 ligase แล้วทำปฏิกิริยากันที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณชิ้น DNA ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction จากนั้นนำมาหาขนาด DNA ที่ได้โดยการทำ electrophoresis ใน 1% agarose gel โดยขั้นตอนนี้จะเห็นดีเอ็นเอเป็นแถบยาวขนาดประมาณ 500 bp (200-1,200 bp)

3. Enrichment

Hybridized DNA ที่ผ่านกระบวนการในข้อ 2 โดย denature ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวมากกว่า 500 bp ออกจากเจล โดยใช้ Hybond N+ Membrane ซึ่งมี bound oligonucleotides โดย Probe ที่ใช้คัดเลือกมีทั้งหมดจำนวน 10 ชนิด คือ $(GACA)_9$, $(GATA)_9$, $(AAAT)_9$, $(GATG)_9$,$(CAA)_{14}$ $(CA)_{20}$, $(GT)_5$, $(ATT)_{14}$, $(CT)_{15}$ และ $(AAG)_{14}$ ซึ่งมีประจุบวกเป็นตัวดัก แล้วล้างด้วย 2xSSC 5 ครั้ง และ ล้างด้วย 0.5xSSC 2 ครั้ง เพื่อกำจัด DNA ส่วนที่ไม่ต้องการบางส่วนที่ติดมาทำให้ดีเอ็นเอสะอาด

4. สร้าง library (Library construction) โดยนำดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pGEM-T Easy vector (Promega) บ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นทำการ Transformation ด้วยวิธี electroporation โดยใช้ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 เป็น host แล้วเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เป็น selective media (amplicilin 100 ug/ml, IPTG 100 uM x-gal 40 ug/ml) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน

5. คัดเลือกโคลน ที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจากห้องสมุดจีโนม โดยวิธี Blue-white colony โดยเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งมีไมโ ครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอไป amplification โดยใช้ชุด TempliPhi plasmic amplification (GE Healthcare) บ่มที่ 30°C นาน 16 ชั่วโมง

6. หาลำดับเบส (Sequencing) สกัดดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสมที่คัดเลือกไว้ด้วยวิธี rapid alkaline extraction (ดัดแปลงจาก Sambrook and Russell, 2001) หาลำดับเบสจาก PCR product โดยใช้ dye terminator cycle sequencing และวิเคราะห์ผลด้วย ABI PRISM 377 DNA sequencer (Macrogen)

7. ออกแบบ primer (Primer design) ทำการเลือกสายดีเอ็นเอที่มีไ มโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอแต่ละตำแหน่งจะต้องมีจำนวนของชุดเบสซ้ำม ากกว่าหรือเท่ากับ 6, 4 และ 3 สำหรับได-, ไตร- และเตตระนิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ (Stalling *et al*., 1991) มาออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรมผ่านทาง http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html (Rozen Skaletzky, 2000) โดยกำหนดให้ส่วนที่เป็นไพรเมอร์อ ยู่ห่างจากส่วนที่เป็น SSR ประมาณ 30-50 เบส หรือในดีเอ็นเอบางสายสั้นกว่าแต่ต้องไม่สั้นกว่าความยาวของไพรเมอร์ และในบริเวณนั้นไม่พบเบสที่เรียงตัวซ้ำเกิน 3 ตัวโดยเฉพาะเบส A และ T ต้องมีค่า melting temperature อยู่ระหว่าง 55-65 °C

8. ทดสอบ primer (Primer testing)

นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทดสอบด้วยดีเอ็นเอปลาเสือตอทั้งสองชนิด โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (5 ul) ประกอบด้วย ดีเอ็นเอเริ่มต้น 5 ng, ไพรเมอร์ (Forward and Reverse) สายละ 0.25 pmol, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 500 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 100 uM dNTPs และเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.2 unit กำหนดโปรแกรมสำหรับเครื่องพีซีอาร์ดังนี้ 94 °C 3 นาที แล้วตามด้วย 35 รอบของ 94 °C 30 วินาที, อุณหภูมิในการ annealing (T_A) 30 วินาที และ 72 °C 1 นาที เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา เติม loading dye (99% formamide, 10mM NaOH, 0.1% bormophenol blue, 0.1% Xylene cyanol FF) ปริมาตร 5 ul แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟรเรซีสบนอะคริลาไมด์เจล (acrylamide gel) ในบัฟเฟอร์ TBE โดยใช้ sequenceing gel apparatus (Biorad, USA) ขนาด 30x40 เซนติเมตร ที่ระดับกระแส ไฟฟ้า 50 วัตต์ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง และอ่านขนาดโดยเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน (10bp DNA ladder; Invitrogen) หลังจากย้อมเจลด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Cyber Gold®) และอ่านผ่านเครื่องอ่านเจล (FluorChem 8000, Alpha Innotech Corp.) โดยในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของแต่ละไพรเมอร์ จะทำการทดสอบอุณหภูมิในการ annealing เป็นอันดับแรก หากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไม่ชัดเจนจะทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนนี้ หากยังไม่พบสภาวะที่เหมาะสมอีกจะทำการปรับเปลี่ยนปริมาณของ $MgCl_2$ และดีเอ็นเอต้นแบบ ตามลำดับ และทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมหากผลผลิตพีซีอาร์แสดงลักษณะเป็นโพลีมอร์ฟิค (polymorphism)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ศึกษาประสิทธิภาพของการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ด้วยวิธี enrichment, วิเคราะห์ลำดับเบสของไพรเมอร์, ส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR, และคำนวณค่าแสดงความหลากหลาย ได้แก่ จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลท์ เฮทเทอโรไซโกซิตี เป็นต้น และทดสอบ Cross-specific amplification ของไพรเมอร์ที่พัฒนาได้จากปลาเสือตอลายเล็กและเสือตอลายใหญ่ เพื่อประยุกต์ใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและการจำแนกชนิดปลาทั้งสองชนิด

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในปลาเสือตอ

การออกแบบไพรเมอร์ของปลาเสือตอลายใหญ่

ในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของปลาเสือตอลายใหญ่ ได้พลาสมิดลูกผสม ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของปลาเสือตอลายใหญ่จำนวน 762 โคลน เมื่อทำการหาลำดับเบสแล้วพบว่ามี 194 โคลนที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ หรือคิดเป็น 28.87% ซึ่งเมื่อสุ่มนำไปหาลำดับเบสจำนวน 32 โคลน พบว่ามีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบ จำนวน 31 ตำแหน่ง การจำแนกได้เป็นแบบไดนิวคลีโอไทด์จำนวน 29 ตำแหน่ง โดยมีจำนวนชุดซ้ำของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 4-21 ชุด และแบบไตรนิวคลีโอไทด์จำนวน 1 ตำแหน่งมีจำนวนชุดซ้ำของดีเอ็นเอ 3 ชุด และแบบเตตระนิวคลีโอไทด์จำนวน 1 ตำแหน่ง มีจำนวนชุดซ้ำของดีเอ็นเอ 5 ชุด และจากจำนวน 31 โคลนนี้สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ได้ 10 คู่ (ตารางที่ 1) ซึ่งเมื่อนำไปตรวจสอบความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ในปลาเสือตอลายใหญ่จากโรงเพาะฟักซึ่งรวบรวมจากธรรมชาติ พบว่าไพรเมอร์ 3 คู่ (DP01, DP14, DP26) มีความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (polymorphic) และพบ monomorphic 2 ไพรเมอร์คือ DP27 และ DP31

การออกแบบไพรเมอร์ของปลาเสือตอลายเล็ก

ในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาเสือตอลายเล็ก ได้พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของปลาเสือตอลายเล็กจำนวน 873 โคลน เมื่อทำการหาลำดับเบสแล้วพบว่ามี 228 (โคโลนีขาว) โคลนที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ หรือคิดเป็น 26.12 % ซึ่งเมื่อสุ่มนำไปหาลำดับเบส จำนวน 32 โคลน พบว่า มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบ จำนวน 32 ตำแหน่ง การจำแนกได้เป็นแบบไดนิวคลีโอไทด์จำนวน 33 ตำแหน่ง โดยมีจำนวนชุดซ้ำของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 5-21 ชุด และแบบไตรนิวคลีโอไทด์จำนวน 1 ตำแหน่งมีจำนวนชุดซ้ำของดีเอ็นเอ 3 ชุด และจากจำนวน 32 โคลนนี้สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ได้ 10 คู่ (ตารางที่ 1) ซึ่งเมื่อนำไปตรวจสอบความหลากหลายของไมโคร แซทเทลไลท์ในปลาเสือตอลายเล็ก จากโรงเพาะฟักซึ่งรวบรวมจากธรรมชาติ พบว่าไพรเมอร์ 4 คู่ (DU02, DU03, DU10, DU13) มีความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (polymorphic) และพบ monomorphic 1 ไพรเมอร์คือ DU06

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของการพัฒนา Microsatellite marker ด้วยวิธี Enrichment

Fish Species	Total Clone	Positive clones (Colony hybridization)	% Clones		
			Positive	Microsatellite DNA	Primer
เสือตอลายใหญ่	762	194	28.87 (194/762)	96.87 (31/32)	50.00 (5/10)
เสือตอลายเล็ก	873	228	26.12 (228/873)	100 (32/32)	50.00 (5/10)

สำหรับคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ได้ แต่ไม่ชัดเจน หรือเกิด แถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะนั้น ได้ทำการปรับเพิ่มหรือลดอุณหภูมิในการ annealing และ/หรือปรับปริมาณ $MgCl_2$ และดีเอ็นเอต้นแบบจนได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ชัดเจนขึ้น ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ , อุณหภูมิในการ annealing (T_A), Clone และส่วนประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ แสดงในตารางที่ 2และ3 ส่วนรูปแบบอัลลิล (banding pattern) แสดงไว้ในภาพที่ 2

การศึกษาครั้งนี้นับเป็นครั้งแรกของการพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์สำหรับปลาเสือตอลายเล็กและลายใหญ่ เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการพัฒนาไพรเมอร์จาก positive clones ที่นำไปหาลำดับนิวคลีโอไ ทด์ในครั้งนี้ มีค่า เท่ากับ 26.12-28.87% ซึ่งสูงกว่าวิธีการสร้างห้องสมุดจีโนมแบบดั้งเดิมซึ่งจะได้ positive clones ที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอประมาณ 0.5-10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Billotte *et al*, 1999)

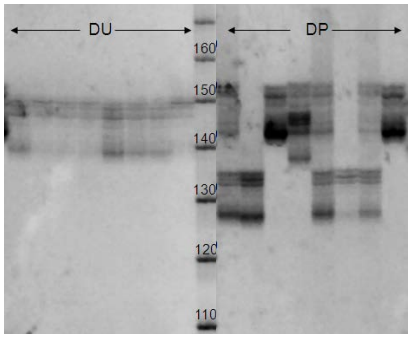
ในรายงานนี้ได้ทำการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ และพบว่าไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ ที่พัฒนาขึ้นสำหรับปลาเสือตอลายใหญ่ มีความหลากหลายขอ งอัลลิลเท่ากับ 1-4 อัลลิล (ตารางที่ 3) ส่วนปลาเสือตอลายเล็กมีความหลากหลายของอัลลิลเท่ากับ 1-10 อัลลิล (ตารางที่ 2) ซึ่งถือว่า ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับป ลาพื้นเมืองของไทยชนิดอื่น เช่นในปลาบู่ทราย ซึ่งพบว่าไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง ที่พัฒนาโดย นภาพร และคณะ (2551) มีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง 2-14 อัลลิล ในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) มีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง 5-30 อัลลิลจากไมโครแซทเทลไลท์ 3 ตำแหน่ง (Na-Nakorn *et al*., 1999) และในปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) มีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง 9-30 อัลลิลใน 4 ตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลท์ (Kamonrat, 1996) อย่างไรก็ตามจำนวนตัวอย่างปลาที่ใช้ศึกษามีจำนวนน้อย (ชนิดละ 8 ตัวอย่าง) เมื่อเทียบกับในปลาบู่ทราย ปลาดุกอุย และปลาตะเพียนขาว แต่ใกล้เคียงกับการพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ในปลาบึก ซึ่งมีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งเท่ากับ 2-6 อัลลิลจากไมโครแซทเทลไลท์ 10 ตำแหน่งในการทดสอบในปลา 20 ตัวอย่าง (Na-nakorn *et. al*., 2006) ซึ่งการศึกษาในปลาเสือตอนี้หากมีการทดสอบในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นอาจพบอัลลิลใหม่ๆเพิ่มมากขึ้นได้

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์, ลำดับเบสแกน, อุณหภูมิในการ annealing (T_A), และส่วนประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ขนาดอัลลิล จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี ของไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาขึ้นจำนวน 5 ตำแหน่งในปลาเสือตอลายใหญ่

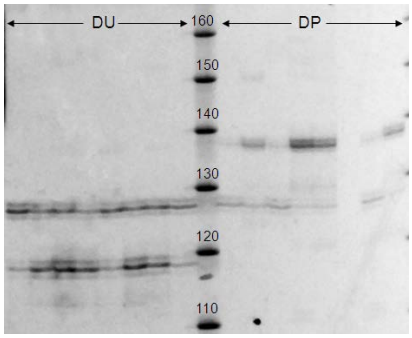
Locus ID	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ Primer sequence(5'-3')	ลำดับเบสแกน (Core sequence)	Annealling Temperature (°C)	Cycle	$MgCl_2$ (mM)	no. of allele	Heterozygosity	product size
DP01	F: ggatctggtgttgtagctgcacac R: accatgctccacagggaacca	$(TC)_{14}$	60°c	40	-	4	0.75	134-150
DP14	F: tgcaggtccattatccagatgtgg R: accggctaacagcgccggat	$(CA)_{18}$	60°c	40	2.25	2	0.13	138-150
DP26	F: cgttctctgagatttacgccagcaa R: ggatttgtcgaaagtgaggcactt	$(AC)_{16}$	60°c	30	-	4	0.88	138-146
DP27	F: gcctgaaatcaagtacctgca R: ttcgccagcataaacacacccaga	$(CA)_9$	60°c	30	-	1	0.00	228
DP31	F: cagtgcacacaatgcccacca R: ctgacgatggtgcacccaca	$(GT)_{15}$	60°c	40	-	1	0.00	158

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์, ลำดับเบสแกน, อุณหภูมิในการ annealing (T_A), และส่วนประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ขนาดอัลลิล จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี ของไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาขึ้นจำนวน 5 ตำแหน่งในปลาเสือตอลายเล็ก

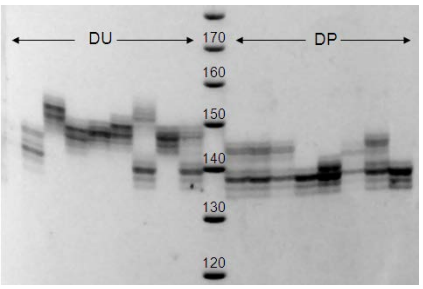
Locus ID	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ Primer sequence(5'-3')	ลำดับเบสแกน (Core sequence)	Annealling Temperature (°C)	Cycle	$MgCl_2$ (mM)	no. of allele	Heterozygosity	product size
DU02	F: tgcaggtccattatccagatgtgg R: accggctaacagcgccggat	$(CA)_{18}$	60°c	40	2.25	9	0.88	130-156
DU03	F: tgcaggtccattatccagaggt R: tcagggtgcagcagagctcca	$(AC)_{16}$	60°c	40	2.25	10	0.88	204-224
DU06	F: ggtgcagcgacgtccatgct R: actccactgcacagccagaac	$(CA)_{12}$	62°c	40	2.25	1	0.00	160
DU10	F: aacaccctgagagcaaagtccacct R: gtcggtgtgttactcccgtgt	$(AC)_{15}$	60°c	40	-	7	0.50	112-128
DU13	F: tgcaggtccattatccagaggt R: acacagcctgaccaaagtcacctcc	$(AC)_9$	55°c	40	-	8	1.00	180-198



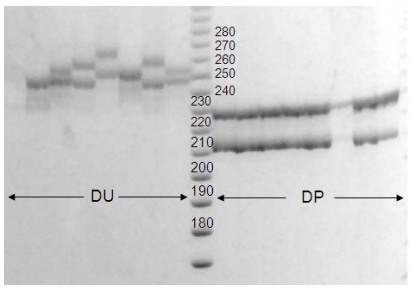
DP01



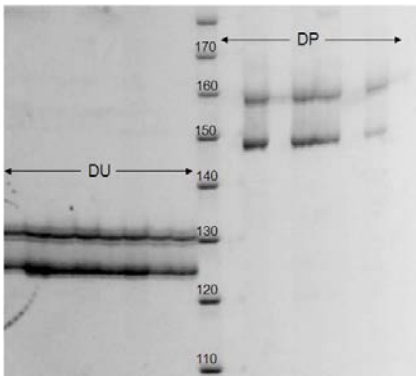
DP14



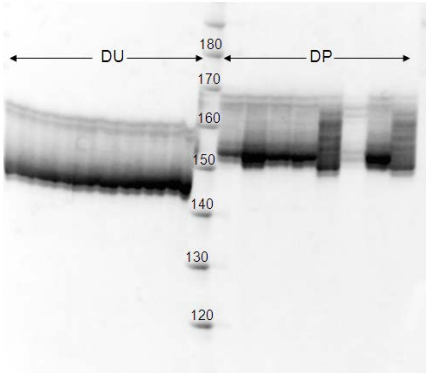
DP26



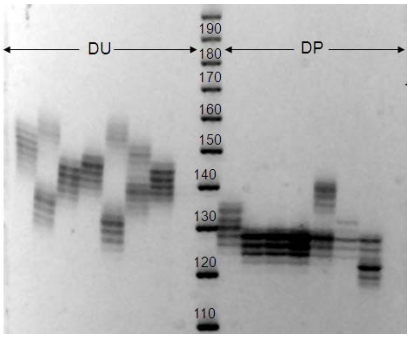
DP27



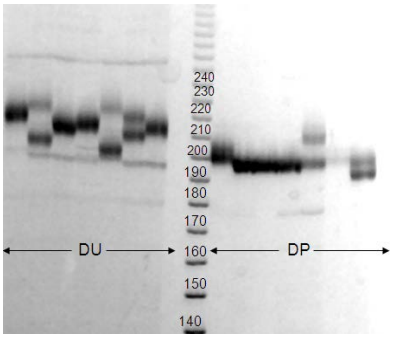
DP31



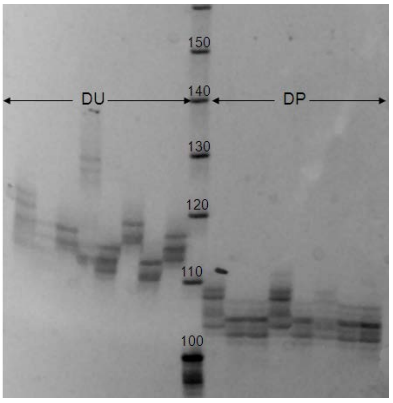
DU06



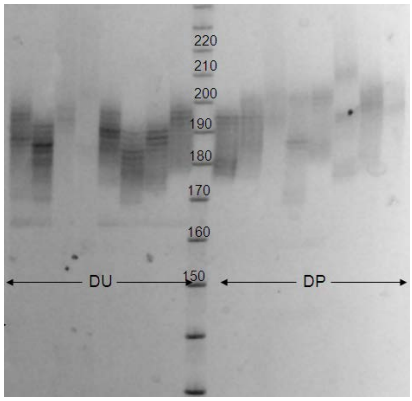
DU02



DU03



DU10



DU13

ภาพที่ 2 แสดงรูปแบบของอัลลิลในไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งต่างๆ จากการวิเคราะห์ตัวอย่างปลาเสือตอลายใหญ่ (DP) และเสือตอลายเล็ก (DU)

ไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้จำแนกชนิดพันธุ์ปลาเสือตอ

จากการศึกษา Cross-specific amplification หรือการประยุกต์ใช้ไพรเมอร์ของปลาชนิดหนึ่งในชนิดพันธุ์ที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน พบว่าไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นจากปลาเสือตอลายใหญ่ และเสือตอลาย เล็ก รวมทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ ให้ผลผลิตพีซีอาร์ แสดงลักษณะเป็น ทั้งโมโนมอร์ฟิค (monomorphism) และโพลีมอร์ฟิค (polymorphism) ในปลาทั้งสองชนิด โดยพบว่าใช้ไพรเมอร์ DP14, DP27, DP31, DU06, และ DU10 สามารถประยุกต์ในการจำแนกชนิดและช่วยยืนยันชนิดพันธุ์ปลาเสือตอลายเล็กและเสือตอลายใหญ่ได้อีกด้วยเนื่องจาก ให้ผลผลิตพีซีอาร์ ที่มีขนาดอัลลีลต่างกันในปลาเสือตอแต่ละชนิด นอกจากนั้น ยังพบ ไพรเมอร์ที่ให้ผล polymorphism และมีความหลากหลายของอัลลิลที่พบสูง เหมาะสมที่จะ นำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเสือตอทั้งสองชนิดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาเสือตอลายใหญ่ เมื่อทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นจากปลาเสือตอลายเล็กกลับให้ความหลากหลายของอัลลิลมากขึ้นเป็น 4-7อัลลิลต่อตำแหน่ง โดยไพรเมอร์ที่อ่านง่ายและให้ความหลากหลายของอัลลิลสูง เหมาะสมจะใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเสือตอลายเล็กรวม 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ DP26, DP27, DU02, DU03, DU10 และ DU13 และไพรเมอร์ที่เหมาะสมจะใช้ในการศึกษาความหลากหลาย ทางพันธุกรรมของปลาเสือตอลายใหญ่รวม 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ DP01 DP26 DU06 DU02 DU10 และ DU13 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการศึกษา Cross-specific amplification ของไพรเมอร์ปลาเสือตอ

Primer	no. of allele		product size	
	เสือตอลายเล็ก	เสือตอลายใหญ่	เสือตอลายเล็ก	เสือตอลายใหญ่
DP01	2	4	146-148	134-150
DP14	2	2	126-128	138-150
DP26	5	4	140-152	138-146
DP27	6	1	246-266	228
DP31	2	1	130-132	158

DU02	9	7	130-156	122-140
DU03	10	5	204-224	194-210
DU06	1	4	160	158-168
DU10	7	4	112-128	104-110
DU13	8	7	180-198	180-208

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคุณสมหวัง พิมลบุตร รองอธิบดีกรมประมง ที่กรุณาให้การสนับสนุนในการวิจัย ขอขอบคุณอาจารย์ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศรีษะภูมิ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้อ stock *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 ขอขอบคุณนางสาวอัญลักษณ์ วชิรไชยการ นิสิตปริญญาเอก สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และนายสันติ ปานนุสา นิสิตปริญญาโทภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำและการช่วยเหลือในการพัฒ นาไพรเมอร์ปลาเสือตอจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

นภาพร ศรีพุฒินิพนธ์, อภิรดี หันพงศ์กิตติกูล และวงศ์ปฐม กมลรัตน์. 2551. การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์สำหรับบู่ทราย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 7/2551. กรมประมง.

วงศ์ปฐม กมลรัตน์ และ ธนัญช์ สังกรธนกิจ . 2547. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาทิลาเปียที่พบในบริเวณแปลงเลี้ยงอาร์ทีเมีย ศูนย์วิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์น้ำเพชรบุรี . เอกสารวิชาการฉบับที่ 34/2547 สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. 32 หน้า.

สุดาวัลย์ ศรีไพโรจน์ และอุทัยรัตน์ ณ นคร. 2546. การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ในปลากัด. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41: สาขาประมง. หน้า 55-60.

Aliah, R. S., M. Takagi, S. Dong, C. T. Teoh, and N. Taniguchi. 1999. Isolation and Inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio*. *Fisheries Science* 65(2): 235-239.

Baird, I. 2011. *Datnioides undecimradiatus*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 04 September 2012.

Billotte, N., P.J.L. Lagoda, A.M. Risterucci, and F.C. Baurens. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits 54: 277-288.

Das, P., A. Barat, P. K. Meher, P.P.Ray and D. Majumdar. 2005. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Labeo rohita* and their

cross-species amplification in related species. Molecular Ecology Notes. 5: 2031-233 pp.

Galbusera, P., F.A. Volckaert, B. Hellemans and F. Ollevier. 1996. Isolation and characterization of microsatellite markers in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Molecular Ecology 5: 703-705.

Hansen, M.M., J.B. Taggart and D. Meldrup. 1999. Development of new VNTR markers for pike and assessment of variability at di- and tetranucleotide repeat microsatellite loci. Journal of Fish Biology 55: 183-188.

Kalinowski, S.T. 2002. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances?. Heredity 88: 62-65.

Kamonrat, W. 1996. Spatial genetic structure of Thai silver barb, *Puntius gonionotus* (Bleeker) populations in Thailand. Ph.D. Thesis, Dalhousie University, Dalhousie, Canada.

Kamonrat , W., S. K. J. McConnell and D. I., Cook. 2002. Polymorphic microsatellite loci from the Southeast Asia Cyprinid, *Barbodes gonionotus* (Bleeker). *Molecular Ecology Notes* 2: 89-90.

Kamonrat, W., N. Sukumasawin, S. Chausuan and S. Pannusa. 2008. Optimization of cross-specific microsatellite PCR primer for population study of *Cirrhinus microlepis* in the Lower Mekong Basin, pp 157-161. *In* Burnhill T. J. and Bamrungrach. P, eds. Proceeding of the 8th Technical Symposium on Mekong Fisheries, 15th -17th November 2006. MRC Conference Series No.7. Mekong River Commission, Vientiane.

Kamonrat, W., A. Hanpongkittikul, N. Sukumasavin, S. Pannusa, S. Chausuan, C. Udomkarn, C. Phala, H. H. Ngai, Somboun, and S. Ingthamjitr. 2010. Genetic Inventory of Some Economically Important Species of the Lower Mekong River Basin. Consultant report. *Aquaculture of Indigenous Mekong Fish Species,* Mekong River Commission. 50 pp.

Lee, W. J. and T. D., Kocher. 1996. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology* 49:169-171.

McConnell, S., L. Hamilton, D. Morris, D. Cook, D. Paquet, P. Bentzen and J. Wright. 1995. Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. Aquaculture 137: 19-30.

Na-nakorn, U., N. Taniguchi, E. Nugroho, S. Seki and W. Kamonrat. 1999. Isolation and characterization of microsatellite loci of *Clarias macrocephalus* and their application to genetic diversity study. Fisheries Science 65(4): 520-526.

Na-nakorn, U., K. Sriphairoj, S. Sukmanomon, S. Poompuang and W. Kamonrat. 2006. Polymorphic microsatellite primers developed from DNA of the endangerd

Mekong giant catfish, Pangasianodon gigas (Chevey) and cross-species amplification in three species of Pangasius. Molecular Ecology Notes. 6: 1174-1176.

Rozen, S. and H.J. Skaletzky. 2000. Primer 3 on theWWWfor general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S. and S. Misener (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, New Jersey, pp 365-386.

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

Stalling, R. L., A. F. Ford, D. Nelson, D. C. Torney, C. E. Hilderbrand, and R. K, Moysis. 1991. Evolution and distribution of $(GT)_n$ repetitive sequence in mammalian geneomes. *Genemic* 10: 807-815.

Taggart, J. B., R. Hynes, P. A. Prodohl and A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from Salmonid fishes. *J. Fish. Biol.* **40**, 963-965.

Vidthayanon, C. 2008. Field guide to Fishes of the Mekong Delta. Mekong River Commission, Vientiane. 288 pp.

Vidthayanon, C. 2011. *Datnioides pulcher*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 04 September 2012.