การสืบค้นเครื่องหมายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลสำหรับอนุกรมวิธาน ของกบพันธุ์พื้นเมือง และกบบูลฟร็อก (*Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802))

อภิรดี หันพงศ์กิตติกูล[1*] วงศ์ปฐม กมลรัตน์[2] และยงยศ หรี่คะนอง[1]
[1]สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด
[2]สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลมาใช้ในการจำแนกชนิดกบที่นิยมเพาะเลี้ยงในประเทศไทย จำนวน 2 กลุ่มได้แก่ กบพื้นเมือง และกบบูลฟร็อก ดำเนินการโดยการวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในตัวอย่างกบทั้ง 2 ชนิด และลูกผสมจากการผสมข้ามพันธุ์จากแหล่งเพาะเลี้ยง ผลการศึกษาจากการทดสอบขั้นต้นกับไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์จำนวน 16 ตำแหน่ง และคัดเลือกไพรเมอร์ซึ่งสามารถแยกขนาดไมโครแซทเทลไลท์ของกบที่นำมาศึกษาออกจากกันได้ชัดเจนและให้ผลที่อ่านง่าย สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดได้จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ Hrug01 Hrug07 RcatJ21 RcatJ44b และ RcatJ54 ซึ่งจะเป็นเครื่องมือช่วยในการจำแนกชนิดของกบทั้ง 2 ชนิด โดยเฉพาะในตัวอย่างที่ไม่สมบูรณ์ และลูกผสมในกรณีที่ลักษณะทางอนุกรมวิธานไม่สามารถจำแนกได้

คำสำคัญ: จำแนกชนิด กบพื้นเมือง กบนา กบบูลฟร็อก ไมโครแซทเทลไลท์ เครื่องหมายพันธุกรรม

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

Identification of molecular genetic markers for taxonomy of Thai Native Frog and Introduced Frog (*Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802))

Apiradee Hanpongkittikul[1*] Wongpathom Kamonrat[2] and Yongyote Reekanong[1]
[1]Inland Fisheries Resources Research and Development Institute
[2]Inland Fisheries Research and Development Bureau

Abstract

Molecular genetics tool for species identification of two cultured frog in Thailand and their hybrids were developed using microsatellite DNA marker. Two groups and their hybrids consisting of Thai Native Frog and Introduced Frog (*Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)) were collected from hatcheries and wild in Thailand. The total of 16 microsatellite primers developed from Rugose frog and Bullfrog species were screened and five of which namely Hrug01 Hrug07 RcatJ21 RcatJ44b and RcatJ54 were exhibited useful patterns for identifying the studied species. Taxonomic key to these two groups using microsatellite marker was presented in this paper. Several case studies were included in this paper. The finding from this study could be an alternative taxonomic tool for identify this two frog groups especially when the samples are damaged or only small amount of sample available as well as in hybrids which their taxonomic characters cannot clearly be identified.

Key words: identify, Thai native frog, Bullfrog, hybridization, microsatellite, DNA marker
*Corresponding author: Preedakanasuta building Department of Fisheries Bangkok 10900
Tel. 0 2558 0178 e-mail: kunpagne@hotmail.com

บทนำ

ในปัจจุบันธุรกิจการเลี้ยงกบเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางเป็นทั้งอาหารและสินค้าเกษตรที่สามารถจำหน่ายได้ทั้งภายในประเทศ และส่งออกไปตลาดต่างประเทศที่สำคัญของไทย โดยเฉพาะ ฮ่องกง ญี่ปุ่น มาเลเซีย เยอรมันนี ฝรั่งเศส และสหรัฐอเมริกา (จิราภรณ์, 2534) โดยกบที่นิยมเลี้ยงได้แก่ กบพันธุ์พื้นเมือง เช่นกบนา กบจาน กบทูต และกบต่างถิ่น เช่นกบบูลฟร็อก (พงษ์พันธ์, 2539) อีกทั้งในประเทศไทยนั้นมีการนำพ่อแม่พันธุ์กบต่างถิ่นคือกบบูลฟร็อกเข้ามาตั้งแต่ปีพ.ศ. 2497 ซึ่งกบชนิดนี้ได้ถูกจัดอยู่ใน 100 ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานของโลก (100 of the World's Worst Invasive Alien Species) ในบัญชี Global invasive species database ซึ่งพบรายงานว่ากบบูลฟร็อกเป็นพาหะของโรค Chytridiomycosis ซึ่งทำให้เกิดโรคในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และทำให้เกิดการลดลงของประชากรจนเกิดการสูญพันธุ์ในกบหลายชนิด (Hanselmann *et al*., 2004) นอกจากนี้ยังพบการลดลงของชนิดพันธุ์พื้นเมืองอันเกิดจากการนำเข้ากบบูลฟร็อกในประเทศเยอรมนี ประเทศฝรั่งเศส และประเทศอิตาลี (C.R.Boettger, 1941; Thiesmeier et al., 1994; Touratier, 1992b and Touratier 1992a in Kraus, 2009) พบรายงานว่ากบบูลฟร็อกเป็นผู้ล่ากบพื้นเมืองหลายชนิดในประเทศสหรัฐอเมริกา(Jones et al., 2003 in Kraus, 2009) พบการแก่งแย่งอาหารและพื้นที่อยู่อาศัยกับกบพื้นเมือง (Kupferberg, 1997; Kiesecker and Blaustein, 1997 in Hanselmann et al., 2004) และจากรายงานการศึกษาในห้องปฏิบัติการ พบว่าตัวอ่อนของกบบูลฟร็อกกินไข่และตัวอ่อนของปลาพื้นเมืองบางชนิดเป็นอาหาร(Muller et al., 2006 in Kraus, 2009) สำหรับในประเทศไทยกบบูลฟร็อกที่นำเข้ามาได้มีการทดลองเลี้ยง และทดลองผสมข้ามชนิดพันธุ์กับพันธุ์พื้นเมืองเพื่อปรับปรุงพันธุ์ (ทองยุ่น, 2521) อย่างไรก็ตามในประเทศไทยมีข้อสังเกตแต่ยังไม่มีข้อมูลแน่ชัดว่ากบบูลฟร็อกและลูกผสมน่าจะแพร่กระจายออกไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ ทั้งโดยความตั้งใจหรือหลุดรอดจากบ่อเพาะเลี้ยง เนื่องจากกบบูลฟร็อกสามารถดำรงชีวิตได้ในธรรมชาติ และสามารถผสมพันธุ์กับกบพื้นเมืองได้ แต่ยังไม่มีหลักฐานชัดเจนว่าสามารถผสมพันธุ์กับกบพื้นเมืองแล้วให้ลูกที่ไม่เป็นหมัน นอกจากนี้ยังพบรายงานการพบกบหน้าเขียวซึ่งไม่เหมือนเดิมในธรรมชาติ (สำนักนโยบายและแผนทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม, กำลังตีพิมพ์) ถึงแม้ปัจจุบันจะยังไม่มีรายงานถึงผลกระทบของการปนเปื้อนทางพันธุกรรมของกบบูลฟร็อกต่อพันธุ์พื้นเมือง แต่โดยทั่วไปแล้วการถ่ายโอนยีนจากชนิดพันธุ์ต่างถิ่นไปสู่ชนิดพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งถ้าเป็นชนิดที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์อยู่แล้วก็เท่ากับเป็นการเร่งการสูญพันธุ์ให้เกิดเร็วขึ้น ส่วนชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่ผสมกับชนิดพันธุ์พื้นเมืองให้ลูกที่สามารถขยายพันธุ์ได้ จะยิ่งส่งผลกระทบกว้างขวาง อาจเกิดการถ่ายโอนยีนจากชนิดพันธุ์ต่างถิ่นไปสู่ชนิดพันธุ์พื้นเมืองได้ ยิ่งถ้าชนิดพันธุ์พื้นเมืองมีความชุกชุมน้อยอยู่แล้ว จีโนมของมันก็อาจถูกแทนที่โดยยีนของชนิดพันธุ์ต่างถิ่นได้ (อุทัยรัตน์ และวงศ์ปฐม, 2551) และนำไปสู่การสูญพันธุ์ในธรรมชาติได้ ดังที่เคยเกิดกับพืชและสัตว์หลายชนิด (Rhymer and Simberloff, 1996) ซึ่งในลูกผสมบางตัวจะแสดงออกลักษณะบางลักษณะที่ได้รับการถ่ายทอดจากทั้งพ่อและแม่พันธุ์ (Campton, 1987) ยิ่งไปกว่านั้น ตัวอย่างลูกผสมได้รับยีนของพ่อหรือแม่พันธุ์อย่างใดอย่างหนึ่งจะพบลักษณะที่แสดงออกที่แตกต่างไปจากพ่อหรือแม่พันธุ์เดิม (Leary *et. al*., 1996)

นอกจากนี้ลูกพันธุ์ที่ได้จากการผสมจะมีลักษณะที่แสดงออกความใกล้เคียงกับพ่อพันธุ์หรือแม่พันธุ์มากจนไม่สามารถตรวจสอบด้วยการศึกษาจากลักษณะภายนอกเนื่องจากโดยปกติลูกผสมจะมีลักษณะภายนอกที่แสดงออกต่างๆกันตามสัดส่วนพันธุกรรมที่ได้รับจากพ่อแม่พันธุ์ (อุทัยรัตน์, 2543) การจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะภายนอกจึงกระทำได้ยาก

ดังนั้นการการสืบค้นเครื่องหมายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลที่ใช้ในการจำแนกชนิด และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบต่างถิ่นและกบพื้นเมืองบางชนิด จะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบ

สถานภาพของกบที่มีการเพาะเลี้ยง และในธรรมชาติ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาไปสู่การศึกษาการปนเปื้อนทางพันธุกรรมของกบต่างถิ่นในกบนา และระดับการคุกคามในธรรมชาติของกบต่างถิ่นอีกทางหนึ่ง ทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ การค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ รวมถึงการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ

วัตถุประสงค์

พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมระดับโมเลกุลที่เหมาะสมในการจำแนกชนิดกบพันธุ์พื้นเมืองและกบบูลฟร็อก

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. การรวบรวมตัวอย่างเนื้อเยื่อผังผืดเท้าของกบพื้นเมืองที่สำคัญ เช่น กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1835) กบจาน *Hoplobatrachus tigerinus* (Daudin, 1803) รวมถึงกบลูกผสมและกบต่างถิ่น ได้แก่ กบบูลฟร็อก *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) จากแหล่งธรรมชาติและแหล่งเพาะเลี้ยงในประเทศ ซึ่งจำแนกชนิดพันธุ์ตามธัญญา (2546) และ Taylor (1962) เก็บรักษาเนื้อเยื่อในเอทานอล 99.99% (absolute ethanol) โดยแบ่งแยกออกตามชนิด แหล่งตัวอย่าง และระยะเวลาที่เก็บ แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ จนกว่าจะวิเคราะห์ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่าง และแหล่งตัวอย่าง ที่นำมาใช้ในการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

ชนิด	จำนวน	แหล่งตัวอย่าง
กบนา	10	ฟาร์มเกษตรกร เชียงราย
กบนา	10	ฟาร์มเกษตรกร ห้วยฮ่องไคร้ เชียงใหม่
กบนา+ กบคัดพันธุ์	44	ศพจ.พัทลุง
กบบูลฟร๊อก	10	ฟาร์มเกษตรกร ห้วยฮ่องไคร้ เชียงใหม่
กบบูลฟร๊อก	4	กาฬสินธุ์
กบนา	10	กาฬสินธุ์
กบจาน	10	กาฬสินธุ์
กบนา	30	ศพจ.อุดรธานี
กบคัดพันธุ์	23	ศพจ.นครศรีธรรมราช

2. การวิเคราะห์ตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ โดยวิธีการ “A Single Tube Rapid Extraction of DNA from Fish Blood” (ดัดแปลงจาก Sambrook and Russell, 2001) ดีเอ็นเอที่ได้นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 25 ng/μL

3. สืบค้นเครื่องหมายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลที่เหมาะสมในการศึกษาการจำแนกชนิดกบพื้นเมืองและกบบูลฟร็อก โดยศึกษาความผันแปรของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ โดยทดสอบไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับกบบูลฟร็อก (Assession no. AY323928-AY323934) ของ Austin *et al.* (2003) และไพรเมอร์ที่พัฒนาสำหรับกบนา (Assession no. FJ465013-FJ465021) ของ Shao *et al.* (2009) รวมทั้งหมด 16 ไพรเมอร์ ซึ่งสืบค้นจาก Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) ทำ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบโพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (5 µl) ประกอบด้วย ดีเอ็นเอเริ่มต้น 20 ng, 10 µM ไพรเมอร์ (Forward and Reverse), 10X PCR buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.01% gelatin), 10 µM dNTPs, ddH_2O และ 0.05 unit *Taq* DNA polymerase หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องพีซีอาร์โดยกำหนดโปรแกรมดังนี้ 94 °C 5 นาที แล้วตามด้วย 30 รอบของ 94 °C 10 วินาที, Annealing temperature 10 วินาที และ 72 °C 30 วินาที แล้วตามด้วย 72 °C 5 นาที เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา เติม loading dye (99% formamide, 10 mM NaOH, 0.1% bormophenol blue, 0.1% Xylene cyanol FF) ปริมาตร 5 µl นำไปแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟรรีซีสบนอะคริลาไมด์เจล (8% acrylamide gel) ในบัฟเฟอร์ TBE โดยใช้ sequenceing gel apparatus (Biorad, USA) ขนาด 30x40 เซนติเมตร ที่ระดับกระแสไฟฟ้า 50 วัตต์ เป็นเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง และอ่านขนาดโดยเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน (10bp DNA ladder; Invitrogen) หลังจากย้อมเจลด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Cyber Gold®) และอ่านผ่านเครื่องอ่านเจล (FluorChem 8000, Alpha Innotech Corp.)

4. เปรียบเทียบขนาดและความผันแปรของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ คัดเลือกและนำมาใช้ในการจำแนกชนิด

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

ลักษณะทางอนุกรมวิธานของกบพื้นเมืองและกบบูลฟร๊อก

กบพื้นเมืองของไทยที่นิยมเพาะเลี้ยงมี 2 ชนิด ได้แก่ กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1835) และกบจาน *Hoplobatrachus tigerinus* (Daudin, 1803) เป็นกบในวงศ์ Ranidae ลักษณะเด่นของสกุลนี้คือ หัวเรียบค่อนข้างโค้ง ปลายปากแหลมมน มีสันต่อมบนหลังยาวขนานกัน 9-10 เส้น (ธัญญา, 2546) กบสองชนิดนี้มีความเชื่อแต่เดิมว่าเป็นกบคนละชนิดกัน โดยมีลักษณะที่แตกต่างกันคือ กบจานเป็นกบขนาดใหญ่ และริมฝีปากมีแถบแนวตั้งสีดำพาดอยู่เรียกว่า Trasal fold และเป็นลักษณะที่ไม่พบในกบนาซึ่งมีขนาดเล็กกว่า (Taylor, 1962) จากการศึกษาเอกสารเกี่ยวกับอนุกรมวิธานในหลายๆแหล่ง พบว่า *Hoplobatrachus rugulosus* และ *Hoplobatrachus tigerinus* เป็นกบชนิดเดียวกันจากหลักฐานการเป็นชื่อพ้อง (Synonyme) ของ *H. rugulosus* (http://en.wikipedia.org/wiki/Chinese_Edible_Frog) ส่วนลักษณะที่แสดงออกของลูกผสมระหว่างกบนาและกบจาน จากการศึกษาของ ทองยุ่น และคณะ(2547) และทองยุ่น (2551) กล่าวไว้ว่าลูกผสมที่ได้มีลักษณะแตกต่างกันไปตามสัดส่วนพันธุกรรมที่ได้รับจากทั้งพ่อและแม่พันธุ์ โดยมีตั้งแต่ลักษณะผิวหนังมีสีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงสีน้ำตาลเข้ม สีน้ำตาลอ่อนแต้มลายน้ำตาลเข้มไปจนถึงลายดำ หรือสีน้ำตาลปนเทา มีเพียงส่วนน้อยที่มี ผิวสีดำ บางตัวมีหัวสีเขียว ส่วนท้องมีสีขาวคางลาย ท้องขาวคางขาว ท้องลายคางขาว และท้องลายคางลาย โดยทั่วไปแล้วการแสดงออกของลูกผสมนั้น ลักษณะที่แสดงออกบางครั้งมีความใกล้เคียงกับพ่อแม่พันธุ์มากหรือมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างพ่อแม่พันธุ์จนไม่สามารถตรวจสอบด้วยการศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางอนุกรมวิธานได้ (อุทัยรัตน์, 2543) อีกทั้งในระยะที่สัตว์น้ำยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่นั้นการแยกลักษณะภายนอกของลูกผสมออกจากพ่อแม่พันธุ์ก็ยิ่งเป็นไปได้ยากขึ้น ส่วนกบบูลฟร๊อก *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) เป็นกบในวงศ์เดียวกัน ลักษณะที่แตกต่างกับกลุ่มกบในสกุล *Hoplobatrachus* คือ มีลักษณะลำตัวสีน้ำตาลปนเขียว ผิวส่วนใหญ่เรียบ กระดูกแก้วหูขนาดใหญ่ชัดเจน ท้องขาว ใต้คางมีสีเหลืองปนเขียว ขาทั้งสี่เป็นลายน้ำตาลดำ ส่วนหัวมีสีเขียวเข้ม ไม่มีสันข้างตัวแต่มีสันตรงด้านหลังของแก้วหู กบบูลฟร๊อกนั้นเป็นที่นิยมในวงแคบ เนื่องจากตลาดที่ส่งออกบางประเทศไม่นิยมกบหน้าเขียว (ภาพที่ 1)

การศึกษาเบื้องต้นในครั้งนี้ได้ทดลองนำทั้งกบนาและกบจาน รวมถึงกบลูกผสมของกบนาและกบจาน ซึ่งในปัจจุบันการรวบรวมกบนาพันธุ์แท้ หรือกบจานพันธุ์แท้ นั้นทำได้ยากมากเนื่องจาก กบที่รวบรวมได้ส่วนใหญ่มาจากฟาร์มเกษตรกรซึ่งรวบรวมพันธุ์จากแหล่งธรรมชาติ โดยกบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงปัจจุบันเป็นกบที่เกิดจากการคัดพันธุ์ หรือเกิดจากการผสมกบนาและกบจานมาเป็นเวลาหลายรุ่น ซึ่งตัวอย่างกบพื้นเมืองและลูกผสมที่รวบรวมมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ รวบรวมกบพันธุ์พื้นเมืองหลายลักษณะเช่น ลำตัวสีดำน้ำตาลเข้มคางลาย ท้องขาว และลำตัวสีเหลืองปนน้ำตาล ส่วนท้องและคางขาวไม่มีลายดำ เป็นกบที่คัดพันธุ์ซึ่งเป็นที่นิยมเลี้ยงในหมู่เกษตรกร เมื่อนำมาทดสอบด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 16 ตำแหน่ง พบว่าไม่สามารถแยกกบลักษณะต่างๆออกจากกันได้ เนื่องจากขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกันในทุกตำแหน่ง จึงสันนิษฐานได้ว่ากบที่นำมาศึกษาทั้งหมดเป็นกบกลุ่มเดียวกัน และถือรวมเป็นตัวแทนกบพื้นเมืองของไทยทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (ภาพที่ 1) นอกจากนี้ยังพบว่า การรวบรวมตัวอย่างในเขตภาคกลาง ซึ่งเป็นแหล่งเลี้ยงกบที่สำคัญเป็นไปได้ยากมาก เนื่องจากทราบจากเกษตรกรส่วนใหญ่ว่าอาจจะมีการปนเปื้อนทางพันธุกรรมของกบบูลฟร๊อกในประชากรกบพื้นเมืองเนื่องจากมีเกษตรกรทดลองปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้ามพันธุ์ ทางผู้วิจัยจึงไม่ได้นำมารวมเป็นตัวอย่างทดสอบในการศึกษาครั้งนี้

ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของตัวอย่างกบพื้นเมืองและกบบูลฟร๊อกที่รวบรวมเพื่อการศึกษาครั้งนี้ (เรียงจากซ้ายไปขวา กบนา กบจาน และกบบูลฟร๊อก)

ตารางที่ 2 รายละเอียดของไพรเมอร์ Genbank accession no. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ ลำดับเบสแกนและอุณหภูมิที่ใช้ในการ annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่คัดเลือกมาใช้ในการสร้างคู่มือจำแนกชนิด

Locus ID	Genbank accession no.	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ Primer sequence(5'-3')	ลำดับเบสแกน (Core sequence)	Annealling Temperature (°C)	Cycle
Hrug01	FJ465013	F: TCGTGTATGTCCAGCCAAAA R: GTCTCGAAGCAACAGCCT	$(TG)_{12}$	55	40
Hrug07	FJ465019	F: AGGAGAAGAGGGACTCACTATCA R: CATTCTTGACGGGACTAATACAT	$(GT)_{24}$	60	30
Rcat J21	AY323929	F: CCCATCTTATCCTGTGTACT R: CAAGCCTCCATCTCACCTTACC	$(GT)_{25}$	55	40
Rcat J44b	AY323932	F: AGGTTAATGAAGCTCGGCAG R: GGAGGCATCATATCAGAGAG	$(GT)_{22}$	55	40
Rcat J54	AY323930	F: TCATTACCACTGCCTTCTGC R: TGCTGCTGTCCTATTGCTAG	$(CA)_{18}$	55	40

ขนาดของไมโครแซทเทลไลท์อัลลิลในกบแต่ละชนิด

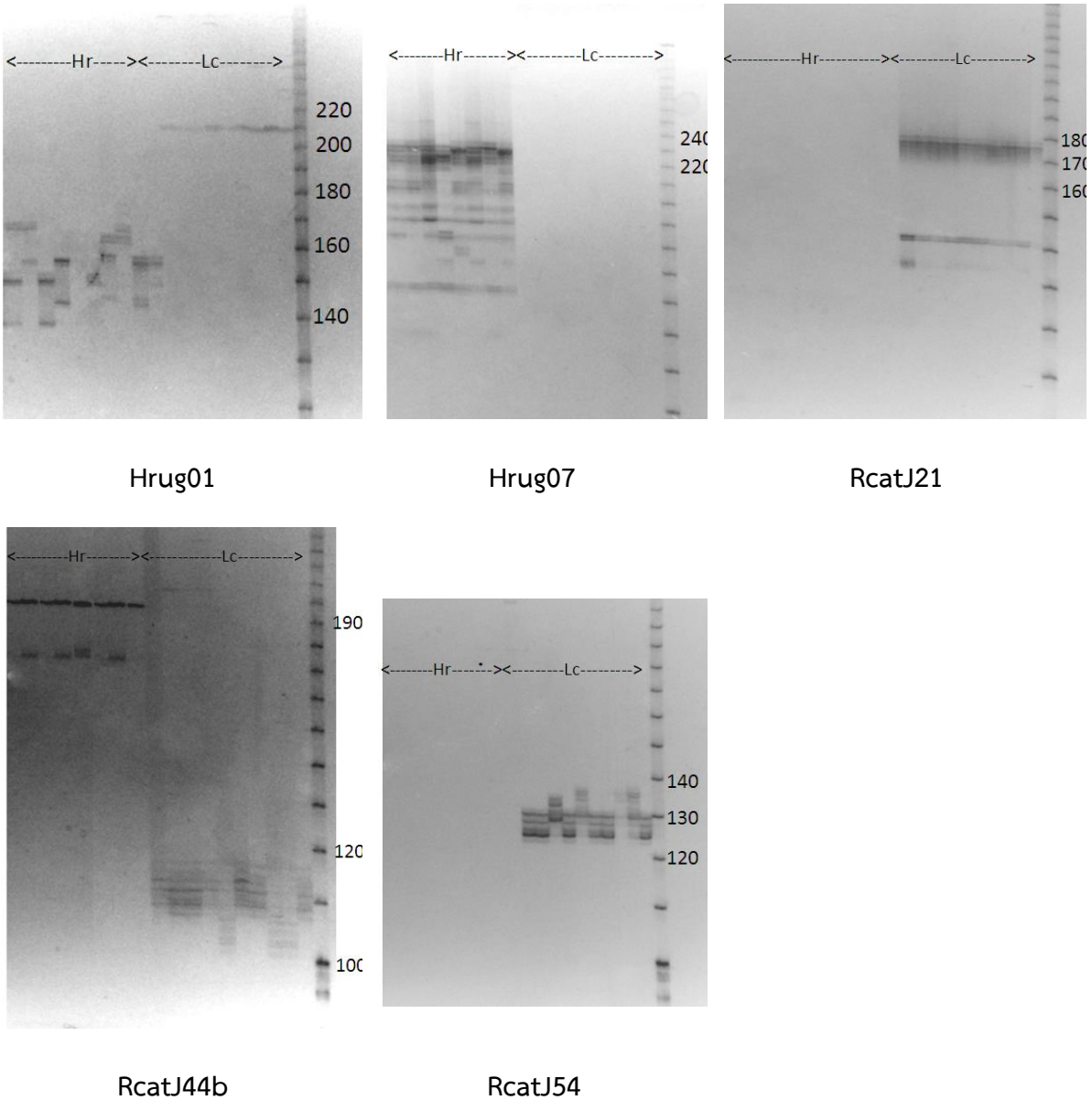
เมื่อนำดีเอ็นเอของทั้งกบพื้นเมืองและกบต่างถิ่นมาทดสอบด้วยไพรเมอร์จำนวน 16 ไพรเมอร์ เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ขนาดไมโครแซทเทลไลท์ของกบทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกันได้ชัดเจน และผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้มีลักษณะอัลลีลที่อ่านง่าย และแสดงผลที่แตกต่างกันในกบทั้งสองชนิดได้ชัดเจน พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถนำมาช่วยในการจำแนกชนิดกบพื้นเมืองและกบต่างถิ่นได้จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ Hrug01 Hrug07 RcatJ21 RcatJ44b และ RcatJ54 (ตารางที่ 3 และภาพที่ 2) โดยแบ่งเป็น

1. ไพรเมอร์ที่สามารถแยกขนาดไมโครแซทเทลไลท์ของกบพื้นเมืองและกบบูลฟร๊อกออกจากกันจำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ RcatJ44b โดยกบพื้นเมืองมีขนาดอัลลีลเท่ากับ 194 bp และกบบูลฟร๊อกมีขนาดอัลลีลระหว่าง 106-114 bp และไพรเมอร์ Hrug01 ซึ่งกบพื้นเมืองจะมีขนาดอัลลีลเท่ากับ 148-168 bp ในขณะที่กบบูลฟร๊อกมีขนาดอัลลีลระหว่าง 210-230 bp
2. ไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ในกบบางชนิดจำนวน 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ Hrug07 ซึ่งให้ผลผลิตพีซีอาร์เฉพาะในกบพื้นเมืองโดยมีขนาดอัลลิลระหว่าง 220-232 bp ตามลำดับ ในขณะที่ไพรเมอร์ RcatJ54 และ RcatJ21 จะให้ผลผลิตพีซีอาร์เฉพาะในกบบูลฟร๊อกเท่านั้น โดย RcatJ54 มีขนาดอัลลิลระหว่าง 128-154 bp และ RcatJ21 มีขนาดอัลลิลระหว่าง 172-178 bp

ทั้งนี้การวิเคราะห์เพื่อการจำแนกชนิดสำหรับตัวอย่างกบทั้งสองชนิด อาจมีความจำเป็นต้องใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์หลายๆตำแหน่งประกอบกันเพื่อช่วยยืนยันความถูกต้องในการจำแนกชนิด

ตารางที่ 3 ขนาดอัลลีลของกบที่นำมาใช้ศึกษาแต่ละชนิด เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ที่คัดเลือกเพื่อทำคู่มือในการจำแนกชนิด

	product size	
	กบพื้นเมืองของไทย	กบบูลฟร๊อก
Hrug01	140-168	210-230
Hrug07	220-232	n/a
RcatJ21	n/a	172-178
RcatJ44b	194	106-114
RcatJ54	n/a	128-154



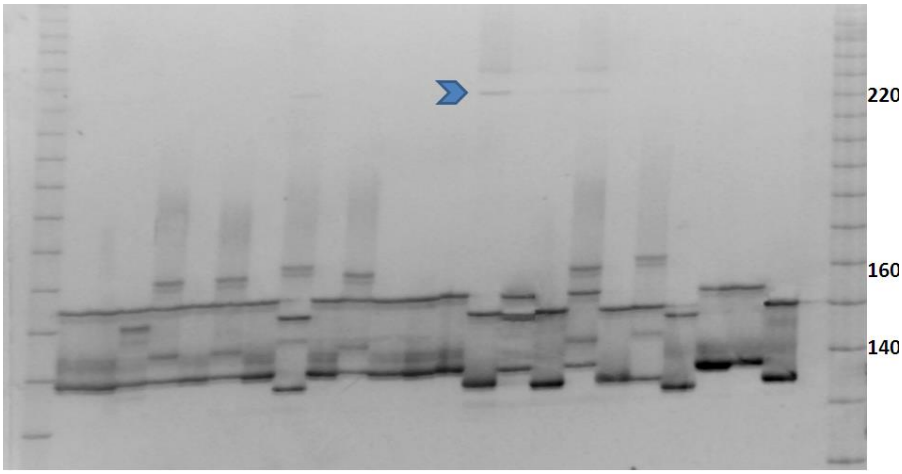
ภาพที่ 2 รูปแบบและขนาดของอัลลีลในไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง Hrug01 Hrug07 RcatJ21 RcatJ44b และ RcatJ54 ที่ใช้ในการแยกชนิดกบพื้นเมือง (Hr) และกบบูลฟร็อก *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Lc) เปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker)

ตัวอย่างกบพื้นเมืองที่รวบรวมจากจังหวัดนครศรีธรรมราช

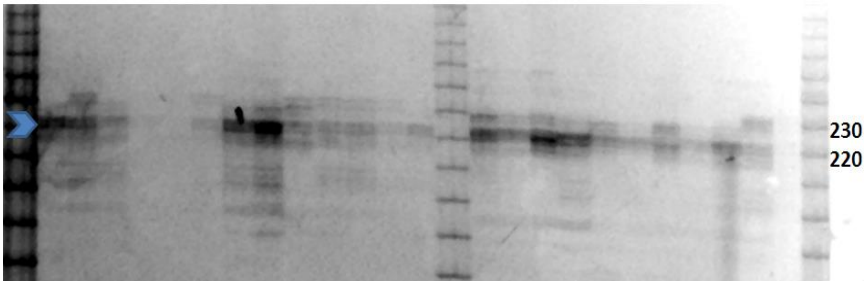
กบจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดนครศรีธรรมราช ซึ่งได้พ่อแม่พันธุ์มาจากฟาร์มกบรายใหญ่ในจังหวัด เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ Hrug01 มีขนาดอัลลีลระหว่าง 148-164 bp และพบว่าบางตัวอย่างแสดงอัลลิลของกบบูลฟร็อกปะปนอยู่คืออัลลิลขนาด 220 bp เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ Hrug07 ตัวอย่างส่วนใหญ่พบขนาดอัลลีลที่ 220-232 bp และพบบางตัวอย่างไม่ปรากฏอัลลีลเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ดังกล่าวซึ่งเป็นลักษณะของกบลูกผสม เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ RcatJ21 แสดงลักษณะของลูกผสมโดยพบขนาดอัลลีลในกลุ่มกบบูลฟร็อก ซึ่งมีขนาดอัลลิล 172-174 bp ซึ่งถ้าเป็นกบพื้นเมืองจะไม่พบอัลลีลดังกล่าว เมื่อทดสอบด้วย

ไพรเมอร์ RcatJ44b พบขนาดอัลลีลปนกันทั้งที่ขนาด 194 bp และ112 bp เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ RcatJ54 แสดงลักษณะของลูกผสม โดยปรากฏขนาดอัลลีลที่ 128 bp

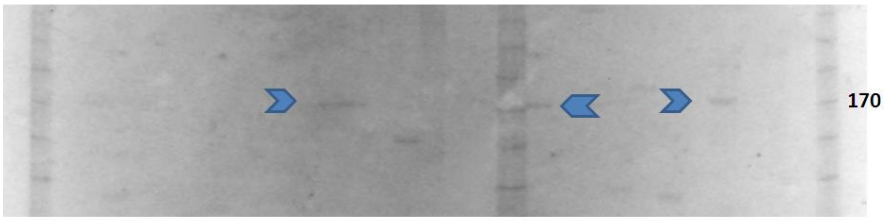
a.



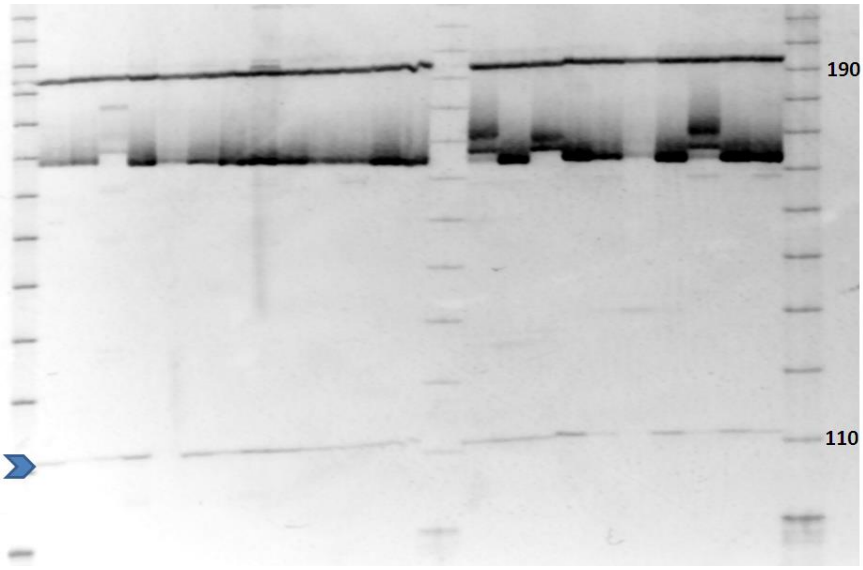
b.

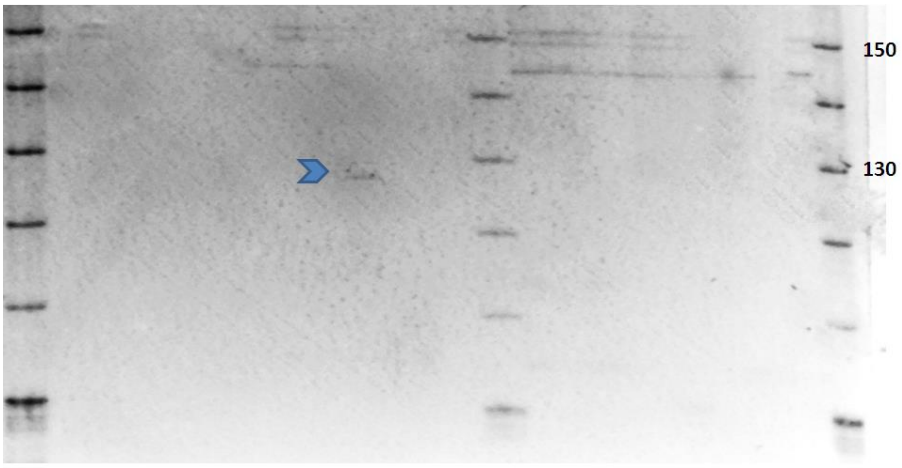


c.



d.





e.

ภาพที่ 5 รูปแบบและขนาดของอัลลีลในไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง Hrug01 (a), Hrug07 (b), Rcat21 (c) Rcatj44 (d) และ Rcatj54 (e) จากการวิเคราะห์ตัวอย่างกบพื้นเมืองจากจังหวัดนครศรีธรรมราช

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการประยุกต์ใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์มาช่วยในการจำแนกชนิดกบพื้นเมืองที่นิยมเลี้ยงของไทยไม่ว่าจะเป็นกบนา กบจาน หรือกบลูกผสมของทั้งกบนาและกบจาน และกบต่างถิ่นคือกบบูลฟร๊อก โดยทดสอบเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 16 ตำแหน่งและเลือกใช้ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มสารพันธุกรรมในกบได้ และให้ผลขนาดอัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์ที่ต่างกัน หรือให้ผลแตกต่างกันในลักษณะที่มีผลผลิตพีซีอาร์หรือไม่มีก็ได้ จำนวน 5 ไพรเมอร์ คือ Hrug01 Hrug07 RcatJ21 RcatJ44b และ RcatJ54 โดยแบ่งเป็นไพรเมอร์ที่ให้ขนาดไมโครแซทเทลไลท์ของกบพื้นเมืองและกบบูลฟร๊อกแตกต่างกันจำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ Hrug01 และ RcatJ44b และเป็นไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ในกบบางชนิดจำนวน 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ Hrug07 RcatJ21 และ RcatJ54 ซึ่งการวิเคราะห์จำเป็นต้องใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์หลายๆ ตำแหน่งประกอบกันเพื่อความแม่นยำยิ่งขึ้นในการจำแนกชนิด

อย่างไรก็ตามผลจากงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบสถานภาพของกบที่มีการเพาะเลี้ยง และในธรรมชาติ และพัฒนาไปสู่การศึกษาการปนเปื้อนทางพันธุกรรมของกบต่างถิ่นในกบพื้นเมืองและระดับการคุกคามในธรรมชาติของกบต่างถิ่นอีกทางหนึ่ง ซึ่งทางคณะผู้วิจัยมีโครงการต่อเนื่องเพื่อจะศึกษาเพิ่มเติมต่อไป โดยเปรียบเทียบอัตราการปนเปื้อนในธรรมชาติระหว่างพื้นที่ที่ยังไม่มีการเลี้ยงกบบูลฟร็อกหรือมีการเลี้ยงน้อยกับพื้นที่ที่มีการเลี้ยงกบบูลฟร็อกมานานหรือมีการเลี้ยงมาก ตลอดจนศึกษาลักษณะที่แสดงออกของกบลูกผสมที่เกิดจากกบบูลฟร็อกและกบพื้นเมืองจากการเพาะเลี้ยงตลอดจนพัฒนาการของกบลูกผสมจนถึงระยะตัวเต็มวัย เพื่อใช้ประกอบการประเมินการปนเปื้อนทางพันธุกรรมของกบบูลฟร็อกในธรรมชาติ โดยขยายการศึกษาเป็นการรวบรวมตัวอย่างจากทั่วประเทศ ซึ่งจะดำเนินการในปีงบประมาณ 2557

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณจำนง บุญเลิศ จำนงค์ฟาร์ม อำเภอพาน จังหวัดเชียงราย คุณมนูญ เทศนำ ฟาร์มกบอำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ คุณสมพร จันทสุวรรณ ฟาร์มกบสมพร อำเภอพระพรหม จังหวัดนครศรีธรรมราช คุณเสาวคนธ์ รุ่งเรือง คุณทิวารัตน์ เถลิงเกียรติลีลา ผอ.วิชัย วัฒนกุล คุณสุวิมล สี่หิรัญวงศ์ และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพัทลุง ผศ.ทองยุ่น คลองทองไทร สาขาเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสานวิทยาเขตกาฬสินธุ์ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างกบ ให้การช่วยเหลือ และให้คำแนะนำในการรวบรวมตัวอย่างเพื่อการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ทองยุ่น คลองทองไทร. ๒๕๕๑. การปรับปรุงพันธุ์กบนา. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ๒(๑): ๙๓-๑๐๑.

ทองยุ่น ทองคลองไทร อุไร กุลบุญ และ สุนทร ศรีสารคาม. ๒๕๔๗. การเพาะพันธุ์กบลูกผสม (กบนาX กบจาน) รุ่นที่ ๑. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตกาฬสินธุ์. กาฬสินธุ์. ๑๒ หน้า.

ธัญญา จั่นอาจ. ๒๕๔๖. คู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย. ซีเอ็ดยูเคชั่น. กรุงเทพฯ. ๑๗๕ หน้า.

สำนักนโยบายและแผนทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม. กำลังตีพิมพ์. คู่มือทะเบียนชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่ควรป้องกันควบคุม กำจัด ของประเทศไทย.

อภิรดี หันพงศ์กิตติกูล วงศ์ปฐม กมลรัตน์ และ สุภาภรณ์ ชาวสวน. ๒๕๕๓. การจำแนกชนิดปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิดและลูกผสมในวงศ์ปลาสวายโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ. วารสารการประมง ๖๓(๑): ๓๙-๔๖.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. ๒๕๔๓. พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ๒๐๓ หน้า.

อุทัยรัตน์ ณ นคร และวงศ์ปฐม กมลรัตน์ (บรรณาธิการ). ๒๕๕๑. พันธุศาสตร์ประชากรเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. ๒๑๘ หน้า.

Austin,J.D., Davila, J.A., Lougheed, S.C. and Boag, P.T. 2003. Genetic evidence for female-biased dispersal in the bullfrog, Rana catesbeiana (Ranidae). *Mol. Ecol.* 12 (11), 3165-3172.

Campton. D.E. 1987. Natural hybridization and introgession in fishes: methods of detection and genetic interpretations. In Population Genetics and fisheries Management (Ryman, N. and Utter, F. eds), pp. 161-192, University of Waxhington Press.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/

http://www.nicaonline.com/articles9/site/view_article.asp?idarticle=106

Leary, R.E. Gould W.R. and G.K. Sage. 1996. Success of basibranchial teeth in indicating pure populations of rainbow trout and failure to indicate pure populations of westlope cutthroat trout. *N. Am. J. Fish.* Manage. 16: 210- 213.

Rhymer, J.M. and Simberloff, D. 1996. Extinction by hybridization and introgession. *Annu. Rev. Ecol. Syst*. 27: 83-109.

Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 34(1): 223-225.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2,100 pp.

Shao, C., Wang,Y. and Qiao,N. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in tiger frog (Hoplobatrachus rugulosus). *Conserv. Genet.* 10 (5), 1601-1603.

Taylor, E.H. 1962. The amphibian fauna of Thailand. The university of Kansus science bulletin. XLIII(8) 278-594.

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

Zhan A.B., J.J. Hu, X.L. Hu, W. Lu, M.L. Wang, W. Peng, M. Hui and Z.M. Bao . 2007. Fast identification of scallop adductor muscles using species-specific microsatellite markers. European Food Research and Technology. Springer Berlin. 1438-2385 (Published Online)