นิพนธ์ต้นฉบับ

การแยกชนิดกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* และ กุ้ง *Penaeus* ชนิดอื่นโดยวิธี PCR-RFLP ของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI)

อมรรัตน์ พงศ์ดารา[1] วัชรสุดา หวลกะสิน[2] วราพร วรรณนา[3]
อุตส่าห์ จันทร์อำไพ[4] และ วิไลวรรณ โชติเกียรติ[5]

Abstract

Phongdara, A., Hualkasin, W., Wanna, W., Chanumpai, A. and Chotigeat, W.

Species identification of white shrimps *Litopenaeus vannamei* and other *Penaeus* sp. by using PCR-RFLP of Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) gene

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(4) : 467-478

**The morphology of imported white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is similar to other native white shrimp of the Thai peninsula (*Penaeus merguiensis, Penaeus silasi* and *Penaeus indicus*) and could not be separated clearly in the juvenile stage. It causes the mixture of them in the culture pond leading to problems on the farm. This work identified the different pattern of cytochrome oxidase subunit I (COI) gene in mitochondrial DNA (mtDNA) of 7 species (*Litopenaeus vannamei, Penaeus merguiensis, Penaeus indicus, Penaeus*

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

[1]D.Eng.(Biotechnology), รองศาสตราจารย์ [2]วท.บ.(เทคโนโลยีชีวภาพ) [3]วท.บ.(เทคโนโลยีชีวภาพ) [4]Ph.D.(Biochemistry) [5]Ph.D. (Biotechnology), รองศาสตราจารย์, ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: pamornra@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 7 มกราคม 2547 รับลงพิมพ์ 16 มีนาคม 2547

***silasi, Penaeus monodon, Penaeus semisalcatus* and *Metapenaeus* sp.) using PCR-RFLP technique. The COI gene fragment was amplified by PCR method and subsequently cleaved by restriction enzyme, *Rsa*I, providing specific bands, 282 bp and 526 bp in *L. vannamei*, 300 and 582 bp in *P. silasi*, 295 bp and 555 bp in *P. monodon*, 376 bp and 524 bp in *P. semisulcatus*, and 100 bp and 800 bp in *Metapenaeus* sp; four specific bands, 142 bp, 152 bp, 240 bp and 360 bp in *P. merguiensis* and 282 bp, 248 bp and 334 bp in *P. indicus*. This method can be applied to identify and clearly separate the pacific white shrimp (*L. vannamei*) from other morphologically similar species and distant species.**

Key words : PCR-RFLP, white shrimp, mtDNA, COI

บทคัดย่อ

อมรรัตน์ พงศ์ดารา วัชรสุดา หวลกะสิน วราพร วรรณนา อุตส่าห์ จันทร์อำไพ และ วิไลวรรณ โชติเกียรติ

การแยกชนิดกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* และ กุ้ง *Penaeus* ชนิดอื่นโดยวิธี PCR-RFLP ของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI)

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2547 26(4) : 467-478

กุ้งขาวแปซิฟิก *Litopenaeus vannamei* เป็นกุ้งนำเข้าที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับกุ้งขาวพื้นเมืองในน่านน้ำไทย (*Penaeus merguiensis, Penaeus silasi* และ *Penaeus indicus*) และไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนในระยะตัวอ่อน ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการปลอมปนขึ้นในบ่อเลี้ยงและสร้างปัญหาให้กับฟาร์มเพาะเลี้ยง งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการจำแนกกุ้งจำนวน 7 ชนิด (*Litopenaeus vannamei, Penaeus merguiensis, Penaeus indicus, Penaeus silasi, Penaeus monodon, Penaeus semisalcatus* และ *Metapenaeus* sp.) โดยอาศัยแบบแผนดีเอ็นเอที่ต่างกันของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ซึ่งเป็นยีนบน mitochondria ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ดีเอ็นเอของยีน COI ถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I ทำให้ได้แบบแผนแสดงความแตกต่างของแถบที่มีความจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ ได้แก่ แถบจำเพาะ 282 bp และ 526 bp ของ *L. vannamei,* 300 bp และ 582 bp ของ *P. silasi,* 295 bp และ 555 bp ของ *P. monodon,* 376 bp และ 524 bp ของ *P. semisulcatus,* 100 bp และ 800 bp ของ *Metapenaeus* sp., แถบจำเพาะ 4 ขนาดคือ 142 bp, 152 bp, 240 bp และ 360 bp ของ *P. merguiensis* และแถบจำเพาะ 282 bp, 248 bp และ 334 bp ของ *P. indicus* วิธีการนี้สามารถใช้ในการจำแนกกุ้งขาว (*L. vannamei*) ออกจากกุ้งชนิดอื่นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งที่คล้ายคลึงและแตกต่างกันได้อย่างชัดเจน

การเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยได้ถูกพัฒนาอย่างต่อเนื่อง จะเห็นได้ว่านอกเหนือไปจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแล้ว ก็ยังมีการเลี้ยงกุ้งชนิดอื่นอีกหลายชนิด ทั้งนี้เพราะการเลี้ยงกุ้งเพียงชนิดเดียวอาจก่อให้เกิดปัญหาอื่นๆ ตามมาโดยเฉพาะเรื่องของโรคระบาด ปัจจุบันยังพบว่ากุ้งกุลาดำอยู่ในช่วงวิกฤติทั้งด้านราคา ตลาด และปัญหาเรื่องสารตกค้าง เกษตรกรจึงได้หาทางเลือกอื่นเช่นหันมาเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิก ซึ่งเป็นกุ้งต่างถิ่นที่นำเข้ามาจากแถบทวีปอเมริกาเหนือ มีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* เป็นกุ้งที่เลี้ยงได้ทั้งระบบธรรมชาติและระบบกึ่งหนาแน่น ลักษณะพิเศษของกุ้งชนิดนี้คือสามารถสร้างความคุ้นเคยหรือปรับลักษณะนิสัยภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงได้ดี สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในบริเวณพื้นที่ชายฝั่ง หรือบริเวณพื้นที่ที่มีความเค็มต่ำ สาเหตุหลักที่ทำให้เป็นที่นิยมในการเพาะเลี้ยงของเกษตรกรไทยคือเป็นสายพันธุ์ดีผ่านการคัดสรรมาจนแน่ใจว่าโตเร็ว ให้ผลดี และมีตลาดทั่วโลกที่มีความต้องการสูง โดยเฉพาะตลาดอียูและอเมริกา ทำให้เพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร ถึงแม้ว่าลูกกุ้งขาวแปซิฟิกจะมี

ราคาแพงกว่าลูกกุ้งกุลาดำ แต่ค่าใช้จ่ายในเรื่องของอาหาร สารเคมี และยาต่างๆ ใช้น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งกุลาดำ

ส่วนกุ้งขาวท้องถิ่นที่มีอยู่แถบเอเชียแปซิฟิกซึ่งรวมประเทศไทยด้วยนั้นแบ่งออกเป็น 4 ชนิดคือ *Penaeus merguiensis, P. indicus, P. silasi* และ *P. penicillatus* จากรายงานการสำรวจในประเทศไทยโดย Chaitiamvong และ Supongpan (1992) และ อมรรัตน์ และคณะ (2546) พบว่ากุ้งขาวในประเทศไทยส่วนมากเป็น *P. merguiensis* และ *P. silasi* โดยพบชนิดแรกเป็นจำนวนมาก กุ้งทั้งสองชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน หากดูอย่างผิวเผินจะไม่สามารถแยกออกจากกันได้เลย การเรียกชื่อสามัญของ *P. merguiensis* ในประเทศไทยคือกุ้งแชบ๊วย แต่ต่างประเทศเรียก banana shrimp หรือ กุ้งกล้วย การเปรียบเทียบระหว่างกุ้งแชบ๊วยและกุ้งขาวแปซิฟิก *L. vannamei* แม้ลักษณะตัวเต็มวัยจะมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่การแยกความแตกต่างของตัวอ่อน (larvae) กลับทำได้ยาก ความไม่ชัดเจนของการจำแนกโดยใช้วิธีตรวจสอบรูปร่างของตัวอ่อนกุ้งนี้ยังรวมไปถึงการแยกระหว่างกุ้งชนิดอื่นๆ ที่สำคัญอีก เช่น กุ้งกุลาดำและกุ้งกุลาลาย เป็นต้น จึงก่อให้เกิดปัญหาการปลอมปนของลูกกุ้งที่นำมาเพาะเลี้ยง ทำให้ผู้เลี้ยงสูญเสียทั้งเวลาและงบประมาณ เพราะกุ้งแต่ละชนิดต้องการวิธีการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีตรวจทางโมเลกุลเพื่อจำแนกกุ้งชนิดต่างๆ ขึ้น โดยยีนที่สนใจ ได้แก่ cytochrome oxidase subunit I (COI) เนื่องจากเป็นยีนที่มีรายงานการเรียงลำดับเบสและกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตต่างๆ มากมาย (Morlais and Severson, 2002; Wilson *et al*., 2000) และเป็นยีนที่นิยมศึกษากันมากในแง่ของการจำแนกชนิด สายพันธุ์ และศึกษาโครงสร้างประชากรของสิ่งมีชีวิตประเภทต่างๆ (Baldwin *et al*., 1998; Gusmão *et al*., 2000; Stahls and Nyblom, 2000) ยีน COI นี้พบทั้งในนิวเคลียส (nuclear DNA) และไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA) ในไมโตคอนเดรียยีน COI เป็นยีนของเอนไซม์ที่มีชื่อว่า cytochrome c oxidase subunit I ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวสุดท้ายของกระบวนการขนส่งอิเลคตรอน (electron transport chain) ภายในไมโตคอนเดรีย (Saraste, 1990) การที่นักวิจัยนำข้อมูลของ mitochondrial COI มาใช้งานเพราะสามารถทำการทดลองได้ง่ายเนื่องจากไมโตคอนเดรียเป็นออร์แกเนลที่มีจำนวนหน่วยมากกว่า 1000 หน่วยต่อ 1 เซลล์ จำนวนหน่วย (copy number) ของยีน COI จึงมากตาม ทำให้การเพิ่มจำนวนของยีนด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ทำได้ง่าย นอกจากนั้นยังเป็นยีนนี้มีลำดับของกรดอะมิโนที่คงที่ (มีการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโนน้อยมาก) แต่มีความหลากหลายของลำดับเบสสูง (Seraste, 1990; Gennis, 1992) เหมาะสำหรับเปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีเลือดชิด (closely related species)

ในการทดลองนี้คณะผู้วิจัยสนใจศึกษายีน COI เพื่อใช้ในการแยกกุ้งชนิดต่างๆ ออกจากกันโดยอาศัยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว ไม่ต้องอาศัยความชำนาญด้านสัณฐานวิทยาและสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก แม้จะมีข้อจำกัดในด้านค่าใช้จ่ายที่ต้องใช้สารเคมีซึ่งเป็นเอนไซม์ราคาแพง แต่ปัจจุบันก็สามารถลดต้นทุนโดยอาจใช้เอนไซม์ที่ผลิตเองในห้องปฏิบัติการไม่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้งเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอและเทคนิคประกอบอื่นๆ ตลอดจนเครื่องมือได้ถูกพัฒนาไปมากพร้อมที่จะนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการเล็กๆ ได้

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างกุ้ง

ตัวอย่างกุ้งโตเต็มวัย 7 สายพันธุ์ได้มาจากแหล่งต่างๆ ดังต่อไปนี้ *P. merguiensis, P. monodon, P. semisalcatus* จาก จ.สงขลา, *P. indicus* จาก South Africa, *P. silasi* จาก จ.นครศรีธรรมราช, *Metapenaues* sp. จาก จ.สงขลา และ *L. vannamei* จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จ.ตรัง

2. ตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

นำตัวอย่างกุ้งมาแยกชนิดด้วยการดูรูปสัณฐานตามวิธีของ Grey และคณะ (1983) และ Carpenter และ Niem (1998) โดยตรวจสอบลักษณะของคาราเปส (carapace), กรี (rostrum), สันกรี (rostral crest), ร่องบนคาราเปส (adrosal carina) และขาคู่ที่สาม (third maxil-

leped) เพื่อแยกชนิดของกุ้งให้ถูกต้อง

3. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอ (Total genomic DNA) จากเนื้อเยื่อกุ้งโดยตัดส่วนของกล้ามเนื้อนำมาสับให้ละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่มี 100 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7.5), 1% SDS และ 1 μg/ml Proteinase K บ่มที่ 55ºC เป็นเวลา 2 ชม. แล้วนำสารละลายไปสกัดดีเอ็นเอต่อด้วย phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 2 ครั้ง นำเฉพาะส่วนใสไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเกลือ 3M NaOAc และ 95% ethanol แล้วล้างตะกอนให้สะอาดด้วย 70% ethanol ปล่อยให้ตะกอนแห้งแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์

4. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI)

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ COI ซึ่งจะมีขนาดประมาณ 900 bp ด้วยวิธี PCR โดยใช้ดีเอ็นเอ 50-100 ng ในปฏิกิริยา 25 μl ซึ่งประกอบด้วย 200 μM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 unit ของ *Taq* DNA polymerase และ COI primer ที่มีความเข้มข้น 0.25 μM แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลำดับเบสของ COI primer คือ mtD8: 5'- CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GG-3' และ mtD12: 5'-TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A-3' (Simon *et al.*, 1994) สำหรับโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วย 95ºC นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ, 94ºC นาน 30 วินาที, 45ºC นาน 30 วินาที และ 72ºC นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย 72ºC นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบเวลานำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น standard marker

5. การเปรียบเทียบลำดับเบสของ Cytochrome oxidase subunit I (COI) และการสร้าง Phylogenetic tree

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับเบสโดย Applied Biosystems 377 sequencer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) แล้วนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) เพื่อหาเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยกชนิดของกุ้งได้ จากนั้นหาความสัมพันธ์ของตัวอย่างทั้งหมดจากลำดับเบสโดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธีการหาระยะห่างทางพันธุกรรมตามวิธี Kimura's two-parameter model (Kimura, 1980) และ neighbor-joining ด้วยโปรแกรม PHYLIP package (Felsenstein, 1993)

6. การตัด COI DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I (GTAC) โดยใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 1-2 μg, เอนไซม์ 1-5 units บ่มที่ 37ºC เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis

ผลการทดลอง

การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของตัวอย่าง

กุ้งสายพันธุ์ต่างๆ ที่ทราบชนิดแน่นอนและถูกใช้เป็นตัวอย่างมาตรฐานในการทดลองได้จากงานวิจัยของ Hualkasin และคณะ (2003) ซึ่งผู้วิจัยได้สำรวจตัวอย่างกุ้งจำนวนมาก (237 ตัวอย่าง) จากอ่าวไทยและทะเลอันดามัน คัดเลือกตัวอย่างที่มีลักษณะตรงตามวิธีการแยกชนิดของกุ้ง *Penaeus* คือ ตรวจสอบเพศ ลักษณะ carapace, rostrum, rostral crest, adrosal carina และ third maxilleped ในที่สุดได้ตัวอย่างที่มีลักษณะตามต้องการซึ่งแยกชนิดได้เป็น *P. merguiensis, P. silasi, P. semisalcatus, P. monodon* และ *Metapenaeus* sp. แต่ไม่พบตัวอย่างที่เป็น *P. indicus* และ *P. penicillatus* จึงขออนุเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอของ *P. indicus* จาก South Africa สำหรับตัวอย่างกุ้ง *L. vannamei* ได้รับความอนุเคราะห์มาจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จ.ตรัง

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน COI

เมื่อใช้ primer mtD8-mtD12 เพิ่มจำนวนยีน COI กับตัวอย่างทั้ง 7 ชนิด พบว่าได้ผลผลิต PCR (PCR product) ที่มีขนาดใกล้เคียงกันคือ ประมาณ 900 bp (Table 1) โดยขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากกุ้งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันไม่มาก (ประมาณ 20-50 bp) จึงไม่

เพียงพอที่จะแยกความแตกต่างของแต่ละแถบจากกันได้ชัดเจนด้วย agarose gel electrophoresis เพียงอย่างเดียว เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงนำผลผลิตของ PCR ที่ได้ไปหาการเรียงลำดับเบสและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

การเรียงลำดับเบสของยีน COI

เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับเก็บไว้ในฐานข้อมูลของจีโนมและเพื่อหาเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความเหมาะสมในการย่อยผลผลิตของ PCR ให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ที่สามารถแยกชนิดของกุ้งได้ จึงนำผลผลิต PCR ของยีน COI จากตัวอย่างของ *P. merguiensis, P. indicus* และ *P. silasi* ไปหาการเรียงลำดับเบส (ข้อมูลการเรียงลำดับเบสของตัวอย่างอื่นที่เหลือสามารถนำมาได้จาก GenBank) ผลการเรียงลำดับเบสของตัวอย่างทั้ง 7 ชนิด สามารถนำมาเปรียบเทียบระหว่างชนิดได้ดังแสดงใน Figure 1 และสร้างเป็น phylogenetic tree ดัง Figure 2 จากการเรียงลำดับเบสที่ได้เมื่อนำไปใช้หาตำแหน่งที่สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ พบว่าหากตัดด้วย *Rsa*I สามารถใช้แยกชนิดของกุ้งทั้ง 7 ชนิดได้

การตัดผลผลิต PCR ของยีน COI ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ RsaI

ผลผลิต PCR ของยีน COI ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I จากนั้นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ กันถูกแยกด้วย 2% agarose gel electrophoresis ผลการทดลองแสดงใน Table 1 และ Figure 3 พบว่ากุ้งขาวแปซิฟิก *L. vannamei* เมื่อตัดด้วย *Rsa*I ได้ดีเอ็นเอขนาด 282 bp และ 526 bp ขณะที่กุ้งขาวแชบ๊วยคือ *P. silasi, P. merguiensis* และ *P. indicus* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้น, 4 ชิ้น และ 4 ชิ้น ตามลำดับคือ ขนาด 300 bp และ 582 bp (*P. silasi*), ขนาด 142 bp, 152 bp, 240 bp และ 360 bp (*P. merguiensis*) และขนาด 12 bp, 248 bp, 282 bp และ 334 bp (*P. indicus*) สำหรับ *P. merguiensis* และ *P. indicus* ใน Figure 3 พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ชิ้นแทนที่จะเป็น 4 ชิ้นดังรายงานใน Table 1 เนื่องจากดีเอ็นเอขนาด 142 bp และ 152 bp ของ *P. merguiensis* มีความใกล้เคียงกันมากไม่สามารถแยกจากกันได้ด้วย agarose gel electrophoresis แต่สามารถตรวจสอบได้ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis (ไม่ได้แสดงผล) และทำนองเดียวกันคือ ไม่สามารถมองเห็นดีเอ็นเอขนาด 12 bp ของ *P. indicus* จาก agarose gel แต่ที่เราทราบว่าตัดได้แถบขนาดนี้เพราะตรวจสอบจากผลการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ สำหรับกุ้ง *P. monodon, P. semisulcatus* และ *Metapenaeus* sp. เมื่อนำผลผลิต PCR ซึ่งมีขนาดที่ใกล้เคียงกันมาตัดด้วย *Rsa*I จะได้แถบดีเอ็นเออย่างละ 2 ขนาดที่แตกต่างกันคือได้ 295 bp และ 555 bp ใน *P. monodon*, 376 bp และ 524 bp สำหรับ *P. semisulcatus* และ 100 bp และ 800 bp สำหรับ *Metapenaeus* sp. ทั้งนี้จะเห็นว่าความแตกต่างของการเรียงลำดับเบสของยีน COI ในกุ้งแต่ละชนิดทำให้เกิดจุดตัดของ *Rsa*I แตกต่างกันไป และเราสามารถใช้คุณสมบัติเช่นนี้ในการทำ PCR-RFLP ของ COI ด้วย

Table 1. The summary of COI fragment cleaved by *Rsa*I in each species

Species	PCR product of COI (from primer mtD8-12) (bp)	The expected DNA fragment size before *Rsa*I cleaving (bp)
P. silasi	900	300, 582
P. merguiensis	876	142, 152, 240, 360
P. indicus	876	282, 12, 248, 334
L. vannamei	900	282, 526,
P. monodon	850	295, 555
P. semisulcatus	900	376, 524
Metapenaeus sp.	900	100, 800

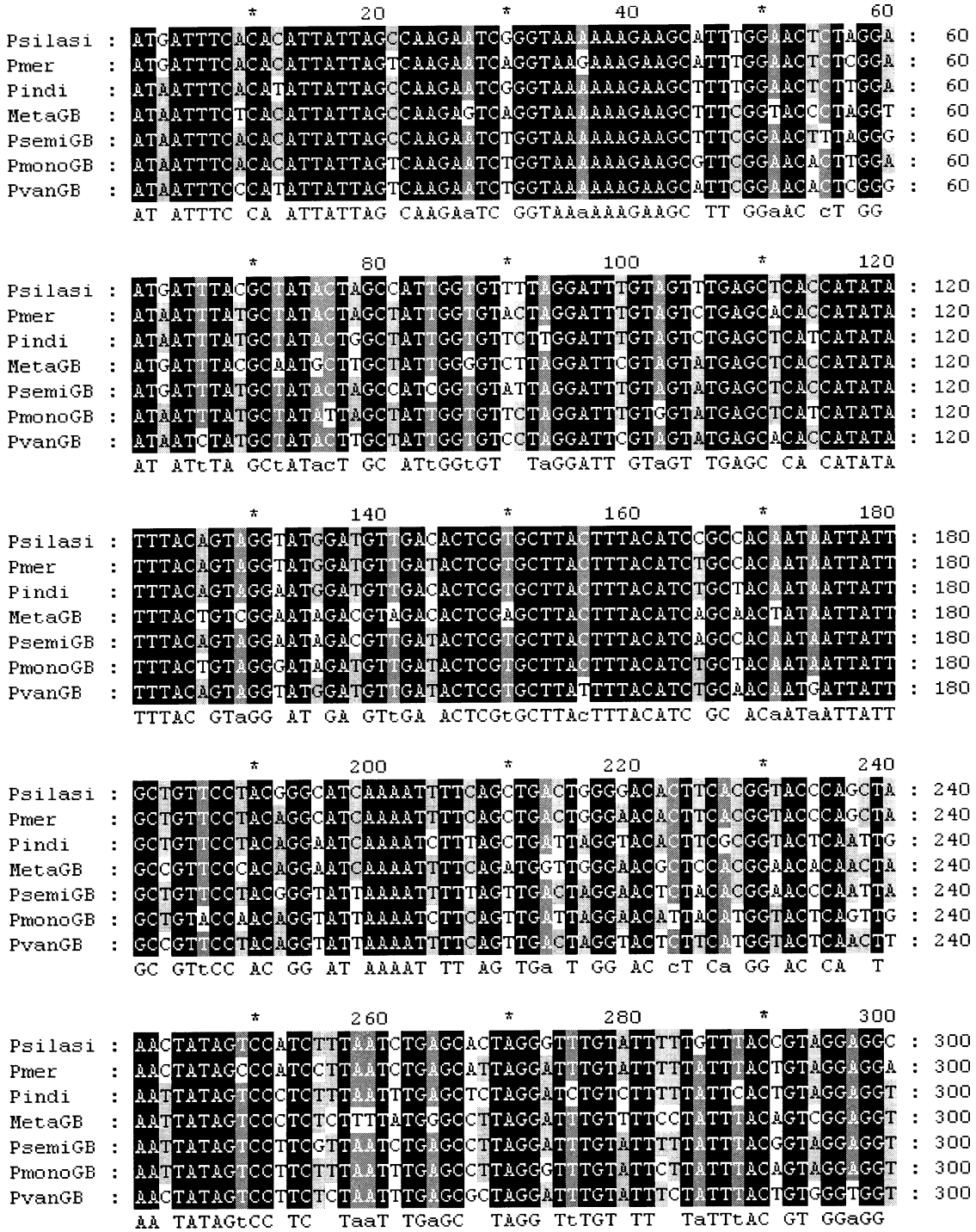


Figure 1. The nucleotide sequence alignment of COI gene (558 bp) in *P. silasi* (Psilasi), *P. merguiensis* (Pmer), *P. indicus* (Pindi), *Metapenaeus affinis* (MetaGB), *P. semisulcatus* (PsemiGB), *P. monodon* (PmonoGB) and *L. vannamei* (PvanGB). (GB = sequences retrieved from GenBank database)

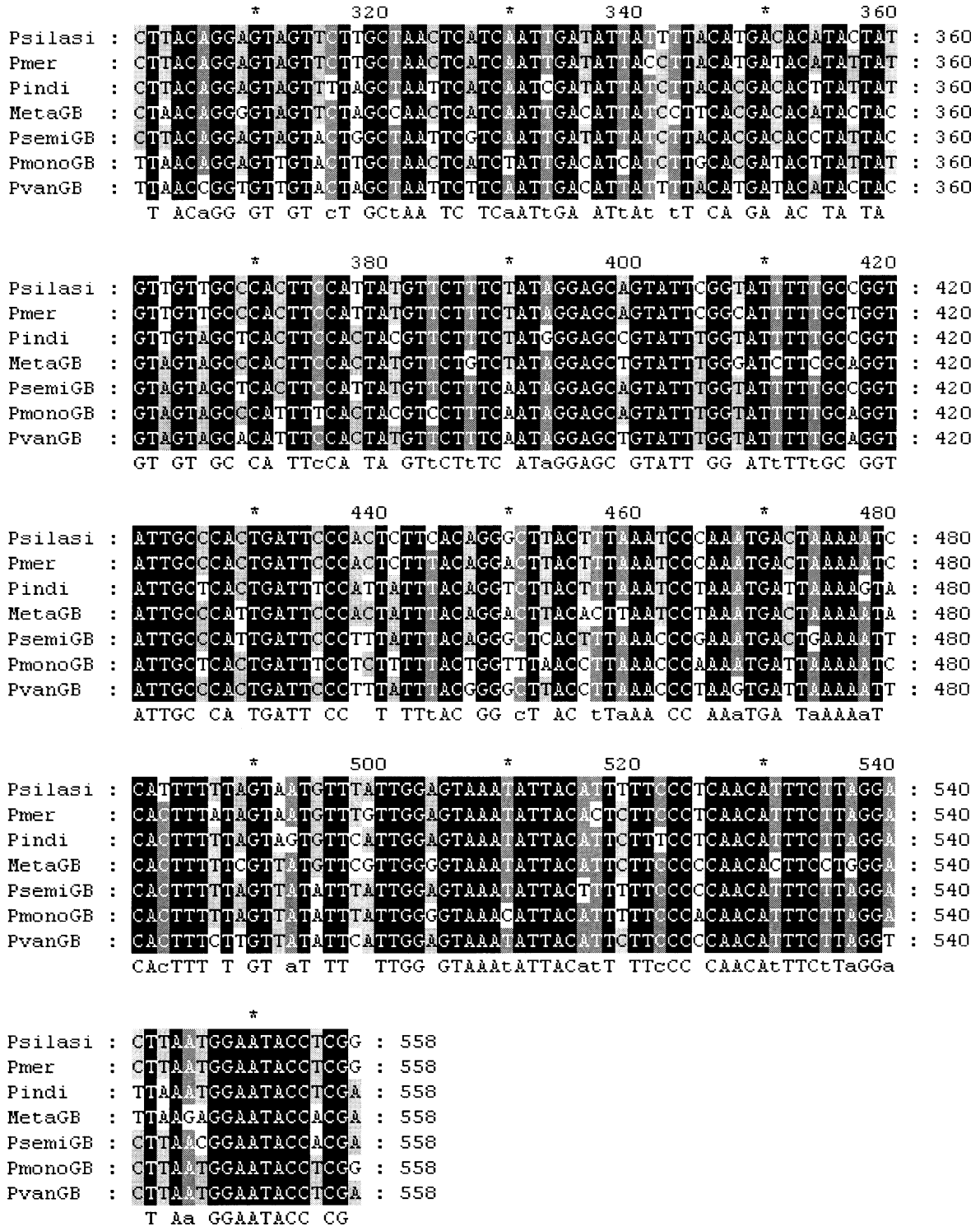


Figure 1. continued

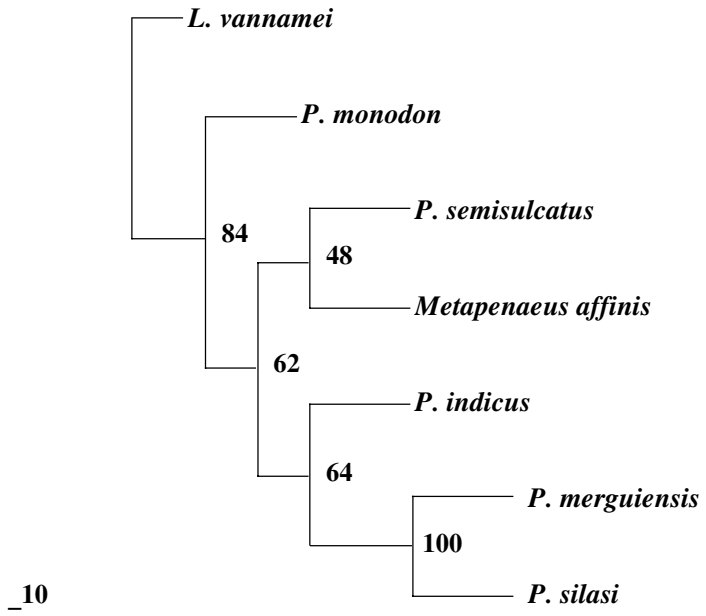
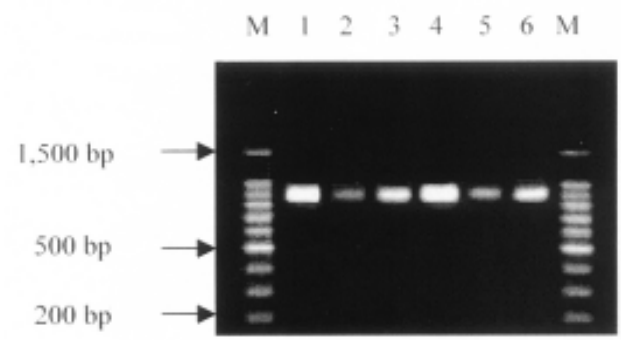


Figure 2. A neighbor-joining tree constructed from the percentage of sequence divergence between pairs of COI sequences. The percent bootstrapping values (1000 replicates) between branching groups are indicated. *L. vannamei* (PvanGB), *P. monodon* (PmonoGB), *P. semisulcatus* (PsemiGB), *Metapenaeus affinis* (MetaGB), *P. indicus* (Pindi), *P. merguiensis* (Pmer) and *P. silasi* (Psilasi). (GB = sequences retrieved from GenBank database). _10 indicates the scaled branches phylogenetic tree: lengths of branches are proportional to the number of molecular changes.

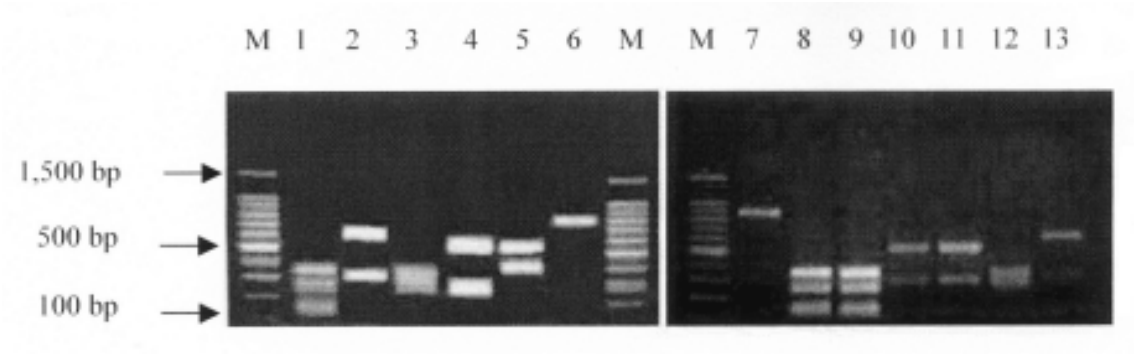
เอนไซม์ *Rsa*I แล้วปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่เป็นแบบแผนที่แตกต่างกันและทำให้จำแนกชนิดออกจากกันได้โดยง่าย

วิจารณ์

PCR เป็นวิธีการที่สะดวกและรวดเร็ว ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง จะเห็นว่าปัจจุบันวิธีดังกล่าวได้เข้ามามีบทบาทต่อการตรวจวิเคราะห์สิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นการตรวจหาชนิดของไวรัส จุลินทรีย์ เชื้อรา พืชและสัตว์ วิธีการนี้ถูกพัฒนาให้ทำได้ง่ายขึ้นเป็นลำดับ ตลอดจนสารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ก็มีราคาถูกลง ทั้งนี้เนื่องจากการทำ PCR นอกจากจะเป็นวิธีที่สามารถประยุกต์ใช้กับงานต่างๆ ได้หลากหลายแล้วยังทำให้ได้ข้อมูลของสิ่งมีชีวิตโดยละเอียด สามารถเก็บไว้เป็นฐานข้อมูลสำหรับเปรียบเทียบและโยงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อศึกษาวิวัฒนาการ การเคลื่อนที่ การแพร่กระจาย การระบาด และอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ได้ (Taylor *et al*., 1996; Flegel, 1999; Withyachumnarnkul, 1999; Thakur *et al*., 2002; Linton *et al*., 2002; Cristescu *et al*., 2003) ในที่นี้ผู้วิจัยได้นำวิธีการมาพัฒนาเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของกุ้ง เป็นที่ทราบกันดีว่าการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นงานเกษตรอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อประเทศไทยมาก และมูลค่าการส่งออกของกุ้งที่เพาะเลี้ยงสูงเป็นอันดับหนึ่งของโลก (ปี 2537-2538) ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงมิได้จำกัดเพียงการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแต่เกษตรกรได้หันไปเลี้ยงกุ้งชนิดต่างๆ หลากหลายขึ้นโดยส่วนมาก ได้แก่ กุ้งในวงศ์ *Penaeus* ทั้งนี้ด้วยเหตุผลทางด้านการค้า ราคา และเพื่อหลีกเลี่ยงการระบาดของโรคที่เกิดจำเพาะกับกุ้งชนิดใดชนิดหนึ่ง จึงทำให้เกิดความจำเป็นที่ต้องพัฒนาสายพันธุ์กุ้งชนิดต่างๆ ตามมาและทำให้การจำแนกชนิดต้องเป็นไปอย่างถูกต้อง ปกติการจำแนกชนิดของกุ้งสามารถทำได้โดยตรวจสอบสัณฐานวิทยาจากกุ้งที่โตเต็มวัย เอกสารหรือ



A



B

Figure 3. A) The uncut PCR product of COI fragment in *P. merguiensis, P. silasi, P. indicus, P. monodon, P. semisulcatus* and *Metapenaeus* sp. (lane no.1, 2, 3, 4, 5 and 6, respectively).
B) The uncut PCR product of *L. vannamei* (lane no.7) and the different DNA patterns of COI fragment after *Rsa*I digestion of *P. merguiensis* (lane no.1, 8 and 9), *P. silasi* (lane no.2 and 13), *P. indicus* (lane no.3 and 12), *L. vannamei* (lane no.10 and 11), *P. monodon* (lane no.3 and 12), *P. semisulcatus* (lane no.5) and *Metapenaeus* sp. (lane no.6). M = 100 bp marker (Promega).

ข้อมูลดังกล่าวได้มีการจัดทำโดยนักสัณฐานวิทยา (Grey *et al*., 1983; Chaitiamvong and Supongpan, 1992; Carpenter and Niem, 1998) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยสัณฐานวิทยาอย่างเดียวก็มีข้อจำกัด เมื่อสิ่งมีชีวิตมีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมาก หรือบางครั้งอาจมีรูปร่างต่างกันอันเนื่องจากสิ่งแวดล้อมทั้งๆ ที่มีพันธุกรรมเหมือนกัน (Haulkasin *et al*., 2003; Wanna *et al*., 2003) หากจะให้ได้ผลที่แม่นยำยิ่งขึ้นจึงควรตรวจสอบจากดีเอ็นเอควบคู่ไปด้วย

เราสามารถแบ่งประเภทของดีเอ็นเอตามแหล่งที่มาได้เป็น nuclear DNA และ organelle DNA (ได้แก่ mitochondrial DNA) การศึกษา nuclear DNA ทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาระบบวิทยาเชิงโมเลกุล (molecular systematics) และวิวัฒนาการ (evolution) ส่วนข้อมูลการเรียงลำดับเบสของ mitochondrial DNA ซึ่งมีอัตราการ diverse มากกว่า nuclear DNA 3 เท่า (Palumbi and Benzie, 1991) มีความเหมาะสมในการนำมาใช้หาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีสายเลือดใกล้ชิดกัน (closely related species) ดังเช่นกุ้งขาวในวงศ์ *Penaeus* และยังเหมาะที่จะนำไปใช้ในการศึกษาโครงสร้างประชากร (population structure) ด้วย งานวิจัยนี้ให้ความสนใจไปที่กุ้งขาวเนื่องจากเป็นกุ้งที่กำลัง

เป็นที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลาย จนทำให้เกิดการปลอมปนของลูกกุ้ง และยังได้ขยายผลไปถึงการตรวจสอบกุ้งกุลาดำและกุลาลายซึ่งเป็นกุ้งที่มีความคล้ายคลึงกัน ผู้วิจัยได้ศึกษาดีเอ็นเอจากส่วนของยีน COI ที่อยู่ที่ไมโตคอนเดรีย เนื่องจาก COI เป็นยีนที่ conserve มีการเปลี่ยนแปลงตามวิวัฒนาการไม่ช้าหรือเร็วเกินไป นักวิจัยส่วนใหญ่ใช้เป็นยีนเป้าหมายเพื่อการจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตจำนวนมาก จึงทำให้มีฐานข้อมูลที่หลากหลายและสมบูรณ์ สามารถนำมาเปรียบเทียบได้ง่าย และในส่วนของผู้วิจัยเองก็มีข้อมูลจากยีน COI ของกุ้งแชบ๊วยโดยละเอียด (Haulkasin *et al*., 2003; Wanna *et al*., 2003) จึงนำมาพัฒนาต่อจนได้วิธีการจำแนกชนิดของกุ้งที่มีความสำคัญ 7 ชนิด คือ *P. merguiensis, P. indicus, P. silasi, L. vannamei, P. monodon, P. semisalcatus* และ *Metapenaues* sp. จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย primer mtD8-mtD12 โดยปรับเปลี่ยนสภาวะให้เหมาะสมพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน COI จากกุ้งทั้ง 7 ชนิดได้ดีเมื่อใช้ annealing temperature ที่ 45ºC ได้ผลผลิตของ PCR ที่จำเพาะเพียงชิ้นเดียวไม่พบการปนเปื้อนของผลผลิตของ PCR ที่มาจากยีนอื่น เมื่อนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I ก็จะได้แบบแผนที่แยกความแตกต่างระหว่างชนิดอย่างชัดเจน ยกเว้นผลที่ได้จากกุ้ง *L. vannamei* (282, 526 bp) และกุ้ง *P. monodon* (295, 555 bp) เนื่องจากเทคนิค agarose gel electrophoresis ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (282→295 = 13 bp) และ (526→555 = 29 bp) แต่ก็สามารถเปลี่ยนเป็นแยกด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis หรือใช้ agarose ที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น nusieve gel เป็นต้น อย่างไรก็ตามในที่นี้ตั้งใจที่จะนำเสนอเพียงวิธีการที่ประหยัด และปัญหาการปลอมปนมักเกิดระหว่างลูกกุ้งขาวแปซิฟิกและกุ้งขาวท้องถิ่น ซึ่งไม่สามารถจำแนกความแตกต่างในระยะตัวอ่อนได้ แต่ไม่เป็นปัญหากับลูกกุ้งกุลาดำ ในขณะเดียวกันกลับมีปัญหาการปลอมปนระหว่างลูกกุ้งกุลาดำและกุ้งกุลาลาย ดังนั้นผลการวิจัยครั้งนี้จึงนับว่าเป็นประโยชน์กับการจำแนกคู่กรณีระหว่างกุ้งหลายชนิด

เมื่อเปรียบเทียบการเรียงลำดับเบสของ COI ระหว่างกุ้งแต่ละชนิดแล้วสร้างเป็น phylogenetic tree เพื่อดูความสัมพันธ์พบว่ากุ้งขาว 3 ชนิด (*P. merguiensis, P. silasi* และ *P. indicus*) มีสายเลือดใกล้ชิดกันโดยเฉพาะ *P. merguiensis* และ *P. silasi* สอดคล้องกับการรายงานโดยสัณฐานวิทยาที่กุ้งทั้งสามชนิดนี้อยู่ในกลุ่มย่อย Fenneropenaeus ส่วนกุ้งขาว *L. vannamei* ก็มีพันธุกรรมที่ห่างออกไป ผลการวิเคราะห์จาก phylogenetic tree ยังพบว่ากุ้งกุลาลายมีความสัมพันธ์ใกล้กับกุ้งตะกาด (*Metapenaeus* sp.) มากกว่ากุ้งกุลาดำ จะเห็นได้ว่างานวิจัยนี้นอกเหนือไปจากการได้ข้อมูลพื้นฐานที่กล่าวมาข้างต้นนี้แล้ว ในแง่การนำไปใช้งานการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ใช้เวลาทำการทดลองเพียง 1-2 วันก็จะทราบผล สามารถนำไปใช้กับตัวอย่างกุ้งวัยอ่อน ทั้งนี้เนื่องจากแบบแผนดีเอ็นเอจะไม่เปลี่ยนแปลงตามอายุต่างกับการตรวจสอบด้วยไอโซไซม์ซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงได้ตามอายุและสิ่งแวดล้อม วิธีการง่ายและรวดเร็วเหมาะที่จะนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการของเอกชนหรือหน่วยงานของรัฐที่ให้บริการตรวจสุขภาพกุ้งซึ่งมักต้องมีเครื่องมือสำหรับทำ PCR อยู่แล้ว อีกทั้งในอนาคตยังสามารถนำวิธีการนี้ไปใช้ในการตรวจสอบกุ้งชนิดอื่นๆ ที่มีอยู่ในประเทศไทยได้ซึ่งก็จะเป็นประโยชน์ในแง่ศึกษาความหลากหลายของชนิดของกุ้งที่มีอยู่ ทั้งนี้คาดว่าส่วนของลำดับเบสภายในยีน COI จะต้องมีความแตกต่างกัน แต่ส่วนที่นำมาใช้เป็น primer นั้นเป็นส่วนที่ออกแบบมาจากบริเวณที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก

สรุปผลการทดลอง

สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน COI จาก mitochondrial DNA ของกุ้ง 7 ชนิด โดยใช้เทคนิค PCR และเมื่อนำผลผลิต PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I จะได้แบบแผนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างกุ้งทั้ง 7 ชนิด วิธีการนี้สามารถนำไปใช้แยกลูกกุ้งขาว *L. vannamei* ออกจากลูกกุ้งขาวแชบ๊วยและกุ้งชนิดอื่นๆ รวมถึงยังสามารถใช้แยกลูกกุ้งกุลาดำและกุ้งกุลาลายออกจากกันได้อีกด้วย การตรวจสอบนี้เป็นวิธีการที่ง่ายสามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เทคนิคนี้เป็นประโยชน์สำหรับเกษตรกรที่จะได้มีการตรวจสอบสายพันธุ์ลูกกุ้งก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดผลิตผลที่ดีต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ รหัสโครงการ BT-B-06-2B-18-308 งบประมาณปี 2544-2546 ทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สำหรับนางสาววราพร วรรณนา สัญญาเลขที่ PHD/0085/2542 ขอขอบคุณนักวิชาการประมง คุณไพโรจน์ สิริมนตาภรณ์ สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจสอบสัณฐานวิทยาของตัวอย่างกุ้ง

เอกสารอ้างอิง

อมรรัตน์ พงศ์ดารา วิไลวรรณ โชติเกียติ และ อุตส่าห์ จันทน์-อำไพ. 2546. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อศึกษาพันธุกรรมของกุ้งแชบ๊วย รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

Baldwin, J.D., Bass, A.L., Bowen, B.W. and Clark, W.H. Jr. 1998. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp Penaeus, Mol. Phylogenet. Evol., 10: 399-407.

Carpenter, K.E. and Niem, V.H. 1998. The Living Marine Resources of the Western Central Pacific. 2nd ed. South Pacific Forum Fisheries Agency and the Norwegian Agency for International Development, Rome.

Chaitiamvong, S. and Supongpan, M. 1992. A Guide to Penaeoid Shrimps Found in Thai Waters. Australian Institute of Marine Science, Townsville, Australia.

Cristescu, M.E.A., Hebert, P.D.N. and Onciu, T.M. 2003. Phylogeography of Ponto-Caspian crustaceans: a benthic-planktonic comparison. Mol. Ecol., 12: 985-996.

Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5 c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.

Flegel, T.W. 1999. An overview of prawn viral disease work in Thailand: PCR for shrimp disease diagnosis. Manual of Molecular Diagnostics for Shrimp Viruses in the Asian Region. ACIAR-NSTDA(BIOTEC)-Crawford Fund.

Gennis, R.B. 1992. Sited-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of Rhodobacter sphaeroides: a brief review of progress to date. Biochimica et Biophysica Acta. 1101: 184-187.

Grey, D.L., Dall, W. and Baker, A. 1983. A guide to the Australian penaeid prawns. The Department of Primary Production, Darwin, Northern Territory.

Gusmão, J., Lazoski, C. and Sole-Cava, A.M. 2000. A new species of Penaeus (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. Mar. Biol., 137: 435-446.

Hualkasin, W., Sirimontaporn, P., Chotigeat, W., Querci, J. and Phongdara, A. 2003. Molecular Phylogenetic Analysis of White Prawns Species and the Existence of Two Clades in *Penaeus merguiensis*. J. Exp. Mol. Biol. Ecol., 296(1): 1-11.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111-120.

Linton, Y.M., Mordue (Luntz), A.J., Cruickshank, R.H., Meiswinkel, R., Mellor, P.S. and Dallas, J.F. 2002. Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. Medical and Veterinary Entomol., 16: 139-146.

Morlais, I. and Severson, D.W. 2002. Complete mitochondrail DNA sequence and amino acid analysis of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) from *Aedes aegypti*. DNA Sequence, 13: 123-127.

Palumbi, S.R. and Benzie, J. 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 1: 27-34.

Saraste, M. 1990. Structural features of cytochrome oxidase. Q. Rev. Biophys. 23: 331-366.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. America. 87:651-701.

Stahls, G. and Nyblom, K. 2000. Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. Mol. Phyl. Evol., 15: 235-241.

Taylor, D.J., Hebert, P.D.N. and Colbourne, J.K. 1996. Phylogenetics and evolution of the *Daphnia longispina* Group (Crustacaea) based on 12S rDNA sequence and allozyme variation. Mol. Phy. Evol. 5(3): 495-510.

Thakur, P.C., Corsin, F., Turnbull, J.F., Shankar, K.M., Hao, N.V., Padiyar, P.A., Adhusudhan, M., Morgan, K.L. and Mohan, C.V. 2002. Estimation of prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) by polymerase chain reaction in *Penaeus monodon* postlarvae at time of stocking in shrimp farms of Karnataka, India: a population-based study. Dis. Aquat. Org., 49: 235-243.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight metrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673-4680.

Wanna, W., Rolland, J.L., Bonhomme, F. and Phongdara, A. 2003. Population genetic structure of *Penaeus merguiensis* in Thailand based on nuclear DNA variation. (submitted)

Wilson, K., Cahill, V., Ballment, E. and Benzie, J. 2000. The complate sequence of the Mitochondrial genome of the Crustacean *Penaeus monodon*: are Malacostracan Crustaceans more closely related to Insect than Branchiopods. Mol. Biol. Evol., 17: 863-874.

Withyachumnarnkul, B. 1999. Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). Dis. Aquat. Org., 39: 21-27.