ความหลากหลายทางพันธุกรรมและยีนโฟลของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius ในประเทศไทย โดยวิธี PCR-RFLP ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

นางสาวดวงกมล ศิลุจจัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ หลักสูตรวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-552-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19472808 17 ก.ค. 2545

GENETIC DIVERSITY AND GENE FLOW OF GIANT TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* Fabricius IN THAILAND USING PCR-RFLP OF MITOCHONDRIAL DNA

MISS DUANGKAMON SILUDJAI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Programme of Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2000
ISBN 974-346-552-9

Thesis Title	GENETIC DIVERSITY AND GENE FLOW OF GIANT TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* Fabricius IN THAILAND USING PCR-RFLP OF MITOCHONDRIAL DNA
By	Miss Duangkamon Siludjai
Programme	Biotechnology
Thesis Adviser	Associate Professor Padermsak Jarayabhand, Ph.D.
Thesis Co-adviser	Sirawut Klinbunga, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

.....Dean of Faculty of Science

(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Padermsak Jarayabhand, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

ดวงกมล ศิลุจจัย : ความหลากหลายทางพันธุกรรมและยีนโฟลของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius ในประเทศไทย โดยวิธี PCR-RFLP ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (GENETIC DIVERSITY AND GENE FLOW OF GIANT TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* Fabricius IN THAILAND using PCR-RFLP of mitochondrial DNA) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา 124 หน้า. ISBN 974-346-552-9.

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำ จำนวน 5 แหล่งตัวอย่างในประเทศไทย (สตูล ตรัง และพังงา จากฝั่งอันดามัน ชุมพร และ ตราด จากฝั่งอ่าวไทย) ด้วยวิธี PCR-RFLP ของยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วยยีน 16S ribosomal (r) DNA ด้วย *Mbo* I และ intergenic region ของ cytochrome oxidase subunits I - II (COI-COII) ด้วย *Alu* I, *Mbo* I, *Hin* fI and *Dde* I พบ composite haplotypes ทั้งสิ้นจำนวน 37 haplotypes เมื่อสร้าง UPGMA dendrogramจากระยะห่างทางพันธุกรรมของแต่ละ composite haplotypes สามารถแบ่ง haplotypes ดังกล่าวออกเป็น 2 กลุ่ม (A และ B lineages) ซึ่งมีระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 2.558% จากการศึกษายังพบว่า รูปแบบ haplotypes จากการย่อย intergenic COI-COII ด้วย *Alu* I และ *Taq* I สามารถแสดงความถี่ของ lineages A และ B ได้อย่างแม่นยำ ส่งผลให้การวิเคราะห์ความถี่ phylogenetic lineages ในกุ้งกุลาดำมีความสะดวกและรวดเร็วขึ้น

ค่าเฉลี่ยของ haplotype diversity มีค่าเท่ากับ 0.8548 ± 0.0001 ในขณะที่ค่าเฉลี่ย nucleotide diversity ภายใน และระหว่างตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 3.3283% และ 3.3648% ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่า nucleotide divergence ของ 5 กลุ่มตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 0.0365% แสดงถึงการแบ่งแยกโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรกุ้งกุลาดำในประเทศไทย เมื่อทำการวิเคราะห์ geographic heterogeneity พบว่ากุ้งกุลาดำจากฝั่งทะเลอันดามันมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับกุ้งกุลาดำจากฝั่งอ่าวไทยอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.0001$) จากการทดลองครั้งนี้สามารถแบ่งกุ้งกุลาดำที่ศึกษาออกเป็น 2 กลุ่มประชากร (stocks) ประกอบด้วย ประชากร A (สตูล ตรัง และ พังงา) และประชากร B (ชุมพร และ ตราด) ผลจากการศึกษาครั้งนี้ยังแสดงถึงความเป็นไปได้ที่การอพยพของกุ้งกุลาดำเพศเมียจะไม่สมดุลกับการอพยพของกุ้งกุลาดำเพศผู้ (biased female gene flow) ระหว่างกุ้งกุลาดำจากชุมพร และ ตราด

ภาควิชา.....-..... ลายมือชื่อนิสิต.....ดวงกมล ศิลุจจัย.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางชีวภาพ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2543..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4072255723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD : *P.monodon* / PCR-RFLP/ GENETIC DIVERSITY

DUANGKAMON SILUDJAI : GENETIC DIVERSITY AND GENE FLOW OF GIANT TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* Fabricius IN THAILAND USING PCR-RFLP OF MITOCHONDRIAL DNA. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PADERMSAK JARAYABHAND, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : SIRAWUT KLINBUNGA, Ph.D. 124 pp. ISBN 974-346-552-9.

Genetic diversity of five geographic samples of *Penaeus monodon* in Thailand (Satun, Trang and Phangnga located in the Andaman Sea and Chumphon and Trat located in the Gulf of Thailand) was examined using PCR-RFLP of two mitochondrial genes composing of the 16S ribosomal (r) DNA digested with *Mbo* I and an intergenic region of cytochrome oxidase subunits I and II (COI-COII) digested with *Alu* I, *Mbo* I, *Taq* I, *Hin*f I and *Dde* I. Thirty-seven mtDNA composite haplotypes were identified and could be allocated into one or the other of two mtDNA lineages, A and B joined in a UPGMA dendrogram with the sequence divergence of 2.558%. The mtDNA haplotypes generated from digestion of an intergenic COI-COII with *Alu* I and *Taq* I represented these mtDNA lineages accurately offering simpler mtDNA typing in *P. monodon*. The average haplotype diversity of *P. monodon* mtDNA was 0.8548 ± 0.0001. The average nucleotide diversity within and between samples was 3.3283% and 3.3648%, respectively. The nucleotide divergence of five *P. monodon* samples was 0.0365% implying degrees of population subdivisions in Thai *P. monodon*. Significant geographic heterogeneity was observed between the Andaman Sea and the Gulf of Thailand samples ($P < 0.0001$). As a result, five *P. monodon* samples were differentiated to two different populations; A (Satun, Trang and Phangnga) and B (Chumphon and Trat). Results from this study indicated that potential female-mediated dispersal (biased female gene flow) may exist between *P. monodon* from Trat and Chumphon.

Department.....-.....
Field of study.....Biotechnology.....
Academic year.....2000.....

Student 's signature.....D. Siludjai.....
Advisor 's signature.....P. Jarayabhand.....
Co-advisor 's signature.....S. Klinbunga.....

ACKNOWLEGEMENTS

I am indebted to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Padermsak Jarayabhand for his suggestion throughout my study. I would also like to express my appreciation to my co-advisor, Dr. Sirawut Klinbunga for his great helps, guidance, suggestions in laboratory, data analysis and comment on my thesis.

I would like to express my heartfelt respect and thank Prof. Dr. Piamsak Menasveta, Assist. Prof. Dr. Vichien Rimphantichayakit and Assoc. Prof. Dr. Anchalee Tassanakajon for their recommendations.

I would like to acknowledge the National Science and Technology Development Agency, NSTDA for granting my studentship and to all members of the Marine Biotechnology Research Unit (MBRU), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), for their kindness and helps.

Finally, I would like to express my deepest appreciation and gratefulness to my parents, sisters and brother for their warmest love, care, understanding and cheerfulness throughout my study.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... ..iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF TABLES..... viii

LIST OF FIGURES.....x

LIST OR ABBREVIATIONS..... xii

CHAPTER

I. INTRODUTIONS.....1

II. MATERIALS AND METHODS.....24

III. RESULTS.....39

IV. DISCUSSIONS.....75

V. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.....88

REFERENCES.....89

APPENDICES

APPENDIX A.....101

APPENDIX B.....108

APPENDIX C.....113

APPENDIX D.....116

APPENDIX E.....120

BIOGRAPHY.....124

LIST OF TABLES

Table **Page**

1.1 World Prawn Farming in 1998.....2

1.2 Eastern Hemisphere Farming in 1998.....3

1.3 Thailand Export of Fresh and Frozen Marine Prawn.....4

2.1 PCR primers and sequence screened for amplification success in *P. monodon*.....32

2.2 Optimal concentration of agarose in 1XTBE buffer used for separation of double stranded DNA in this study.....34

3.1 Restriction fragment patterns observed from digestion of the 16S rDNA and an intergenic COI-COII of *P. monodon* with restriction endonucleases used in this study.....58

3.2 Frequency distributions of restriction enzyme patterns across five geographic samples of *P. monodon* in Thailand.....61

3.3 Geographic distributions of 37 composite haplotypes of five *P. monodon* samples based on restriction analysis of 16S rDNA with *Mbo* I and an intergenic COI-COII with *Alu* I, *Mbo* I, *Taq* I, *Hin* fI and *Dde* I.....65

3.4 Haplotype and nucleotide diversity within geographic samples of Thai *P. monodon* examine by restriction analysis of 16S rDNA and an intergenic COI-COII.....72

Table **Page**

3.5 Percent nucleotide diversity (above diagonal) and percent nucleotide divergence (below diagonal) between population for five geographic locations of *P. monodon* in Thailand.....73

3.6 Geographic heterogeneity analysis in distribution frequency of composite haplotype among 5 locations of *P. monodon* in Thailand using a Mont Carlo simulation.....74

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1.1 Lateral view showing important parts of *P. monodon*.....7

1.2 Life cycle of Penaeid prawns.....7

1.3 Geographic distributions of *P. monodon*.....10

2.1 Map of Thailand illustrating sample collection five geographic locations.....28

3.1 High molecular weight DNA extracted from frozen pleopods of *P. monodon*... 43

3.2 PCR products resulted from amplification of hemocyanin, 12S and 16S rDNAs, ND5, and an intergenic COI-COII.....44

3.3 An example of restriction analysis of *P. monodon* hemocyanin gene segment with *Alu* I.....45

3.4 An example of restriction analysis of *P. monodon* hemocyanin gene segment with *Hae* III.....46

3.5 An example of restriction analysis of *P. monodon* hemocyanin gene segment with *Dde* I.....47

3.6 An example of restriction analysis of the NADH subunits 5 (ND5) gene segment of *P. monodon* with *Alu* I.....48

3.7 An example of restriction analysis of the NADH subunits 5 (ND5) gene segment of *P. monodon* with *Dde* I.....49

3.8 An example of restriction analysis of the NADH subnits 5 (ND5) gene segment of *P. monodon* with *Mbo* I.....50

Figure **Page**

3.9 An example of restriction analysis of the NADH subnits 5 (ND5) gene segment of *P. monodon* with *Rsa* I.....51

3.10 An example of *P. monodon* restriction fragment length polymorphism generated from digestion of an amplified 16S rDNA with *Mbo* I.....52

3.11 An example of *P. monodon* restriction fragment length polymorphism generated from digestion of an intergenic COI-COII with *Alu* I.....53

3.12 An example of *P. monodon* restriction fragment length polymorphism generated from digestion of an intergenic COI-COII with *Mbo* I.....54

3.13 An example of *P. monodon* restriction fragment length polymorphism generated from digestion of an intergenic COI-COII with *Taq* I.....55

3.14 An example of *P. monodon* restriction fragment length polymorphism generated from digestion of an intergenic COI-COII with *Hin*fI.....56

3.15 An example of *P. monodon* restriction fragment length polymorphism generated from digestion of an intergenic COI-COII with *Dde* I.....57

3.16 Pie charts showing distributions of mtDNA composite haplotypes within each sampling location of *P.monodon* in Thailand.....67

3.17 A UPGMA dendrogram showing the relationship among thirty-seven composite haplotypes found in Thai *P. monodon*.....69

3.18 Pie charts showing distributions of major mtDNA phylogenetic cluster I and II among five geographic samples of *P. monodon*.....70

LIST OF ABBREVIATIONS

A, T, G, C	= nucleotides containing the bases adenine, thymine, guanine and cytosine, respectively
bp	= base pair
°C	= degree Celcius
cm	= centimetre
CO I	= cytochrome c oxidase subunit I
CO II	= cytochrome c oxidase subunit II
DNA	= deoxyribonucleic acid
dNTPs	= deoxyribonucleotide triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
EDTA	= ethylenediamine tetra acetic acid
HCl	= hydrochloric acid
kb	= kilobase
KCl	= potassium chloride
lrRNA	= large subunit ribosomal RNA
$MgCl_2$	= magnesium chloride
ml	= millilitre
mM	= millimolar
mtDNA	= mitochondrial DNA
ng	= nanogram
PCR	= polymerase chain reaction
RFLP	= restriction fragment length polymorphism
SDS	= sodium dodecyl sulfate

sRNA	= small subunit ribosomal RNA
Tris	= tris (hydroxymethyl) aminomethane
µg	= microgram
µl	= microlitre
µM	= micromolar
UV	= ultraviolet
V	= volt
W	= watt