

ความแปรผันทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของกุ้งกุลาดำ, *Penaeus monodon* ในประเทศไทย

โดยตัวตรวจสอบชนิด ไมโครแซเทลไลต์

นางสาวเปรมฤทัย สุพรรณกุล



สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-639-736-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**GENETIC VARIATION AND POPULATION STRUCTURE
OF THE BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon*
IN THAILAND
DETERMINED BY MICROSATELLITE MARKERS**


Miss Premruethai Supungul

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

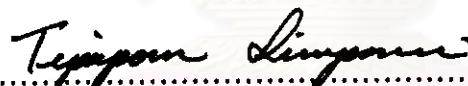
**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998
ISBN 974-639-736-2**

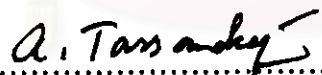
Thesis Title Genetic variation and population structure of the black tiger
prawn *Penaeus monodon* in Thailand determined by
microsatellite markers
By Miss Premruethai Supungul
Department Biochemistry
Thesis Advisor Assoc. Prof. Anchalee Tassanakajon, Ph.D.
Thesis Coadvisor Wongpathom Kamonrat, Ph.D.

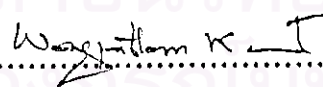
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree.



..... Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee


..... Chairman
(Assist. Prof. Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)


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


..... Thesis Coadvisor
(Wongpathom Kamonrat, Ph.D.)


..... Member
(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

เปรมฤทัย สุพรรณกุล : ความแปรผันทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรกุ้งกุลาดำ, *Peneaus monodon* ในประเทศไทย โดยทำการตรวจสอบไมโครแซเทลไลท์ (GENETIC VARIATION AND POPULATION STRUCTURE OF THE BLACK TIGER PRAWN *Peneaus Monodon* IN THAILAND DETERMINED BY MICROSATELLITE MARKERS) อ. ที่ปรึกษา: ร.ศ. ดร. อัญชลี ศักนพขจร, อ. ที่ปรึกษาช่วย: ดร. วงศ์ปฐม กมธรัตน์, 68 หน้า. ISBN 974-639-736-2

ในการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรกุ้งกุลาดำจากธรรมชาติ 5 แหล่งของประเทศไทย ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งจากทะเลอันดามัน 3 แหล่ง คือ จังหวัดสตูล ตรัง และพังงา และจากอ่าวไทย 2 แหล่ง คือ จังหวัดชุมพร และตราด โดยทำการตรวจสอบไมโครแซเทลไลท์ดีเอ็นเอ (microsatellite DNA) ซึ่งอาศัยขบวนการลูกโซ่โพลีเมอร์เรซ (Polymerase chain reaction) พบว่าทุกตำแหน่งของไมโครแซเทลไลท์ (CUPmo18, DI25, และ DI27) มีความหลากหลายสูง และให้ค่าจำนวนอัลลีล (allele) ต่อตำแหน่ง คือ 37, 34 และ 32 อัลลีล ตามลำดับ เมื่อศึกษาประชากร 5 กลุ่ม โดยใช้ไมโครแซเทลไลท์ 3 ตำแหน่งนี้ให้ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) ในช่วง 0.88 ถึง 0.80 และให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนอัลลีลในแต่ละตำแหน่งอยู่ในช่วง 22.23-26.33 ค่า effective number of alleles ซึ่งให้เห็นว่า กลุ่มประชากรจากจังหวัดชุมพร (17.67) มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงกว่าตรัง (16.97), ตราด (15.15), สตูล (14.3) และพังงา (14.18) ตามลำดับ ความถี่ของอัลลีลของกลุ่มประชากรไม่เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg เนื่องจากในทุกกลุ่มประชากรมีจำนวนของโฮโมไซโกต (homozygote) มาก อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรม พบว่าไมโครแซเทลไลท์ทั้ง 3 ตำแหน่งมีการถ่ายทอดอัลลีลตามกฎของเมนเดล เมื่อตรวจสอบโดยใช้ไมโครแซเทลไลท์ที่ตำแหน่ง CUPmo18 และ DI25 พบการกระจายตัวของความถี่ของอัลลีลของกลุ่มประชากรจากทะเลอันดามันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มประชากรจากอ่าวไทยและที่ตำแหน่งทั้ง 2 นี้ยังให้ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญภายในกลุ่มประชากรจากอ่าวไทย คือ กุ้งจากจังหวัดชุมพรและจังหวัดตราด

เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อดูโครงสร้างประชากร พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของความแตกต่างของบิโนในกลุ่มประชากรทั้งหมด (θ) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.009 (95% CI = 0.0011, 0.0176) แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรน้อย อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษา geographic heterogeneity และนำมาแสดงความสัมพันธ์ในเชิงแผนภูมิ โดยใช้วิธีของ Neighbor-joining สามารถแบ่งกลุ่มกุ้งกุลาดำของไทยออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 สตูล, ตรัง และ พังงา กลุ่มที่ 2 ชุมพร และกลุ่มสุดท้ายคือ ตราด

ภาควิชา.....ชีวเคมี
สาขาวิชา.....ชีวเคมี
ปีการศึกษา.....2541

ลายมือชื่อผู้ผลิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาช่วย.....

##C826210 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: *Penaeus monodon* / black tiger shrimp / microsatellite / population structure / genetic markers

PREMRUETHAI SUPUNGUL : GENETIC VARIATION AND POPULATION STRUCTURE OF THE BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon* IN THAILAND DETERMINED BY MICROSATELLITE MARKERS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ANCHALEE TASSANAKAJON, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : MR. WONGPATHOM KAMONRAT, Ph.D. 68 pp. ISBN 974-639-736-2

Three microsatellite loci, CUPmo18, Di25, and Di27, were used to study on population genetics of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) by using Polymerase Chain Reaction (PCR). Genetic variation were examined in 5 geographic samples, three from the Andaman Sea (Satun, Trang, and Phang-nga) and two from the Gulf of Thailand (Chumphon and Trad). All microsatellite loci were shown to be highly polymorphic with number of alleles at each locus of 37, 34, and 32 alleles respectively. Population analyses based on 3 loci revealed heterozygosities between 0.66-0.80 and average alleles per locus were 22.23-26.33. The effective number of alleles suggested that Chumphon (17.57) has highest genetic variation followed by Trang (16.97), Trad (15.15), Satun(14.3) and Phang-nga (14.18) respectively. Gene frequencies of each population did not conform Hardy-Weinberg equilibrium due to significant excesses of homozygotes in all samples. However, segregation analysis of three loci using 20 progeny from a representative full-sib family revealed Mendelion segregation nature of these microsatellites. Significant difference in allele frequency distributions were found for the Andaman Sea and the Gulf of Thailand populations at the CUPmo18 and Di25 loci. At those loci, the two populations from the Gulf of Thailand were also genetically distinct.

Population structures of *P. monodon* were assessed using the hierarchical F-statistics. The average θ value among 5 samples across the three loci was 0.009 (95% CI : 0.0011 to 0.0175) suggested low level of population subdivision in Thai *P. monodon*. Nevertheless, the analysis of geographic heterogeneity and phylogenetic reconstruction using the Neighbor-joining approach divided 5 geographic *P. monodon* samples to three different gene pools constituting of Satun, Trang, Phang-nga(A), Chumphon(B) and Trad(C).

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....
ปีการศึกษา.....2541.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



Acknowledgments

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Anchalee Tassanakajon for her guidances, supervision, encouragement and supports throughout my study and I am very grateful to my coadvisor, Dr. Wongpathom Kamonrat for his great helps, guidances, and suggestions in my thesis.

The special thanks are also extended to Dr. Padermsak Jarayabhand for his help in supporting the samples and Dr. Sirawut Klinbunga for his help in data computerized analysis and suggestions. Thanks are also expressed to and all my friends of the Biochemistry and Biotechnology department especially R707, R708 and R709 for their helps in the laboratory and friendships that I enjoy and happy throughout my study.

I wish to acknowledge to contributions of the Biodiversity Research and Training Program, a joint program supported by the Thailand Research Fund and National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENT

	PAGE
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Taxonomy of <i>P. monodon</i>	4
1.2 Morphology.....	4
1.3 Life cycle.....	6
1.4 Distribution.....	8
1.5 Exploitation.....	8
1.6 Genetic markers.....	10
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	16
2.1 Equipments.....	16
2.2 Chemicals.....	16
2.3 Radioactive.....	18
2.4 Enzymes.....	18
2.5 Samples.....	18
2.6 DNA extraction.....	20
2.7 Measurement of DNA concentration.....	21
2.8 PCR primers.....	22
2.9 Amplification of Microsatellite DNA using the Polymerase Chain Reaction (PCR).....	22
2.10 Data analysis.....	25

	PAGE
CHAPTER III RESULTS.....	29
3.1 DNA extraction	29
3.2 Optimization of PCR conditions for amplification of homologous Microsatellite loci in <i>P. monodon</i>	29
3.3 Variability of three investigated microsatellites.....	33
CHAPTER IV DISCUSSION.....	52
CHAPTER V CONCLUSIONS.....	60
REFERENCES.....	61
BIOGRAPHY.....	68



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

TABLES	PAGE
1.1 World cultured shrimp production : 1994-1996	2
1.2 The annual shrimp exports of Thailand between 1992-1995	2
1.3 Shrimp production from fisheries and aquaculture sectors and culture area in Thailand	3
3.1 The primer annealing temperature for amplification of microsatellites loci in <i>Penaeus monodon</i>	30
3.2 Allele sizes in base pairs at the CUPmo18 loci and its frequency distributions in five samples	37
3.3 Allele sizes in base pairs at the Di25 loci and its frequency distributions in five samples	38
3.4 Allele sizes in base pairs at the Di27 loci and its frequency distributions in five samples	40
3.5 Genetic polymorphisms resulted from analysis of three microsatellite loci (CUPmo18, Di25, and Di27) on five geographical samples of <i>P. monodon</i> in Thailand	42
3.6 The number of allele per locus, effective number of alleles and heterozygosity averaged overall locus and sample	43
3.7 Estimation of Hardy-Weinberg expectation in each conspecific <i>P. monodon</i> sample for each microsatellite locus	43
3.8 Segregation analysis of three microsatellite loci (CUPmo18, Di25, and Di27) resulted from twenty randomly chosen offspring from the same full-sib family	47
3.9 Cavalli-Sforza and Edwards chord distance between the 5 geographic sample of <i>P. monodon</i>	48
3.10 Geographic heterogeneity analysis of five conspecific sample of <i>P. monodon</i> using microsatellite loci (CUPmo18, Di25, and Di27).....	50
3.11 F-statistics for microsatellite analysis of five geographic Samples.....	51

LIST OF FIGURES

FIGURES		PAGE
Figure 1.1	Lateral view of <i>Penaeus monodon</i> showing important parts.....	5
Figure 1.2	The life cycle of the giant tiger prawn, <i>P. monodon</i> , with stages in different habitats.....	7
Figure 1.3	Geographic distribution of <i>P. monodon</i> in Indo-West Pacific region.....	9
Figure 2.1	Map of Thailand illustrating sample collection sites including Chumphon, Phang-nga, Satun, Trad and Trang..	19
Figure 3.1	Ethidium bromide staining of 0.7% agarose gel showing DNA extracted from pleopods of <i>P. monodon</i>	30
Figure 3.2	PCR amplification patterns of microsatellite locus CUPmo18 from 20 individuals <i>P. monodon</i> DNA under the optimal PCR conditions with annealing temperature at 50 °C.....	31
Figure 3.3	PCR amplification patterns of microsatellite locus Di25 from 10 individuals <i>P. monodon</i> DNA under the optimal PCR conditions with annealing temperature at 65 °C.....	32
Figure 3.4	PCR amplification patterns of microsatellite locus Di25 from 15 individuals <i>P. monodon</i> DNA under the optimal PCR conditions with annealing temperature at 54 °C.....	32
Figure 3.5	Distribution frequencies of alleles at locus CUPmo18 from Satun (n=32), Trang (n=35), Phang-nga (n=30), Chumphon (n=42), Trad(n=39) and overall samples.....	34
Figure 3.6	Distribution frequencies of alleles at locus Di25 from Satun (n=36), Trang (n=35), Phang-nga (n=28), Chumphon (n=37), Trad (n=48) and overall samples.....	35

Figures	PAGE
Figure 3.7	Distribution frequencies of alleles at locus Di27 from Satun (n=32), Trang (n=38), Phang-nga (n=25), Chumphon (n=49), Trad (n=40) and overall samples..... 36
Figure 3.8	PCR amplification patterns of microsatellite locus CUPmo18 from progeny of a representative full-sib family..... 44
Figure 3.9	PCR amplification patterns of microsatellite locus Di25 from progeny of a representative full-sib family..... 45
Figure 3.10	PCR amplification patterns of microsatellite locus Di27 from progeny of a representative full-sib family..... 46
Figure 3.11	A neighbor-joining illustrating relationships among 5 geographic samples of <i>P. monodon</i> in Thailand based on Cavalli-Sforza and Edward chord distance..... 49

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	Base pair
°C	Degree Celsius
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytosine triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid (disodium salt)
EtBt	Ethidium bromide
H	Mean heterozygosities
HCl	Hydrochloric acid
kb	Kilobase pair (10^3 base pair)
MgCl ₂	Magnesium chloride
min	Minute
ml	Millilitre (10^{-3} litre)
mM	Millimolar
MT	Metric tonnes
mtDNA	Mitochondrial DNA
n _e	Effective number of allele
ng	Nanogram (10^{-9} gram)
nM	Nanometre
OD	Optical Density
PCR	Polymerase chain reaction
Rnase	Ribonuclease
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sec	Second
T _A	Annealing temperature
TE	Tris EDTA

Tris	Tris(hydroxy methyl)aminomethane
V	Volt
VNTR	Variable number of tandem repeats
μ l	Microlitre (10^{-6} litre)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย