

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกบพื้นเมืองด้วยเทคนิค RAPD

A Study on DNA Fingerprint of Some Thai Native Frogs Using RAPD Technique

วิรัช จิวแหยม (Wirat Jiwyam)¹
ธงชัย จำปาศรี (Thongchai champasri)²
จิรัชชัย จันทนะ (Jirachai juntana)³

บทคัดย่อ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกบพื้นเมือง 4 ชนิด ได้แก่ 1) *Rana tigerina*; 2) *R. rugulosa*; 3) *R. leucomystax*; 4) *R. limnocharis* ดำเนินการด้วยเทคนิค RAPD ผลการศึกษาพบว่าหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยการทำให้ PCR แล้วได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 190 แถบ มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 500 - 1031 คู่เบส มี polymorphic band อยู่ระหว่าง 36.36 - 54.55 % ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่ากบพื้นเมืองมีระดับความคล้ายคลึง อยู่ระหว่าง 0.57 - 0.80 และมีระยะห่างทางพันธุกรรม อยู่ระหว่าง 0.20 - 0.55.

Abstract

A study on DNA fingerprint of some 4 Thai native frogs was to verify species of frogs; 1) *Rana tigerina*; 2) *R. rugulosa*; 3) *R. leucomystax*; 4) *R. limnocharis* by RAPD technique. The results after PCR-RAPD manipulation indicated 190 DNA band and sizes of DNA bands were between 500-1031 base pairs. The polymorphic band was between 36.36 - 54.55 %. In term of genetic diversity, the similarity index of Thai native frogs was between 0.57-0.80 and genetic distance was between 0.20-0.55

คำสำคัญ: ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, กบพื้นเมือง, เทคนิค RAPD

Keywords: DNA fingerprint, Thai native frogs, RAPD technique

¹รองศาสตราจารย์ สายวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี วิทยาเขตหนองคาย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³นักวิชาการประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

บทนำ

กบเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Amphibian) ที่ชาวไทยรู้จักกันดี และนิยมบริโภคกันมาช้านาน ปัจจุบันความต้องการในการบริโภคกบมีสูงมาก เห็นได้จากการส่งออกกบไปจำหน่ายยังต่างประเทศ เช่น ฮองกง ญี่ปุ่น มาเลเซีย เวียดนาม ฝรั่งเศส และ สหรัฐอเมริกา (จิราภรณ์, 2534) เป็นผลทำให้การผลิตกบทั้งจากธรรมชาติและจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกบไม่ทันกับความต้องการส่งผลให้ประชากรกบนาในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็วจนน่าเป็นห่วง (นิรนาม ก, 254) และยังมีสาเหตุอื่นๆ อีกทำให้ปริมาณกบนาในธรรมชาติลดลงได้ เช่น การตัดไม้ทำลายป่า การเปลี่ยนแปลงพื้นที่ป่าเป็นพื้นที่เกษตรกรรมซึ่งมีการใช้สารฆ่าแมลงอย่างรุนแรง และการสร้างโรงงานอุตสาหกรรมบริเวณทุ่งนา เป็นต้น (ทวีศักดิ์, 254) กบที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างกว้างขวางได้แก่ กบนา (*Rana rugulosa*) กบทูตหรือกบยักษ์หรือกบแดง (*Rana macrodon*) และกบต่างประเทศคือ กบบูลฟล็อก (*Rana catesbina*) (พงษ์พันธ์, 2539, ศุภชัย, 2537) กบเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอยู่ในวงศ์ Ranidae สกุล *Rana* (สมพร และสมโภชน์, 2535) Taylor (1962) รายงานว่า กบสกุล *Rana* ที่พบมีอยู่ 35 ชนิด ซึ่งได้ศึกษาที่อยู่ในวงศ์ Ranidae ที่พบในประเทศไทยมีอยู่ 4 สกุล สกุลที่ศึกษา คือ สกุล *Rana limnocharis* และ สกุล *Rana ooeidozyga* ซึ่งมีลักษณะที่สำคัญดังนี้ คือ กบในสกุล *Rana* เป็นกบที่มีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่มีรูปร่างตาอยู่ในแนวนอน มีฟันอยู่บนกระดูกขากรรไกรและบนเพดาน ลิ้นเป็นอิสระ ตอนท้ายเป็นหลุมลึก ปกติมองเห็นแก้วหู บ่อยครั้งพบว่าซ่อนอยู่ใต้ผิวหนัง นิ้วมือไม่มีพังผืดยึด ปลายแหลมหรือพองออก ฝ่าเท้าด้านนอก ปกติจะถูกแยกโดยพังผืดกระดูกอก จะมีส่วนที่เป็นกระดูกแข็ง กบสกุลนี้เป็นชนิดที่แพร่หลายที่สุดในประเทศไทย มีประมาณ 34 ชนิด (วิโรจน์, 2544) และได้ทำการศึกษาที่อยู่ในวงศ์ Microhylidae คือ สกุล *Microhyala pulchra* ซึ่งมีลักษณะที่สำคัญดังนี้ คือ ขนาดวัดจากปลายปากถึงกัน 25 ถึง

27 มิลลิเมตร ขนาดปากค่อนข้างใหญ่ ลำตัวอ้วนสั้น หัวกว้างและปลายปากแหลม นิ้วหัวแม่มือสั้นกว่านิ้วชี้มาก ปลายนิ้วเท้าแผ่ออกเป็นแผ่นกลม นิ้วเท้ามีพังผืดยึดประมาณ 1 ใน 3 ของความยาวนิ้ว ขาหลังยาวปานกลาง เมื่อเหยียดไปด้านหน้าข้อเท้าอยู่ตรงกับปลายปาก หรืออยู่ตรงบริเวณหน้า หลังสีกอกแทนน้ำตาดมีลายขีดรูปสามเหลี่ยมซ้อนกันหลายๆ ชั้น เห็นได้ชัดบ้างไม่ชัดบ้าง เนื้อกันมักมีจุดมนกลม 1 คู่ อยู่สองข้างข้างละจุด ขาและแขนมีลายขีดสีคล้ำพาดขวางเด่นชัด โดยลายขีดประกอบด้วยขีดหนาสลับกับขีดบาง ใต้คางตัวผู้สีคล้ำเกือบดำ ใต้ท้องสีเหลืองอ่อน สีเหลืองนี้จะเข้มขึ้นเรื่อยๆ ไปยังโคนขาหลังและใต้ต้นขา (นิรนาม ข, 2548)

การเลี้ยงกบนี้มีประโยชน์ในหลายๆ เรื่อง เช่น เป็นอุปกรณ์ทางการศึกษาทางการแพทย์ การวิจัยทางชีววิทยา และการทดลองทางวิทยาศาสตร์ สร้างความเพลิดเพลินใจแก่ผู้เลี้ยง ใช้เป็นอาหารและสร้างรายได้ให้แก่ครัวเรือนได้ และช่วยทำให้ระบบนิเวศในนาสมดุลย์ เป็นต้น

การเลี้ยงกบในปัจจุบันพบว่ามีปัญหาสำคัญหลายประการ เริ่มจากการขยายพันธุ์ การอนุบาล จนถึงวิธีการเลี้ยง ซึ่งปัญหาที่พบส่วนใหญ่เป็นปัญหาเรื่องการกินกันเอง หรืออาจเกิดจากสภาพสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ อาจมีผลกับการพัฒนาของตัวอ่อน ดังนั้นจึงควรมีการจัดการที่ดีและต้องคอยดูแลอย่างใกล้ชิด อย่างไรก็ตามการที่พัฒนาวิธีการเพาะขยายพันธุ์กบเพื่อประโยชน์เชิงพาณิชย์นั้นควรเริ่มจากการเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่ดีและมีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของพ่อแม่พันธุ์เสียก่อนโดยอาศัยเทคนิคด้านชีวโมเลกุลเข้ามาช่วย โดยเฉพาะเทคนิคการศึกษาสายพืมหีเอ็นเอทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการคัดพันธุ์ การจัดการและการศึกษาความสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรกบในอนาคตรวมทั้งยังเป็นการรักษาพันธุกรรมของกบพื้นเมืองมิให้สูญเสียลักษณะทางพันธุกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอ

ตัดเนื้อเยื่อสดของกบพื้นเมืองให้มีน้ำหนักประมาณ 25 mg ใส่ลงในหลอด microcentrifuge เติม lysis buffer 500 μ l (50 mM Tris Cl, 50mM EDTA, pH 8.0), 0.125% SDS, 20 mg/ml proteinase K เพื่อย่อยโปรตีน แล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิที่ 55 °C นานข้ามคืน หลังจากนั้นกำจัดโปรตีนและเศษเซลล์ออกโดยการเติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture ปริมาตร 500 μ l พลิกหลอดเบา ๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสชั้นบน สกัดซ้ำด้วย chloroform 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 g เป็นเวลา 3 นาที ดูดเก็บของเหลวใสชั้นบนใส่หลอด microcentrifuge ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม 3 M sodium acetate (pH 6.0) ปริมาตร 50 μ l ร่วมกับการเติม absolute ethanol ปริมาตร 900 μ l พลิกหลอดเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 g เป็นเวลา 3 นาที ดูดของเหลวใสออกให้หมดแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol จากนั้นวางหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 15 - 20 นาที แล้วจึงละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อปริมาตร 30 μ l นำไปเก็บที่ -20 °C แบ่งดีเอ็นเอต้นแบบปริมาตร 1 μ l มาตรวจสอบคุณภาพการสกัดด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย EtBr

2. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD

นำ genomic DNA ที่มีความเข้มข้น 50 ng มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบหลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 10 นิวคลีโอไทด์ ที่ผลิตจากบริษัท Operon Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา โดย PCR reaction 10 μ l ประกอบด้วยส่วนผสมต่าง ๆ คือ 10x Taq buffer 1 μ l, MgCl₂ 1 μ l, DNTPs mixed 1 mM each, Primer 100 pmol (0.1 mM), Genomic DNA 50 ng 1 μ l, Taq Polymerase 1 μ l ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น

ให้ได้ 10 μ l แล้วนำไปเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิการทำงานดังนี้

- ขั้นที่ 1: 94 °C 2 นาที 1 รอบ
- ขั้นที่ 2: 94 °C 1 นาที; 38 °C 1 นาที;
72 °C 1 นาที; 43 รอบ
- ขั้นที่ 3: 72 °C 5 นาที; 10 °C 10 นาที
1 รอบ แล้วค้างไว้ที่ 4 °C

หลังจากที่ทำการ PCR เรียบร้อยแล้วจึงนำ PCR product 10 μ l ผสมกับ dye 2 μ l มาแยกบน 2% agarose gel และย้อมด้วย EtBr โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น marker เพื่อตรวจวิเคราะห์ที่ปริมาณดีเอ็นเอ

ผลการศึกษา

1. คุณภาพดีเอ็นเอ

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อ กบความเข้มข้นระหว่าง 55-2,752 ng และมีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1.38-1.86

2. ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกบด้วยเทคนิค RAPD-PCR (Rapid Amplification of Polymorphic DNA) โดยใช้ไพรเมอร์ OPE05 ไปจับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 190 แถบ มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 500-1031 คู่เบส (ภาพที่ 1) โดยมีเปอร์เซ็นต์ polymorphic band อยู่ระหว่าง 36.36-54.55 เปอร์เซ็นต์

3. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกบ

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD-PCR แล้วนำข้อมูลที่ได้จาก PCR product มาหาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ dendrograms เพื่อหาตรรกะของความคล้ายคลึง (Similarity index; S) โดยใช้วิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method Analysis) (ภาพที่ 2) ตามวิธีของ Nei and Li (1973) และอาศัยโปรแกรมวิเคราะห์ NTSYS-pc2.1 ตามวิธีของ Rohlf (2000) พบว่าค่า S ของกบมีค่าอยู่ระหว่าง 0.57-0.80 (ตารางที่ 3) โดยที่ประชากรส่วนมากมีค่า

S ค่อนข้างสูง ซึ่งสอดคล้องกับค่าของระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance; D) ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0.20-0.55 ซึ่งถือว่ามีความห่างทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ D = 1.00 (ระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุด)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm อยู่ระหว่าง 1.21-1.76 โดยดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์นั้นควรมีอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} 1.8 ขึ้นไป (Sambrook et al., 1989; Sambrook and Russel, 2001) ไพโรเมอร์ที่นำมาใช้ในการศึกษาให้ polymorphic band น้อย จึงอาจยังมีคุณสมบัติไม่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างไรก็ตามจากผลที่ได้สามารถสรุปความสัมพันธ์ในระหว่างกลุ่มประชากรได้ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าประชากรกบมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันมาก จากค่าดัชนีความคล้ายคลึงและค่าของระยะห่างทางพันธุกรรม จากภาพที่ 2 สามารถสรุปความสัมพันธ์ของกบพื้นเมือง 4 ชนิด ได้เป็น 2 กลุ่ม ใหญ่ ๆ คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Rana tigerina* และ *R. rugulosa* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *R. leucomystax* และ *R. limnocharis* โดยมีค่าของ Similarity index อยู่ระหว่าง 0.57-0.80 และมีค่า Genetic distance ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0.20-0.55

เอกสารอ้างอิง

จิราภรณ์ ชีวะปริษา. 2534. กบไทยไปนอก. วารสารส่งเสริมการลงทุน 2 (1): 25-27. (cited 30 June 2005) Available from: URL: <http://www.lib.ru.ac.th /journal/frog.html#top>.
ทวิศักดิ์ บุตรตัน. 2548. กบ เขียดและคางคก. มติชนสุดสัปดาห์. 25 (1,286). (cited 31 June 2005) Available from: URL: <http://www.matichon.co.th/weekly/ weekly.php?srctag=0418080448& srcday=2005/05/27&search=no>

นิรนาม ก. 2547. วิจัยชี้ “กบนา” ของไทยวิกฤติใกล้สูญพันธุ์ เหตุใช้สารเคมีสูงสภาพแวดล้อมเปลี่ยน. หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ. (cited 30 June 2005) Available from: URL: http://www.environment.in.th/news_detail.asp?id=1112.

นิรนาม ข. 2548. อึ่งขาคำ. (cited 20 July 2005) Available from: URL: http://www.tistr.or.th/sakaerat/Flora_Fauna/amphebian/amphebian/amp011.pdf

พงษ์พันธ์ อินทราวณิชย์. 2539. การเลี้ยงกบ. อักษรสยามการพิมพ์. กรุงเทพฯ. 80 หน้า.

วิโรจน์ นุตพันธุ์. 2544. คู่มือคนรักสัตว์: สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย. บ้านและสวน. กรุงเทพฯ. 191 หน้า.

ศุภชัย ชาตวรกุล. 2537. คู่มือการเลี้ยงกบเป็นการค้า. โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์. กรุงเทพฯ. 92 หน้า.

สมพร ภูริพงษ์ และสมโภชน์ อัคคะทีวีวัฒน์. 2535. ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

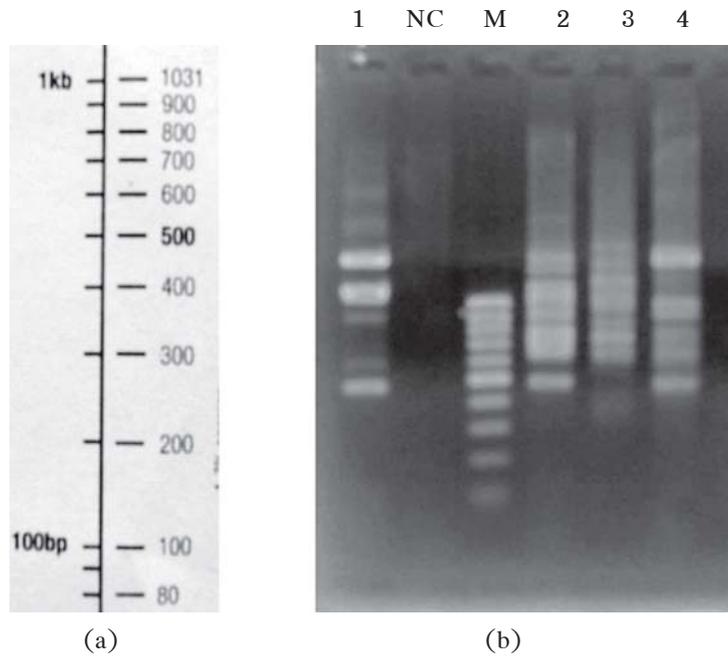
Nei, M. and Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 5269-5278.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

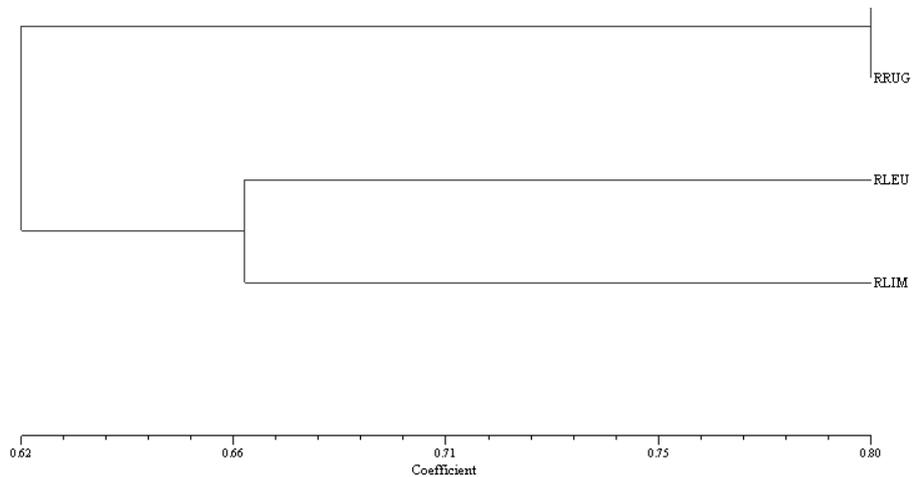
Sambrook, J. and Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Rohlf, F.J. 2000. Numerical taxonomy and Multivariate Analysis System. NTSYS-pc. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. New York.

Taylor, E.H. 1962. The Amphibian Fauna of Thailand. *Science Bulletin* Vol. XLIII No.8. The University of Kansas.



ภาพที่ 1 (a): ขนาดของ marker (100 bp DNA ladder); (b): รูปแบบดีเอ็นเอจากการทำ PCR-RAPD โดยใช้ Primer OPE05: 1) *Rana tigerina*; 2) *R. rugulosa*; 3) *R. leucomystax*; 4) *R. limnocharis*; NC=Negative Control; M=100 bp DNA ladder marker



ภาพที่ 2 ดรรชนีความคล้ายคลึง (similarity index) ของกบที่ทำการศึกษาตามวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ตามวิธีการของ Nei and Li (1973)

หมายเหตุ: RTIG = *R. trigerina*, RRUG = *R. rugulosa*, RLEU = *R. leucomystax*, RLIM = *R. limnocharis*.

ตารางที่ 1 ระยะห่างทางพันธุกรรมของกบพื้นเมืองสี่ชนิด

หมายเหตุ: RTIG = *R. trigerina*, RRUG = *R. rugulosa*, RLEU = *R. leucomystax*, RLIM = *R. limnocharis*.

	RTIG	RRUG	RLEU	RLIM
RTIG	0.00			
RRUG	0.20	0.00		
RLEU	0.55	0.35	0.00	
RLIM	0.55	0.35	0.41	0.00