

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในหอยมุกน้ำจืด (*Chamberlainia hainesiana*) ระยะไกลิเดียและระยะโตเต็มวัย โดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP และ differential display Comparison of gene expression in glochidia and adult freshwater pearl mussels (*Chamberlainia hainesiana*) using cDNA-AFLP and differential display techniques

เสวต วรรณรัตน์¹ อุทัยวรรณ โกวิทวดี² และ วิภา หงษ์ตระกูล^{1*}

Sawate Vannarattananat¹, Utaiwan Kovitvadhi² and Vipa Hongtrakul^{1*}

¹ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

² ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹ Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

² Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding author: fscivph@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในหอยมุกน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* ระยะไกลิเดีย (glochidia) และระยะโตเต็มวัยโดยเทคนิค cDNA-AFLP และ differential display จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP ด้วยไพรเมอร์จำนวน 64 คู่ พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างหอยระยะไกลิเดียและระยะโตเต็มวัยจำนวน 16 แถบ ขณะที่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค differential display โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มร่วมกับ oligo dT จำนวน 136 คู่ พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้งหมด 14 แถบ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมดมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในห้องสมุดจีโนม cDNA จากเนื้อเยื่อแมนเทิล

(mantle) ของหอยมุกน้ำจืด (*Hyriopsis cumingii* Lea) โดยมีดีเอ็นเอชิ้นหนึ่งที่เป็นส่วนของยีนควบคุมการสร้าง fasciclin-like protein ที่มีแนวโน้มว่าเกี่ยวข้องกับการสร้างมุก นอกจากนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับหอยมุก *C. hainesiana* ซึ่งเป็นชนิดที่สร้างมุกได้ดี โดยสามารถแยกจากหอยชนิดอื่นได้

ABSTRACT

Comparison of gene expression between glochidia and adult stages of freshwater pearl mussels, *Chamberlainia hainesiana*, was performed using cDNA-AFLP and differential display techniques. DNA fingerprints from cDNA-AFLP using 64 primers combination produced 16 different DNA bands between glochidia and adult samples, whereas from differential display using 136 random/

oligo dT primer pairs produced 14 different DNA bands. Sequencing and BLAST analysis of all differentially expressed fragments were reported. All sequences obtained did match the sequences in mantle cDNA library of freshwater pearl mussel, *Hyriopsis cumingii* Lea. One DNA fragment was a part of gene coding for fasciclin-like protein, one of the genes potentially involved in pearl formation. Moreover, DNA marker specific to *C. hainesiana*, the high level pearl producing mussel, was developed and tested for specificity comparing to other mussels.

คำสำคัญ: หอยมุกน้ำจืด, *Chamberlainia hainesiana*, differential display, cDNA-AFLP

Keywords: freshwater pearl mussel, *Chamberlainia hainesiana*, differential display, cDNA-AFLP

บทนำ

หอยกาน้ำจืดวงศ์ Amblemidae จัดเป็นหอยมุกน้ำจืดชนิดหนึ่ง พบอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำจืดทั่วทุกภาคของประเทศไทย สามารถผลิตไข่มุกได้ ส่วนต่างๆ ของหอยกาน้ำจืดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย ในประเทศจีนมีอุตสาหกรรมการผลิตจากไข่มุกน้ำจืดซึ่งพบว่ามีกรดอะมิโน 17 ชนิด และแร่ธาตุ 8 ชนิด (อรภา และคณะ, 2529; 2547) ส่วนเปลือกของหอยกาน้ำจืดใช้ทำกระดุมและสิ่งของเครื่องใช้ต่างๆ หอยกาน้ำจืดบางชนิดที่เปลือกมีลักษณะแวววาวเป็นมุก สามารถนำมาใช้ทำเฟอร์นิเจอร์ประดับมุก สำหรับหอยมุกน้ำจืดที่มีลักษณะเปลือกหนา สามารถใช้ทำเป็นนิวเคลียสเพื่อทำแกนสำหรับผลิตไข่มุกแบบมีแกนในหอยมุกทะเล หอยมุกน้ำจืดนับเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญ และมีบทบาทสำคัญต่อมนุษย์และสภาพแวดล้อมเป็นอย่างยิ่ง โดยสามารถช่วยรักษาสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำได้ เนื่องจากหอยมีการกินอาหารแบบกรอง (filter feeding) ดังนั้นตะกอนและสารอินทรีย์ที่อยู่ในบริเวณที่หอยอาศัยอยู่จะถูก

กรองไปด้วย จึงทำให้น้ำบริเวณดังกล่าวใส เนื้อหอยมุกน้ำจืดมีโปรตีนสูงถึง 40.17% (Post, 1982) สามารถใช้เป็นอาหารของมนุษย์ได้

ปัจจุบันจำนวนหอยมุกน้ำจืดทั่วโลกได้ลดลงมากและบางชนิดใกล้จะสูญพันธุ์ ในฟาร์มเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดในต่างประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่น เยอรมัน ต้องการหอยเป็นจำนวนมากในการผลิตไข่มุก แต่ไม่สามารถผลิตหอยได้เพียงพอ ทำให้ต้องปิดฟาร์ม แต่ประเทศไทยมีศักยภาพค่อนข้างสูง เนื่องจากหอยมุกน้ำจืดในประเทศไทยมีความหลากหลายของชนิดค่อนข้างมาก และมีหลายชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงและสามารถผลิตไข่มุกน้ำจืดได้ อรภา และคณะ (2547) ศึกษาการสร้างมุกในหอยกาน้ำจืดพบว่า หอย *Chamberlainia hainesiana* สามารถสร้างมุกได้ดี *Hyriopsis desowitzi* และ *H. myersiana* สามารถสร้างมุกได้ดีปานกลาง และ *Uniandra* sp. ไม่สามารถสร้างมุกได้ การศึกษาในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการสร้างมุกของหอยยังไม่มีข้อมูลรายงานไว้ในปัจจุบัน โดยทั่วไปในแต่ละระยะของการเจริญของสิ่งมีชีวิตจะมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันไป การแสดงออกของยีนในระยะของตัวอ่อนหรือระยะไกลโคเดีย (glochidia) จึงน่าจะแตกต่างจากระยะโตเต็มวัยของหอย โดยเฉพาะในส่วนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างมุกและการเจริญเติบโต

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันมีหลายวิธี เช่น differential display และ cDNA-AFLP ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลของจีโนมมาก่อน ราคาค่อนข้างถูก สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว ได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค differential display และ cDNA-AFLP ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่การใช้ differential display ในการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับ vernalization ใน winter wheat (Dazhong *et al.*, 1998) การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเป็นผลของ *Tuber borchii* (Zeppa *et al.*, 2002) การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างฝ้ายที่มีความแตกต่างใน restoring gene (Zhang *et al.*, 2008) และการศึกษา

หายีนที่เกี่ยวข้องกับการเริ่มเป็นโรค tapping panel dryness (TPD) ในต้นยางพารา (Venkatachalam *et al.*, 2009) รวมทั้งการใช้ cDNA-AFLP ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ต่างกันในช่วงการพัฒนาของผลแอปเปิล (Geuna *et al.*, 2005) การตอบสนองต่อความต้านทานโรคราน้ำค้างในมะเขือเทศ (Li *et al.*, 2006) และการวิเคราะห์หายีนต้านทานโรคราสนิมจากข้าวสาลีพันธุ์กลาย (Yin *et al.*, 2010) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่ต่างกันในระยะโกลกิดีและโตเต็มวัยของหอยมุกน้ำจืด *C. hainesiana* ซึ่งเป็นหอยมุกที่สร้างมุกได้ดีโดยใช้เทคนิค differential display และ cDNA-AFLP เพื่อเป็นแนวทางทำความเข้าใจเกี่ยวกับการสร้างมุกในหอย

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างและการสกัดอาร์เอ็นเอ

รวบรวมตัวอย่างหอย *C. hainesiana* ทั้งระยะตัวอ่อนหรือโกลกิดี (glochidia) ซึ่งยังไม่แสดงการสร้างมุก และระยะโตเต็มวัยที่มีการสร้างมุกแล้วระยะละ 4 ตัวอย่าง จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดกาญจนบุรี อำเภอดำม่วง จังหวัดกาญจนบุรี สกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยทั้งระยะโกลกิดีและระยะโตเต็มวัย โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอของ Epicentre biotechnologies (USA) ตรวจสอบอาร์เอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ใน 1% agarose gel

การสังเคราะห์ cDNA สายเดี่ยว

สังเคราะห์ cDNA โดยใช้ชุดสำเร็จ (Fermentas) โดยผสม template RNA (5 µg) 5 µl, ไพรมอร์ oligo (dT)₁₈ (0.5 µg/µl) 1 µl และ DEPC-treated water เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 12 µl วางบนน้ำแข็ง และนำไปบ่มที่ 70 °C 5 นาที ทำให้เย็นบนน้ำแข็ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเบาๆ ให้สารละลายลงไปรวมอยู่กันหลอดนำไปวางบนน้ำแข็ง จากนั้นเติม 5X reaction buffer 4 µl, Ribolock™ ribonuclease inhibitor (20 U/µl) 4 µl และ 10mM dNTP 2 µl นำไปบ่มที่ 37 °C 5 นาที แล้ว

เติม Revert Aid™ reverse transcriptase (200 U/µl) 1 µl ก่อนนำไปบ่มที่ 42 °C 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่ 70 °C 10 นาที แล้วทำให้เย็นบนน้ำแข็ง

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันโดยเทคนิค differential display

นำ cDNA ที่เจือจาง 20 เท่ามาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรมอร์ oligo dT ที่เติมนิวคลีโอไทด์ 2 นิวคลีโอไทด์ (dT₁₂CA และ dT₁₂AG) คู่กับไพรมอร์แบบสุ่ม (random primer) ความยาว 9-11 นิวคลีโอไทด์ 68 ชนิด รวม 136 คู่ โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 25 µl ดังนี้ cDNA 1 µl, 10X PCR buffer 2.0 µl, 50 mM MgCl₂ 1 µl, 2 mM dNTP 1.5 µl, 5 pmol random primer 1.5 µl, 5 pmol oligo dT 1.5 µl และ Taq DNA polymerase (5U/µl; Invitrogen, USA) 0.25 µl ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในเครื่อง thermocycler (Bioer, China) 1 รอบที่ 94 °C 3 นาที 35 รอบที่ 94 °C 30 วินาที, 37 °C 45 วินาที และ 72 °C 45 วินาที และรอบสุดท้ายที่ 72 °C 5 นาที ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 6% polyacrylamide gel และย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

การสังเคราะห์ cDNA สายคู่

สังเคราะห์ cDNA สายคู่โดยใช้ชุดสำเร็จ (Fermentus) โดยนำ cDNA สายเดี่ยว 20 µl มาใส่ 10X reaction buffer 8 µl, ultrapure water (nuclease-free) 68.8 µl, ribonuclease H (5 U/µl) 0.2 µl และ DNA polymerase I (10 U/µl) 3 µl ผสมให้เข้ากันบ่มที่ 15 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติม T₄ DNA polymerase (5 U/µl) 2.5 µl แล้วบ่มต่ออีก 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.5 M EDTA (pH 8.0) 5 µl จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ โดย phenol/chloroform

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างโดยเทคนิค cDNA-AFLP

ตัด cDNA สายคู่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด rare cutter (*EcoRI*) ที่มีตำแหน่งจดจำในการตัดขนาด

6 คู่เบส และเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด frequent cutter (*MseI*) ที่มีตำแหน่งจดจำในการตัดขนาด 4 คู่เบส เชื่อมต่อคิเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดเข้ากับ *EcoRI* adaptor และ *MseI* adaptor เพิ่มปริมาณชิ้นคิเอ็นเอ 2 ครั้ง โดยในครั้งแรก (preselective amplification) ใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัวที่ปลาย 3' จาก adaptor โดยมีองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ 10X PCR buffer 2.5 μ l, 2 mM dNTP 2.5 μ l, 50 mM $MgCl_2$ 0.75 μ l, 0.5 μ M *EcoRI*+1 primer และ 0.5 μ M *MseI*+1 primer 1 μ l, *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.1 μ l และน้ำกลั่นให้ครบ 25 μ l โปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ 24 รอบที่ 94 °C 30 วินาที 55 °C 60 วินาที 72 °C 60 วินาที นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเจือจาง 20 เท่าด้วยสารละลาย TE buffer เพื่อนำมาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณคิเอ็นเอครั้งที่ 2 (selective amplification) โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์อีก 3 ตัว ที่ปลาย 3' จาก adaptor โดยมีองค์ประกอบดังนี้ 10X PCR buffer 2 μ l, 2 mM dNTP 2 μ l, 50 mM $MgCl_2$ 0.6 μ l, 0.25 μ M *EcoRI*+3 primer และ 0.25 μ M *MseI*+3 primer 1 μ l, *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.1 μ l และน้ำกลั่นให้ครบ 20 μ l ใช้โปรแกรม touch down ลดอุณหภูมิในขั้น annealing ลงรอบละ 0.7 °C จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย 35 รอบของ 94 °C 30 วินาที 56 °C 60 วินาที และ 72 °C 60 วินาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ โดยการทำอิเล็กโทรโฟเรซิสใน 6% polyacrylamide gel และย้อมด้วยซิลเวอร์ในเตรท

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการตรวจสอบโดยเทคนิค differential display ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 136 คู่ พบว่ามีเพียง 72 คู่ ที่ให้แถบคิเอ็นเอชัดเจนดังตัวอย่างใน Figure 1a โดยพบแถบคิเอ็นเอที่ให้ความต่างระหว่างหอยระยะโกลคิเดียและโตเต็มวัยทั้งหมด 16 แถบ จากไพรเมอร์ 15 คู่ เป็นแถบคิเอ็นเอที่จำเพาะกับเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยระยะโตเต็มวัย 15 แถบ และจำเพาะกับโกลคิเดีย 1 แถบ ในขณะที่แถบคิเอ็นเอที่ตรวจสอบโดยเทคนิค

cDNA-AFLP ด้วยไพรเมอร์ 64 คู่ ดังตัวอย่างใน Figure 1b พบแถบคิเอ็นเอที่ให้ความต่างระหว่างทั้ง 2 ระยะทั้งหมด 14 แถบ จากไพรเมอร์ 14 คู่ ซึ่งเป็นแถบคิเอ็นเอที่จำเพาะกับหอยระยะโตเต็มวัยทั้ง 14 แถบ เมื่อนำแถบคิเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณซ้ำโดยใช้ไพรเมอร์คู่เดิม พบว่ามีแถบคิเอ็นเอ 12 แถบ จากเทคนิค differential display และ 14 แถบ จากเทคนิค cDNA-AFLP ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ นำชิ้นคิเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ที่มีความยาวพอสมควร มาโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ทั้งหมด 7 และ 6 แถบ ตามลำดับ โดยมีขนาดความยาวของคิเอ็นเอตั้งแต่ 84 ถึง 335 นิวคลีโอไทด์ (Table 1-2) และเมื่อนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าชิ้นส่วนคิเอ็นเอทั้งหมดมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในหอยสมุดจิโนม cDNA จากเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยมุกน้ำจืด (*Hyriopsis cumingii*) Bai et al. (2010) รายงานชิ้นที่มีแนวโน้มเกี่ยวข้องกับการสร้างมุกโดยการวิเคราะห์ ESTs (expressed sequence tags) ของเนื้อเยื่อแมนเทิลจากหอยมุกน้ำจืด *H. cumingii* Lea 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ calcium metabolism เพื่อสร้าง calcium carbonate ที่เป็นองค์ประกอบหลักในมุก กลุ่มยีนที่ควบคุมการสร้าง extracellular matrix protein และ cytoskeleton protein ซึ่งโปรตีน 2 กลุ่มนี้มีแนวโน้มเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างมุก โดยจากการทดลองพบคิเอ็นเอชิ้นหนึ่งเป็นส่วนของยีนควบคุมการสร้าง fasciclin-like protein ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม extracellular matrix protein แถบคิเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค differential display และ cDNA-AFLP มีขนาดไม่ยาวมากนัก โดย cDNA ที่สังเคราะห์เพื่อใช้ในเทคนิค differential display มาจากการใช้ oligo dT primer ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นคิเอ็นเอดังกล่าวอยู่บริเวณ 3' UTR ซึ่งไม่ถูกแปลรหัส หรืออาจมีส่วนของยีนด้าน 3' เพียงเล็กน้อย ในขณะที่แถบคิเอ็นเอที่ได้จาก cDNA-AFLP เป็นแถบที่ได้จากการตัด cDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบสุ่ม อย่างไรก็ตามเทคนิค differential display และ cDNA-AFLP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ

สามารถใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ดี โดยมีรายงานว่ายีนหลายยีนได้มาจากการใช้เทคนิคดังกล่าว ได้แก่ยีนที่เกี่ยวข้องกับ fertility restoration ในข้าวโพด (Zhang and Zheng, 2008) ยีนทนแล้งในข้าวบาร์เลย์ (Supranova *et al.*, 2007) และ otubain-like cystein protease gene ใน *Pinus radiata* (Aquea *et al.*, 2008) เป็นต้น เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากเทคนิค cDNA-AFLP ที่มีขนาดยาวพอสมควรมาออกแบบไพรเมอร์ เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับชนิดของหอยมุกน้ำจืด *C. hainesiana* ซึ่งเป็นหอยมุกน้ำจืดที่สามารถสร้างมุกได้ดีและใช้ในอุตสาหกรรมเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ CAF9 (CAF9F: 5'CGGAAATCAACCCGAAGTGA 3' / CAF9R: 5' CTCGTGTCATTTTCATGCGTG 3') ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 220 คู่เบส ที่จำเพาะกับหอย *C. hainesiana* ที่สร้างมุกได้ดี แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในหอย *H. desowitzi* และ *H. myersiana* ที่สร้างมุกได้ปานกลาง และ *Uniandra* sp. ที่ไม่สร้างมุก (Figure 2)

สรุปผลการทดลอง

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัยของหอยมุกน้ำจืด *C. hainesiana* ด้วยเทคนิค differential display โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 136 คู่ พบแถบดีเอ็นเอ 16 แถบ จากไพรเมอร์ 15 คู่ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างหอยระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัย สำหรับลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค cDNA-AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่ พบแถบดีเอ็นเอ 14 แถบ จากไพรเมอร์ 14 คู่ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างหอยระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัย นำแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดพอเหมาะจากเทคนิค differential display 7 แถบ และ cDNA-AFLP 6 แถบ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมดมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในห้องสมุดจีโนม cDNA จากเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยมุกน้ำจืด *H. cumingii* Lea โดยมีดีเอ็นเอชิ้น DD1 เป็นส่วนของยีนควบคุมการสร้าง fasciclin-like protein ที่มีแนวโน้ม

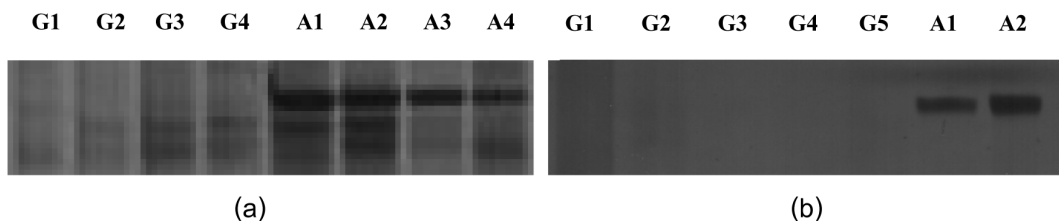


Figure 1 DNA fingerprints of freshwater pearl mussel *Chamberlainia hainesiana* glochidia (G) and adult (A) stages based on differential display using 5'-TGCGGCTGAG-3' / 5'-dT₁₂CA-3' primer pair (a) and cDNA-AFLP using 5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3' / 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC AG-3' primer pair (b)

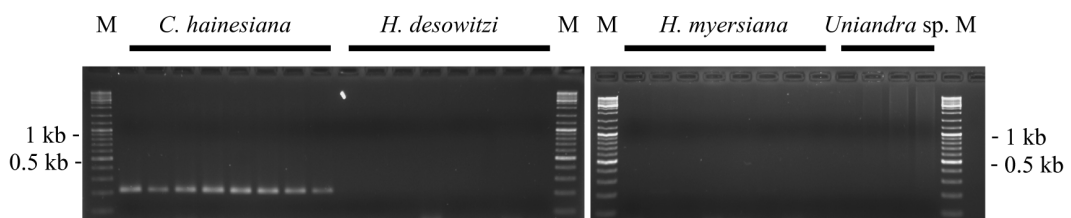


Figure 2 DNA bands specific to *Chamberlainia hainesiana* using CAF9-F/CAF9-R primer pair as compare to other freshwater mussels (M = 1kb ladder DNA marker)

Table 1 Nucleotide sequences of differentially expressed fragments between glochidia and adult stages of *Chamberlainia hainesiana* from differential display technique (bold and underline = primer sequences)

Fragments	Nucleotide sequences	Size (bp)
DD1	<u>CCAGATGCACT</u> AACAGTTGAAACAATAAATTATGTGCTTTTGATTCCA GGATTGGAGATAATACAGTACTAAAATCCTTTCTGCTTACCATTATGTGAA TTATCCACAGGTTTGTTCAGTCAAAAGAAATGCATAGATAGTATTTGTGTTAGA CATAGGCCAGACATCCAGGTCAGTTTGATATGCAAAAGCACTATCCCCCATG CTTTTCTGTCTATGCAGTGACATCTATTGAAATAAAGAAGACTTTTCTA <u>CTAAAAAAAAAAAA</u>	273
DD3	<u>GGTGA CTGTG</u> TAAATGATTTTTGTAAGAAAATGTTAACCACGTTTTTTACG TGAAATGTACTTGTTCATACTTATTTTTGCTAATATGATTTCTAAGTTGTAC TGTATAGTCAGATACGTGATTTCAAATTTAAATATTTGTAAATGTTTATGAA TAAATGTAATTTCACTCATTAAATCCTTGTGC <u>CTAAAAAAAAAAAA</u>	202
DD4	<u>TGCTGCAGGT</u> CATCAACAGGAACGTGAAAATAAAAAGAACATCATTCAAT GAAAATCACTTTATTAAATAGTTTAAGCCTAGGTACCTTTGTCACCAACATG CCTACTTTTATAAGAAATATTTTATATCAAGGTCCACATTAAACATAAAAATA TTCTATTCACTGATACATTTCTAGGCTTGAACCTATTTTAGATCAGAAAGC TGTATTTTTATAAAAATTGACAATAAAACATATAT <u>CTAAAAAAAAAAAA</u>	256
DD5	<u>GGACTGCAGACA</u> ATGGTGATTTAAACGATCTCACTGACATGGCGTTGGAA CCGGATGAGCCGACACTATAATGTACAAAAGCAGTGAACACTCAACGAGTC ACTGGGTACACGCATAATCAAATGATTACATGAGATCAATAAAGATATTAA <u>TATGAAAAAAAAAAAA</u>	172
DD7	<u>TTATCGCCCCA</u> TGCGATGGTTACGGCCACTCGAATCATCACCACCATCATCAT CATCGATGCATTTGCGTACCAGACAGGTTTGCCTGTCCCTGGCAATATCCATA TTTGCGGGCAGGTGCCACTATTGCCCTCCTTGGCAAGTAAAATGCGGCTGGGTG TACTGCTGCAGACAATGGTGATTTAAACGATCTCACTGACATGGCGTTGGAA CCGGATGAGCCGACACTATAATGTACAAAAGCAGTGAACACTCAACGAGTCA CTGGGTTACACGCATAATCAAATGATTACATGAGATCAATAAAGATATTAATA <u>TGAAAAAAAAAAAA</u>	335
DD12	<u>GGCTGCAGAAA</u> ATGGTGATTTAAACGATCTCACTGACATGGCGTTGGAAC CGGGTGAGCCGACACTATAATGTACCAAGCAGCAAACTACTCAACGAGTCACT GGGTTACACGCATAATCAAATGATTACTTGAGATCAATAAATTAATAATA <u>TGAAAAAAAAAAAA</u>	171
DD16	<u>GGGAATTCGG</u> CAATGGCTTTGGAGGAGGATACGGCTACAGCAGACGTCCTA GAAATATTACTAAACAAGACAGACACAACCAAAGAAATGGGACTCAACCGAAC GAAAGTACAACGTCAATTTGAACCATAGTTACGAATTTATTCTATTTGTACT CTAATAAAATCGTTTGATT <u>TGAAAAAAAAAAAA</u>	190

Table 2 Nucleotide sequences of differentially expressed fragments between glochidia and adult stages of *Chamberlainia hainesiana* from cDNA-AFLP (bold and underline = primer sequences)

Fragments	Nucleotide sequences	Size (bp)
CAF2	<u>GACTGCGTACCAATT</u> CAACAAGATTTGGAACTCCAAATCAACT AACAAAGTAACCAATTGGAATCAAGT <u>TACTCAGGACTCATC</u>	84
CAF3	<u>GACTGCGTACCAATT</u> CAACCTACTGGCCTTGATCAATCGTGAATTCAC ACATATATCGAGAATATGGAACAGGCAAAGT <u>TACTCAGGACTCAT</u>	94
CAF6	<u>GACTGCGTACCAATT</u> CACCAAAATCTTGCCAACTCCCCAAGGAGGGAGA GATCCCCCTTCAAGT <u>TACTCAGGACTCAT</u>	77
CAF8	<u>GACTGCGTACCAATT</u> CACGAGTAAGTGAACCAGACAATTCCTCAAGAAA GTTTGATCCATCAGTGCTTCTTCAACAGCATCATATCCTTTCTCTTTTCC AAATGTGTAGTAGTTGTTTTCTTAGATAAAATTTTCAGAACTATGTGCACTA GGATGAATGGAATCATCAAGTTCTCCTTGATCAGAAGGGTACATTTCAAC AATTCCATTACAATGGAACTGGATTATATCTAAGCTACATGATCTCTG TGACAATATTGTGCCTGT <u>TACTCAGGACTCAT</u>	285
CAF9	<u>GACTGCGTACCAATT</u> CACGGAAATCAACCCGAAGTGAGTTTCTCAGAGA CGTGCAAGCGCCTTGTTGAGTATGGCCATAGCGGGTTGTGGAATACCAA GTACGCTTACTGCAACATGATATCAGTTGATATGATTGCATGTTACCCGGG AAGTTTTCTCAGAATGGGTGAGTGTTCTGAGTATTTCAAGATATTCGGACAT CCCACGCATGAAATGACACGAGTAGCTGT <u>TACTCAGGACTCAT</u>	246
CAF10	<u>GACTGCGTACCAATT</u> CATTGACCAGGCATTACATGCCATGTTGGTACA GCTGAATATACCTGCCAGTTAGGACAGACGAATTTGCTGACCTTGGTGT <u>TACTCAGGACTCAT</u>	113

ว่าเกี่ยวข้องกับการสร้างมูก นอกจากนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับหอยมูก *C. hainesiana* ซึ่งเป็นชนิดที่สร้างมูกได้ดี โดยตรวจสอบความจำเพาะเปรียบเทียบกับหอยมูกน้ำจืดชนิดที่สร้างมูกได้ปานกลางและไม่สามารถสร้างมูกได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ปี 2550-2551 และสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการทุนวิจัยมหาวิทยาลัย สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีปี 2552

เอกสารอ้างอิง

- อรภา นาคจินดา นาฏยา พิศพิจิต และวิจิตรา อินทร์เกลี้ยง. 2529. การศึกษาชีวประวัติบางประการของหอยมูกน้ำจืดในจังหวัดกาญจนบุรี. ใน รายงานประจำปี 2529 สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดกาญจนบุรี. กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. น. 17-28.
- อรภา นาคจินดา อ้อมเดือน มีชัย สาธิต โกวิททอ อุทัยวรรณ โกวิททอ และกรรณิกา ชัชวาลวานิช. 2547. รายงานความก้าวหน้าของการวิจัยปีที่ 3 ครั้งที่ 2 โครงการวิจัยย่อยที่ 2 การศึกษาศักยภาพการผลิตไข่มุกจากหอยกาบน้ำจืดวงศ์ Amblemidae ในประเทศไทย. สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

- Aquea, F., Gutiérrez, F., Medina, C. and Arce-Johnson, P. 2008. A novel otubain-like cystein protease gene is preferentially expressed during somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. *Mol Biol Rep* 35: 567-573.
- Bai, Z., Yin, Y., Hu, S., Wang, G., Zhang, X. and Li, J. 2010. Identification of genes potentially involved in pearl formation by expressed sequence tag analysis of mantle from freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii* Lea). *J Shellfish Res* 29: 527-534.
- Dazhong, Z., Min, C., Kang, C., Li, W., Hualiang, H. and Kehui, T. 1998. Isolation of a vernalization-related cDNA clone (VRC) using mRNA differential display in winter wheat. *Chin Sci Bull* 43: 14.
- Geuna, F., Banafi, R. and Bassi, D. 2005. Identification and characterization of transcripts differentially expressed during development of apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit. *Tree Genet Genome* 1: 69-78.
- Li, C., Bai, Y., Jacobson, E., Visser, R., Lindhout, P. and Bonnema, G. 2006. Tomato defense to the powdery mildew fungus: differences in expression of genes in susceptible, monogenic- and polygenic resistance responses are mainly in timing. *Plant Mol Biol* 62: 127-140.
- Post, A.R. 1982. *Evaluation of Freshwater Mussels (Megaloniaias gigantea) as a New Protein Source*. University of Tennessee Press, Knoxville.
- Supranova, T., Krungman, T., Distelfeld, A., Fahima, T., Nevo, E. and Korol, A. 2007. Identification of novel gene (*Hsdr4*) involved in water-stress tolerance in wild barley. *Plant Mol Biol* 64: 17-34.
- Venkatachalam, P., Thulaseedharan, A. and Raghothama, K. 2009. Molecular identification and characterization of a gene associated with the onset of tapping panel dryness (TPD) syndrome in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell.) by mRNA differential display. *Mol Biotechnol* 41: 42-52.
- Yin, J., Wang, G., Xiao, J., Ma, F., Zhang, H. Sun, Y., Diao, Y. Huang, J., Guo, Q. and Liu, D. 2010. Identification of genes involved in stem rust resistance from wheat mutant D51 with the cDNA-AFLP technique. *Mol Biol Rep* 37: 1111-1117.
- Zhang, J., Turkey, R.B., and Stewart, J.M. 2008. Comparative analysis of gene expression between CMS-D8 restored plants and normal non-restoring fertile plants in cotton by differential display. *Plant Cell Rep* 27: 553-561.
- Zeppa, S., Guidi, C., Zambonelli, A., Potenza, L., Vallorani, L. Pierleoni, R., Sacconi, C. and Stocchi, V. 2002. Identification of putative genes involved in the development of *Tuber borchii* fruit body by mRNA differential display in agarose gel. *Curr Genet* 42: 161-168.
- Zhang, Z. and Zheng, Y. 2008. Identification of candidate genes associated with fertility restoration in maize S cytoplasmic male sterility. *Plant Mol Biol* 26: 60-71.