

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์และการทดสอบยืนยันโดยใช้วิเคราะห์ พ่อ-แม่-ลูก ในกุ้งก้ามกราม

Microsatellite markers development and the confirmation test based on parentage analysis in *Macrobrachium rosenbergii* (DE MAN, 1879)

พนม กระจำพจน์ สอดสุข* ศรีรัตน์ สอดสุข พลชาติ ผิวเณร และ สุภัทรา อุไรวรรณ

Panom K. Sodsuk*, Srirat Sodsuk, Ponlachart Pewnane and Supattra Uraiwan

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ คลองหลวง ปทุมธานี 12120

Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

* Corresponding author: panomks@yahoo.com

บทคัดย่อ

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในกุ้งก้ามกรามจำนวน 15 ตำแหน่ง ได้รับการพัฒนาโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ 2 ชนิด คือ (AG)₁₀ และ (TG)₁₀ เป็นโพรบ (probe) ในขั้นตอน enrichment ไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาได้มีลำดับเบสซ้ำ (repeat motif) ทั้งแบบสมบูรณ์ (perfect) ไม่สมบูรณ์ (imperfect) และแบบรวม (compound) ทั้ง 15 ตำแหน่ง สามารถวิเคราะห์โดยใช้โพรเมอร์ 15 คู่ ที่ผ่านการทดสอบจนได้องค์ประกอบสถานะปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสม จากการวิเคราะห์ตัวอย่างประชากรกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟักจำนวน 18 ตัว ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของทั้ง 15 ตำแหน่ง ประกอบด้วยจำนวนแอลลีล (Na) ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (Ho) และค่าคาดคะเนเฮเทอโรไซโกซิตี (He) อยู่ระหว่าง 3–11, 0.4444–0.9444 และ 0.5381–0.9190 ตามลำดับ ในจำนวน 15 ตำแหน่ง พบ 4 ตำแหน่ง ที่แสดงการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กอย่างมีนัยสำคัญ

($P_{HWE} < 0.05$) ในแบบที่มีเฮเทอโรไซโกซิตีต่ำกว่าที่ควรจะเป็น ($H_o < H_e$) ซึ่งจะพบบ่อยมากในประชากรของโรงเพาะฟัก จากการทดลองวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 15 ตำแหน่งในตัวอย่างพ่อ-แม่-ลูกกุ้งก้ามกรามครอบครัวเดียวกัน จำนวน 9 ครอบครัวได้พิสูจน์ยืนยันการถ่ายทอดยีนว่าเป็นไปตามกฎของเมนเดล ทำให้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 15 ตำแหน่งมีความน่าเชื่อถือสูง และนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมั่นใจ

ABSTRACT

Fifteen microsatellite markers in *Macrobrachium rosenbergii* were developed from 2 oligonucleotides, (AG)₁₀ and (TG)₁₀, which were used as probes in enrichment process. Three types of the repeat motifs including perfect, imperfect and compound repeats were found. All 15 microsatellite primers were tested and optimized for the best

reaction in PCR process. Genetic diversity data of the 15 loci, including allele number ($N_a = 3-11$), observed heterozygosity ($H_o = 0.4444-0.9444$) and expected heterozygosity ($H_e = 0.5381-0.9190$), were reported by the analysis with a number of 18 *Macrobrachium rosenbergii* individuals from hatchery stock. Of the 15 loci, 4 loci were significantly different from Hardy-Weinberg equilibrium ($P_{HWE} < 0.05$) as heterozygote deficiency, which would be very commonly found in hatchery stocks. From a confirmation test based on analyses of 9 father-mother-offspring *Macrobrachium rosenbergii* families, the “Principle of Segregation” of Mendel was proved to be true for the 15 microsatellite loci. This makes all the 15 microsatellite loci become highly reliable and suitable to be utilized for any further purposes.

คำสำคัญ: กุ้งก้ามกราม เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ การทดสอบยืนยัน การวิเคราะห์พ่อ-แม่-ลูก

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*, microsatellite marker, confirmation test, parentage analysis

บทนำ

เป็นเวลาหลายทศวรรษมาแล้วที่ กุ้งก้ามกราม หรือ giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) (สมพงษ์, 2546; ITIS, 2010) ของไทย ถูกเพาะพันธุ์จากธรรมชาติจนกลายมาเป็นพันธุ์เพาะเลี้ยง ซึ่งในปัจจุบันปรากฏว่ามีพันธุ์ (stock) กุ้งก้ามกรามของฟาร์มเพาะเลี้ยงหลายแห่งเกิดขึ้น โดยเฉพาะในบริเวณพื้นที่ภาคกลางของประเทศ อย่างไรก็ตาม กุ้งก้ามกรามพันธุ์เพาะเลี้ยงเหล่านี้ ได้เกิดการเสื่อมโทรมของสายพันธุ์ลง โดยลักษณะที่ปรากฏให้เห็นชัดเจน ได้แก่ กุ้งหัวโต ตัวเล็ก โตช้า และอ่อนแอเป็นโรคร้าย ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่ทั้งภาครัฐและเอกชนกำลังให้ความสนใจ และนำมาซึ่ง

ความพยายามที่จะผลิตพันธุ์กุ้งก้ามกรามคุณภาพดี ที่โตเร็วและปลอดโรค โดยผ่านกระบวนการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ ภายใต้ระบบ biosecurity (วัฒน, 2553)

เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ช่วยให้การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ได้ผลที่แน่นอน รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ เพราะมีคุณสมบัติที่ดีคือ เป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำกันเป็นชุดสั้นๆ ที่มีอัตราการกลายสูง และมีการถ่ายทอดแบบข่มร่วม (co-dominant) จึงทำให้มีความหลากหลายรูปแบบ (polymorphism) และมีความผันแปรสูงมากสามารถใช้ตรวจสอบความเกี่ยวข้องหรือสายสัมพันธ์ทางเครือญาติ หรือวิเคราะห์ความเป็นพ่อแม่ลูกได้ดี (Liu and Cordes, 2004) บุญเสริม และคณะ (2547) ได้นำเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ ในกุ้งกุลาดำจำนวน 3 คู่ ที่พัฒนาโดย Tassanakajon et al. (1998) มาใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์ ในด้านการเจริญเติบโต อัตรารอด และอัตราการติดเชื้อของกุ้งกุลาดำ 4 ครอบครัว ที่อยู่ในบ่อเดียวกัน จำนวน 4 บ่อ รวม 16 ครอบครัว พบว่าสามารถแยกกุ้งแต่ละครอบครัวได้และยังทำให้ทราบว่ายุงอัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอด และอัตราการติดเชื้อโรคไวรัสบางชนิด ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของกุ้งนั้น

ดังนั้น การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในกุ้งก้ามกราม พร้อมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม และทดสอบยืนยันโดยนำไปทดลองใช้วิเคราะห์กับตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่เป็นพ่อแม่-ลูกในครอบครัวเดียวกัน เพื่อตรวจสอบการถ่ายทอดยีนจากพ่อและแม่ไปสู่ลูกอย่างละครั้ง ตามกฎ “Principle of Segregation” ของเมนเดล (Mendel’s first law) จะทำให้ได้เครื่องหมายพันธุกรรมในกุ้งก้ามกรามที่มีประสิทธิภาพสูงและเชื่อถือได้ สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ในงานที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงและพัฒนาพันธุ์กุ้งก้ามกรามได้อย่างมั่นใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์กุ้งก้ามกราม

อุปกรณ์และวิธีการ

พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์วิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม และทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

ขั้นตอนการดำเนินงานเพื่อพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในกุ้งก้ามกราม ใช้ตามวิธีของ ศรีรัตน์และพนม (2548) โดยเก็บตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก่อนที่จะต่อกับอะแดปเตอร์ (adapter) แล้วจึงเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ ตรวจสอบและคัดเลือกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีลำดับไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธี enrichment โดยใช้โพรบ (probe) ประกอบด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ 6 ชนิด ได้แก่ (AG)₁₀, (TG)₁₀, (TAC)₁₀, (CAA)₁₀, (CAG)₁₀ และ (GAT)₁₀ ซึ่งติดฉลากที่ปลายด้าน 5' ด้วยไบโอติน แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกคัดเลือกด้วยวิธีพีซีอาร์ เชื่อมผลิตภัณฑ์ที่ได้เข้ากับพลาสมิด และนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ด้วยวิธี electroporation คัดเลือกโคลนด้วยวิธี dot blot และ colony hybridization โดยใช้โพรบที่ติดฉลากที่ปลายด้าน 3' และตรวจสอบผลด้วยวิธี chemiluminescent จากนั้นหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่มีลำดับไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อออกแบบไพรเมอร์ ที่จำเพาะของลำดับไมโครแซทเทลไลต์ และทดสอบไพรเมอร์ที่ได้พร้อมกับปรับสภาพอะปพลิเคชันพีซีอาร์ที่เหมาะสม โดยวิเคราะห์กับประชากรพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามจำนวน 18 ตัว แล้ววิเคราะห์จำนวนแอลลีล (Na) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี ทั้งในรูปค่าสังเกต (Ho) และค่าคาดหวัง (He) พร้อมทั้งทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (HWE) ด้วยวิธี Likelihood ratio test โดยใช้โปรแกรม FSTAT version 1.2 (Goudet, 1995)

ทดสอบยืนยันเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และตรวจสอบการถ่ายทอดยีนจากพ่อแม่ไปสู่ลูก

เพาะพันธุ์กุ้งก้ามกรามจากพ่อแม่พันธุ์จำนวน 9 คู่ โดยแยกเพาะเป็นคู่ๆ และแยกลูกของพ่อแม่แต่ละคู่ อนุบาลลูกกุ้งที่เพาะได้แยกกัน สกัดดีเอ็นเอของพ่อแม่

และลูกกุ้งก้ามกราม จำนวน 9 ครอบครัว แล้วตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอพ่อแม่-ลูกกุ้งก้ามกรามแต่ละครอบครัว ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาได้ โดยใช้ไพรเมอร์แต่ละคู่แยกกัน ด้วยวิธีพีซีอาร์ และตรวจสอบผลโดยวิธี denaturing polyacrylamide sequencing gel electrophoresis ตามรายงานของศรีรัตน์ (2547) นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบการถ่ายทอดยีนจากพ่อแม่ไปสู่ลูกอย่างละครึ่ง หรือตรวจสอบว่ายีนของลูกครึ่งหนึ่งมาจากพ่อ อีกครึ่งมาจากแม่ ตามกฎ “Principle of Segregation” ของเมนเดล โดยใช้วิธี chi-square goodness-of-fit test ด้วยโปรแกรม SAS Version 8 (SAS Institute Inc., 2000)

ผลการทดลองและวิจารณ์

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม และสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์หรือไพรเมอร์ที่พัฒนาได้ในกุ้งก้ามกราม ประกอบด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 15 ตำแหน่ง มีลำดับเบสซ้ำ (repeat motif) ทั้งที่เป็นแบบสมบูรณ์ (perfect) ไม่สมบูรณ์ (imperfect) และแบบรวม (compound) ลำดับเบสซ้ำที่เป็นแบบสมบูรณ์พบ 9 ตำแหน่ง ได้แก่ DOFMCr22, DOFMCr28, DOFMCr30, DOFMCr31, DOFMCr33, DOFMCr36, DOFMCr37, DOFMCr38 และ DOFMCr39 แบบไม่สมบูรณ์ 3 ตำแหน่ง ได้แก่ DOFMCr4, DOFMCr16 และ DOFMCr34 และแบบรวม 3 ตำแหน่ง ได้แก่ DOFMCr25, DOFMCr27 และ DOFMCr35 ทั้ง 15 ตำแหน่งมีความหลากหลายรูปแบบของแอลลีล (allele polymorphism) โดยมีจำนวนแอลลีล (Na) ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (Ho) และค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี (He) อยู่ระหว่าง 3–11, 0.4444–0.9444 และ 0.5381–0.9190 ตามลำดับตำแหน่งที่มีจำนวนแอลลีลและค่าเฮเทอโรไซโกซิตีสูงสุด ได้แก่ DOFMCr16 และต่ำสุด ได้แก่ DOFMCr4 ในจำนวน 15 ตำแหน่งนี้ พบว่ามี 4 ตำแหน่ง คือ

DOFMCr25, DOFMCr28, DOFMCr35 และ DOFMCr37 ที่แสดงนัยสำคัญว่ามีความเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ($P_{HWE} < 0.05$) (Table 1)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 10 ng/ μ l, 1x PCR buffer, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.25 mM primer, 0.2 u/ μ l Taq polymerase (Promega) สภาวะปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสม คือ รอบที่ 1: 94 °C 3 นาที รอบที่ 2-35: 94 °C 30 วินาที, 60 °C 30 วินาที (ยกเว้น DOFMCr28 53 °C), 72 °C 1 นาที และรอบสุดท้าย ที่ 72 °C 5 นาที

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในกิ้งก่ามกรามครั้งนี้ ได้ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ทั้งที่เป็นแบบสองเบสซ้ำ ได้แก่ (AG)₁₀ และ (TG)₁₀ และ

สามเบสซ้ำ ได้แก่ (TAC)₁₀, (CAA)₁₀, (CAG)₁₀ และ (GAT)₁₀ เป็นโพรบ เช่นเดียวกับการพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ในกิ้งก่ามกราม ที่รายงานโดย Charoentawee *et al.* (2006) ซึ่งสามารถใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่เป็นแบบสามเบสซ้ำ สอดคล้องกับโพรบที่ใช้ในการทดลองนี้คือ (CAG)₁₀ และ (GAT)₁₀ แต่การศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่เป็นแบบสามเบสซ้ำได้ ซึ่งสันนิษฐานว่า น่าจะเป็นเพราะสภาวะของบางปฏิกิริยาในขั้นตอนการพัฒนา ยังไม่เหมาะสม ทำให้โพรบแบบสามเบสซ้ำไม่สามารถจับกับลำดับดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้สามารถพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ที่เป็นแบบสองเบสซ้ำในกิ้งก่ามกราม

Table 1 Details of all the microsatellite primers, genetic diversity data (Na, Ho & He), and the P values from Hardy-Weinberg equilibrium tests (P_{HWE})

Primer name (Locus/ci)	GenBank accession no.	Primer sequences (5' – 3')	Repeat motif	Size range	Na	Ho	He	P_{HWE}
DOFMCr4	HQ722921	F: GAAAAGAAGCGATAGACCGATGC R: GCGATTCTCACACCACTCTCATC	(TG) ₁₀ T(TG) ₃	195-201	3	0.4444	0.5381	0.611
DOFMCr16	HQ722922	F: TGATACTCGCTCTCCATACGTC R: GCCAGTGTGCCGTAATAAATCAG	(GT) ₆ AT(GT) ₁₅	241-301	11	0.9444	0.9190	0.776
DOFMCr22	HQ722923	F: GCTGGTAGAATGTCGTCAACAGG R: TGGCTTTAGTGAATGGCTATAC	(TC) ₂₁	180-228	7	0.8333	0.8508	0.096
DOFMCr25	HQ722924	F: GATCCACGCTGACTCTAGTAATG R: CGATGGTATTTCTGGCTGTACG	(AG) ₂₂ (AC) ₂ (AG) ₁₈	174-220	7	0.7778	0.8730	0.010
DOFMCr27	HQ722925	F: GCGATGATGGAGTCTCAGAAG R: AGGTTTTGCCGATGAAGAATCAC	(AG) ₂₅ GG(AG) ₄ (GAC) ₆	258-284	7	0.8889	0.8603	0.109
DOFMCr28	HQ722926	F: GGCTATATGGAAGTCGTCTCG R: GGAGTTGGAAATGAACCTTCACC	(GA) ₃₃	221-257	7	0.7222	0.8540	0.024
DOFMCr30	HQ722927	F: TACAACATTGCACCTCAGTGGAG R: TATGATTATCCCAGGGCATGTG	(TC) ₃₇	215-273	7	0.6667	0.8127	0.365
DOFMCr31	HQ722928	F: GCTCATTCGCTCTACATTCCTC R: GGGTACTTATCCCTCCCATTGC	(AG) ₃₀	194-242	8	0.8333	0.8810	0.101
DOFMCr33	HQ722929	F: CAGCTCTAACCTGATTGAAAGAC R: GCAGGCATTATCGTTACTTCTCC	(CT) ₂₅	224-268	8	0.9444	0.8730	0.147
DOFMCr34	HQ722930	F: GAAGACAATCGGCAACGAAAATG R: TCAGGGTGTAGTCTCTCGTTCTG	(GA) ₁₄ GG(GA) ₂₄	260-286	7	0.6111	0.8032	0.332
DOFMCr35	HQ722931	F: GGGAGCATTTTCAGAACACGAAAC R: ACACAGACACGGTAACGAACACA	[(TG) ₆ TC(TG) ₅]..... [(TG) ₃ CG(TG) ₂ CA(TG) ₄]	232-244	4	0.5000	0.6762	0.015
DOFMCr36	HQ722932	F: GGTCTTATCAGCCATCCATCTG R: CTCTCCCAAAACCGAAATCTACC	(GA) ₂₅	251-313	6	0.7778	0.7810	0.897
DOFMCr37	HQ722933	F: GCCTCGAACCGATTTCTGTCTAC R: GACTTCTCAAGGGCTGGGTAATG	(GA) ₂₄	213-237	7	0.6111	0.8063	0.004
DOFMCr38	HQ722934	F: TTCCTGTGTGAATGTTGAGATGC R: GAGAACITTCGGTTTACCCTTCC	(TG) ₁₁	232-244	5	0.7778	0.7365	0.746
DOFMCr39	HQ722935	F: GGAACAAATGAAGACTTGGATGC R: CTCTCTCTCCCTCAAGGTGTTGG	(AG) ₂₉	263-293	5	0.7778	0.7270	0.306

Note: $P_{HWE} < 0.05$, significantly deviate from Hardy-Weinberg equilibrium.

ได้ถึง 15 ตำแหน่ง ทั้งหมดมีความสอดคล้องกับ โพรเบมสองเบสซ้ำที่ใช้ คือ (AG)₁₀ และ (TG)₁₀ โดยที่มีความสอดคล้องกับ (AG)₁₀ 9 ตำแหน่ง และ สอดคล้องกับ (TG)₁₀ 6 ตำแหน่ง (Table 1) แสดงว่าการศึกษาในกึ่งกัมกรามครั้งนี้ พบไมโครแซทเทลไลต์ที่มีลำดับเบสซ้ำ (AG)_n มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ในสัตว์น้ำประเภทกึ่งก่อนหน้านี้ ไม่ว่าจะเป็นในกึ่งกัมกราม (Chand *et al.*, 2005; Charoentawee *et al.*, 2006; Divu *et al.*, 2008a; 2008b; Bhat *et al.*, 2009) หรือกึ่งกลาคา (Wuthisuthimethavee *et al.*, 2003) ต่างก็พบว่า ไมโครแซทเทลไลต์ที่มีลำดับเบสซ้ำ (AG)_n เป็นแบบที่พบมากที่สุด ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงน่าจะเป็นการยืนยันว่า ไมโครแซทเทลไลต์ที่พบมากที่สุดในจีโนมของกึ่งกัมกราม คือ ไมโครแซทเทลไลต์ที่มีลำดับเบสซ้ำ (AG)_n

ในจำนวนเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 15 ตำแหน่ง ที่ได้จากการพัฒนาในกึ่งกัมกรามครั้งนี้ ปรากฏว่ามี 4 ตำแหน่ง (DOFMCr25, DOFMCr28, DOFMCr35 และ DOFMCr37) แสดงการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กอย่างมีนัยสำคัญ โดยผลที่ปรากฏออกมา เป็นการแสดงสัดส่วนของเฮเทอโรไซโกตต่ำกว่าที่ควรจะเป็น (heterozygote deficiency, $H_o < H_e$) (Table 1) ซึ่งสาเหตุที่เป็นไปได้ นอกจากจะเนื่องมาจากการใช้ตัวอย่างจำนวนน้อยในการดำเนินงานแล้ว ปรากฏการณ์ดังกล่าวยังเป็นสิ่งที่พบได้เสมอในประชากรโรงเพาะฟัก (hatchery stock) ที่มีการคัดเลือกเข้าไปเกี่ยวข้องทั้งโดยตรงและโดยอ้อม หรือมาจากการเพาะพันธุ์โดยใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อย หรือมีการนำประชากรจากต่างโรงเพาะฟักเข้ามาปะปนกัน (Allendorf and Ryman, 1987) ด้วยเหตุนี้จึงไม่น่าสงสัยที่จะพบว่ามี การเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในการศึกษาครั้งนี้ เพราะตัวอย่างกึ่งกัมกรามที่ใช้ในการดำเนินงานครั้งนี้ มาจากประชากรพ่อแม่พันธุ์ที่เพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์ในโรงเพาะฟัก ของสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์

กรรมสัตว์น้ำซึ่งเป็นไปไม่ได้ที่จะไม่มีการปฏิบัติงานในทางดังกล่าวข้างต้นเข้ามาเกี่ยวข้อง Charoentawee *et al.* (2007) ได้รายงานผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกึ่งกัมกราม จากประชากรโรงเพาะฟักในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์พบว่ามีการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ในแบบที่มีเฮเทอโรไซโกตต่ำกว่าที่ควรจะเป็นเกือบทุกประชากรที่ศึกษาโดยได้ระบุถึงสาเหตุที่ทำให้ปรากฏผลดังกล่าวว่า น่าจะเกิดจากการใช้ตัวอย่างจำนวนน้อย และการผสมปะปนกันระหว่างต่างประชากรในตัวอย่างที่นำมาศึกษา นอกจากนี้ยังมีรายงานจำนวนตำแหน่งที่แสดงการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก และจำนวนตำแหน่งที่มีความหลากหลายรูปแบบของแอลลีลที่พัฒนาได้ทั้งหมด ในจำนวนที่แตกต่างกัน โดย Chand *et al.* (2005) ได้รายงานการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กไว้ที่ 2 ตำแหน่ง จากจำนวนที่พัฒนาได้ทั้งหมด 6 ตำแหน่ง Bhasu *et al.* (2008) รายงาน 1 ตำแหน่ง จากทั้งหมด 8 ตำแหน่ง Divu *et al.* (2008a) รายงาน 3 ตำแหน่ง จาก 8 ตำแหน่ง Divu *et al.* (2008b) รายงาน 2 ตำแหน่ง จาก 6 ตำแหน่ง Charoentawee *et al.* (2006) รายงาน 5 ตำแหน่ง จาก 10 ตำแหน่ง Bhat *et al.* (2009) รายงาน 1 ตำแหน่ง จาก 8 ตำแหน่ง และ See *et al.* (2009) รายงาน 7 ตำแหน่ง จากทั้งหมด 8 ตำแหน่ง ขณะที่การศึกษาครั้งนี้พบการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก 4 ตำแหน่ง จากจำนวนทั้งหมด 15 ตำแหน่ง

จากข้อมูลความหลากหลายของแอลลีลของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 15 ตำแหน่ง ในกึ่งกัมกรามที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำไปพิจารณาถึงประสิทธิภาพของแต่ละตำแหน่ง ในการใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ โดยตำแหน่งที่มีประสิทธิภาพสูง ควรมีจำนวนแอลลีลที่หลากหลายสูงด้วย ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ ตำแหน่งที่น่าจะมีประสิทธิภาพสูงสุด ได้แก่ DOFMCr16 เพราะมีจำนวนแอลลีลที่หลากหลาย

หลายสูงสุด ($N_a = 11$) นอกจากนี้ ประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมสามารถพิจารณาได้จากค่า polymorphic information content (PIC) ซึ่งถ้ายังมีค่ามากก็ยิ่งแสดงว่ามีประสิทธิภาพสูง (Botstein *et al.*, 1980; Liu and Cordes, 2004) และเมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มาคำนวณค่า PIC ของโลกัส DOFMCr4 ที่มีจำนวนแอลลีลต่ำสุด ($N_a = 3$) ไปจนถึงโลกัส DOFMCr16 ที่มีจำนวนแอลลีลสูงสุด ($N_a = 11$) จะได้ค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.5232–0.8935 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า PIC ของ Divu *et al.* (2008b) ที่ได้รายงานไว้ในกุ่มก้ามกราม คือ PIC เฉลี่ย เท่ากับ 0.70 จากจำนวนเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่งที่พัฒนาได้ โดยมีค่าจำนวนแอลลีล 2-6 แอลลีลต่อตำแหน่ง Wuthisuthimethavee *et al.* (2003) ได้รายงานเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในกุ่มกุลาค้าที่พัฒนาได้จำนวน 30 ตำแหน่ง ซึ่งมีค่าจำนวนแอลลีล 5–17 แอลลีลต่อตำแหน่ง และค่า PIC ระหว่าง 0.4739–0.9264 ว่าเป็นเครื่องหมายที่สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ในกุ่มกุลาค้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเมื่อเทียบเคียงกับค่าที่ปรากฏในกุ่มก้ามกรามที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ น่าจะกล่าวได้ว่า เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาได้ในครั้งนี้ สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในกุ่มก้ามกรามได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน

การทดสอบยืนยันเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาได้ในกุ่มก้ามกรามที่เป็นพ่อ-แม่-ลูกในครอบครัวเดียวกัน และตรวจสอบการถ่ายทอดยีนจากพ่อแม่ไปสู่ลูก

จากการทดลองวิเคราะห์ตัวอย่างกุ่มก้ามกรามที่เป็นพ่อ-แม่-ลูกในครอบครัวเดียวกันจำนวน 9 ครอบครัว โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาได้ทั้งหมด 15 คู่ไพรเมอร์ เพื่อวิเคราะห์ทั้ง 15 ตำแหน่งพบว่ามีการถ่ายทอดพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปสู่ลูกทุกตำแหน่ง ตัวอย่างรูปแบบพันธุกรรมหรือจีโนไทป์ที่เกิดจากการถ่ายทอดยีนระหว่างพ่อ-แม่-ลูก

แสดงโดย Figure 1 ซึ่งแสดงรูปแบบพันธุกรรมที่เป็นเฮเทอโรไซโกตหลากหลายรูปแบบ และรูปแบบพันธุกรรมที่เป็นโฮโมไซโกตเหมือนกันหมดทั้งครอบครัว

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n (P_{ij})^2$$

P_{ij} คือ ความถี่แอลลีลของแอลลีลที่ j ณ โลกัส i เมื่อ j คือ 1 ถึง n (Auburn, 2010)

ผลการตรวจสอบการถ่ายทอดยีนจากพ่อแม่ไปสู่ลูกตามกฎของเมนเดล โดยการวิเคราะห์ chi-square goodness-of-fit test (Table 3) พบว่าไม่จำเป็นต้องวิเคราะห์ chi-square ในครอบครัวที่มีรูปแบบพันธุกรรมเป็นโฮโมไซโกตทั้งในพ่อและแม่ เพราะลูกจะมีจีโนไทป์เดียวเหมือนกันหมดทุกตัว ซึ่งพบที่เครื่องหมาย DOFMCr4 (ครอบครัวที่ 2, 3 และ 4), DOFMCr25 (ครอบครัวที่ 9), DOFMCr30 (ครอบครัวที่ 9), DOFMCr34 (ครอบครัวที่ 9), DOFMCr35 (ครอบครัวที่ 3), DOFMCr37 (ครอบครัวที่ 2 และ 9) และ DOFMCr39 (ครอบครัวที่ 8) อย่างไรก็ตาม การปรากฏจีโนไทป์แบบเดียวที่เหมือนกันหมดทุกตัว หรือเหมือนกับจีโนไทป์ของพ่อแม่ในลูกของครอบครัวเหล่านี้ คือแบบที่ควรจะเป็นตามกฎของเมนเดล นอกเหนือจากนี้ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ chi-square (โดยค่า P_{X^2}) ทั้ง 15 ตำแหน่ง ของ 9 ครอบครัว พบว่า แต่ละตำแหน่งมีการถ่ายทอดยีนเป็นไปตามกฎของเมนเดล ($P_{X^2} > 0.05$) ในครอบครัวส่วนใหญ่ (6-9 ครอบครัว) จะมีเพียง 1-3 ครอบครัว ของบางตำแหน่ง ที่ปรากฏค่า $P_{X^2} < 0.05$ (DOFMCr16 ครอบครัวที่ 9, DOFMCr22 ครอบครัวที่ 6 และ 7, DOFMCr25 ครอบครัวที่ 1, 5 และ 6, DOFMCr27 ครอบครัวที่ 6, DOFMCr30 ครอบครัวที่ 1 และ 2, DOFMCr31 ครอบครัวที่ 1 และ 4, DOFMCr35 ครอบครัวที่ 9, DOFMCr36 ครอบครัวที่ 1, DOFMCr38 ครอบครัวที่ 3, 6 และ 7 และ DOFMCr39 ครอบครัวที่ 3) อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์แต่ละตำแหน่งแบบรวมครอบครัว ปรากฏว่า ทุกตำแหน่งแสดงค่า $P_{X^2(Total)} > 0.05$ หรือแสดงว่ามีการถ่ายทอดยีนเป็นไปตามกฎของเมนเดลทุกตำแหน่งซึ่งหมายความว่า เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่

พัฒนาได้ทั้ง 15 ตำแหน่งได้รับการพิสูจน์ยืนยันว่ามีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมในนิวเคลียสจริง จึงมีการถ่ายทอดพันธุกรรมโดยแอลลีลที่ปรากฏจากทั้งฝ่าย

พ่อและแม่ไปยังรุ่นลูก

เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในกุ้งก้ามกรามที่มีรายงานไว้แล้วจำนวนหนึ่งก่อนหน้านี้ (6 ตำแหน่ง

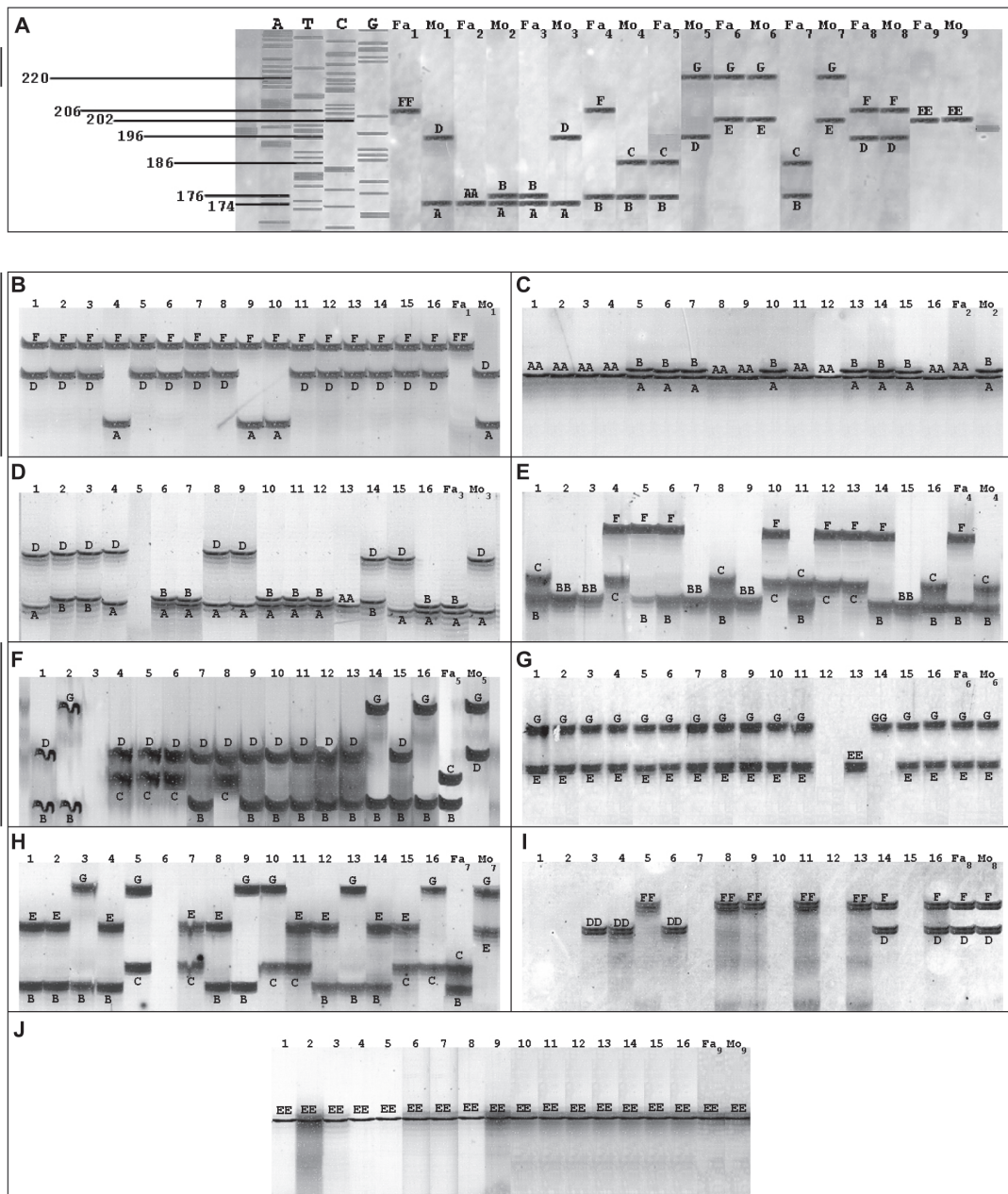


Figure 1 Genetic inheritance shown by observed genotypes at a microsatellite locus developed (DOFMCr25) and tested in 9 father-mother-offspring families of *Macrobrachium rosenbergii*. **A:** genotypes of the 9 parental pairs (Fa₁ & Mo₁ – Fa₉ & Mo₉). **B-J:** 1-16 = offspring, Fa₁₋₉ = father, Mo₁₋₉ = mother. Allelic size/bp: A = 174, B = 176, C = 186, D = 196, E = 202, F = 206, G = 220.

Table 3 The chi-square test P -values (P_{χ^2}) on genetic inheritance of the 15 microsatellite loci tested in 9 father-mother-offspring families of *Macrobrachium rosenbergii*

Family	DOFMCr4				DOFMCr16				DOFMCr22				DOFMCr25				DOFMCr27			
	Parents	Offspring	N	P_{χ^2}	Parents	Offspring	N	P_{χ^2}	Parents	Offspring	N	P_{χ^2}	Parents	Offspring	N	P_{χ^2}	Parents	Offspring	N	P_{χ^2}
1	201/201	195/201	7	1.000	253/267	253/267	4	0.646	180/182	180/224	4	0.682	206/206	174/206	3	0.012	262/268	262/272	3	0.321
	195/201	201/201	7		267/271	253/271	7		224/228	180/228	3		174/196	196/206	13		272/284	262/284	4	
2	201/201	201/201	16	-	267/269	267/269	0		182/228	182/224	3						268/284	268/284	7	
	201/201				267/269	267/269	4	0.321	180/224	180/180	5	0.737	174/174	174/174	9	0.617	262/284	262/276	2	0.108
3	201/201	201/201	16	-	269/285	267/285	2		180/212	180/212	4		174/176	174/196	7		276/280	262/280	7	
	201/201				269/269	269/269	3		180/224	180/224	2						276/284	276/284	5	
4	201/201	201/201	16	-	269/285	269/285	7		212/224	212/224	4		174/176	174/174	1	0.269	280/284	280/284	1	
	201/201				241/241	241/241	3	0.223	180/224	180/182	5	0.919	174/196	174/196	5		272/280	280/280	8	0.112
5	201/201	201/201	16	-	241/259	241/259	6		182/204	180/204	3		174/196	174/196	6		272/280	280/280	4	
	201/201				259/259	259/259	7		182/224	182/224	4		176/186	176/186	3	0.919	262/268	262/276	3	0.682
6	197/201	195/197	5	0.137	263/263	241/259	2	0.838	180/180	180/204	8	1.000	176/206	176/176	5		276/280	262/276	6	
	195/201	197/201	6		263/275	259/259	4		204/224	180/224	8		176/186	176/186	4		268/276	262/280	4	
7	197/201	195/197	5	0.137	263/263	241/269	4		182/204	182/224	6	0.052	176/186	176/206	3	0.033	272/280	262/276	3	0.137
	195/201	197/201	6		263/275	259/259	10		224/228	182/228	2		196/220	176/220	3		262/276	272/276	6	
8	195/195	195/195	6	0.317	263/285	263/275	4		204/224	204/224	6		186/196	186/196	4		262/280	262/280	1	
	195/197	195/197	10		275/285	263/285	2	0.557	224/228	204/228	0	0.037	202/220	202/202	0	0.018	276/280	262/272	2	0.000
9	201/201	197/201	10	0.317	241/267	263/275	2		224/228	224/224	8	0.037	202/220	202/202	13		272/276	262/276	4	
	197/201	201/201	6		241/285	275/285	5		224/228	224/228	4		202/220	2(202/220)	1		272/276	262/276	10	
10	201/201	197/201	10	0.317	241/267	285/285	2		182/204	182/224	12	0.046	176/186	176/202	6	0.615	276/280	276/276	0	
	197/201	201/201	6		241/285	285/285	4	0.143	224/224	204/224	4		202/220	176/220	3		262/276	262/276	5	0.615
11	197/201	201/201	5	0.134	267/301	241/267	4		180/196	180/196	3	0.801	196/206	186/202	3		276/280	262/280	5	
	201/201	197/201	11		271/301	267/271	4	0.919	196/228	180/228	5	0.111	196/206	186/220	3		258/280	262/280	3	0.564
12	197/201	197/197	4	0.135	271/301	267/301	3		196/196	180/196	3	0.285	202/202	2(196/206)	2		268/268	268/280	7	
	197/201	2(197/201)	8		247/301	271/301	5	0.005	196/228	196/196	3		202/202	206/206	5	-	258/268	268/268	5	0.763
13	201/201	201/201	0		247/301	247/271	3		196/228	196/228	5		202/202	202/202	16		258/268	268/268	6	
					271/301	271/271	8		196/228	196/228	5		202/202	202/202	16		258/268	268/268	6	
14	201/201	201/201	0		271/301	247/301	1		196/228	196/228	5		202/202	202/202	16		258/268	268/268	6	
					271/301	271/301	0		196/228	196/228	5		202/202	202/202	16		258/268	268/268	6	
Total				0.676				0.199				0.688				0.143				0.064

Table 3 (Continued)

[illegible]

Table 3 (Continued)

Family	DOFMCr4			DOFMCr16			DOFMCr22			DOFMCr25			DOFMCr27		
	Parents	Offspring	P_{χ^2}	Parents	Offspring	P_{χ^2}	Parents	Offspring	P_{χ^2}	Parents	Offspring	P_{χ^2}	Parents	Offspring	P_{χ^2}
1	238/238 238/244	238/238 238/244	0.796	251/283 251/283	251/251 2(251/283) 283/283	0.004	221/223 225/231 223/225	221/223 221/231 223/225	0.615	232/232 236/240	232/236 232/240	0.317	269/279 279/291	269/279 279/279	0.172
2	236/236 236/238	236/236 236/238	0.782	257/283 251/251	251/283 251/257	0.796	221/221 221/221	221/221 221/221	-	232/236 236/240	232/236 232/240	0.691	279/291 269/279	279/291 269/279	0.334
3	238/238 236/236	236/238 236/238	-	251/257 251/257	251/251 2(251/257) 257/257	0.105	221/221 221/225	221/221 221/225	0.617	236/244 232/236	232/236 232/244	0.030	279/291 269/279	269/279 279/279	0.016
4	236/238 236/236	236/236 236/238	1.000	251/251 251/257	251/251 251/257	0.134	221/221 221/225	221/221 221/225	1.000	236/240 232/236	232/236 232/236	0.475	269/291 269/279	269/269 269/279	0.370
5	236/236 236/244	236/236 236/244	0.439	257/301 283/283	257/283 283/301	0.796	221/225 213/223	213/221 221/223	0.737	234/236 236/236	234/236 236/236	0.197	269/269 263/269	263/269 269/291	0.083
6	232/244 232/244	232/234 2(232/244) 244/244	0.472	301/303 283/313	283/301 301/313	0.682	213/223 223/237	213/223 213/237	0.963	232/234 234/236	232/234 232/236	0.023	279/291 269/279	269/279 279/279	0.212
7	236/236 232/244	232/236 236/244	0.617	251/301 283/301	251/283 251/301	0.321	221/225 213/223	213/221 221/223	0.139	234/236 232/234	232/234 234/234	0.037	279/291 263/291	263/279 279/291	0.068
8	236/236 236/238	236/236 236/238	0.317	301/313 251/313	301/301 251/301	0.615	225/231 227/227	225/231 227/231	0.109	234/236 236/236	234/236 236/236	0.593	291/291 291/291	291/291 291/291	-
9	236/238 236/236	236/238 236/236	0.013	251/251 251/313	251/251 251/313	0.593	227/227 227/227	227/227 227/227	-	234/234 234/244	234/234 234/244	1.000	263/291 291/291	263/291 291/291	0.248
Total			0.913			0.474			0.975			0.173			0.101

Notes: N, Number of offspring genotypes observed. Genotypes shown by allelic size (bp). $P_{\chi^2} > 0.05$, genetic inheritance of the microsatellite loci significantly following the “Principle of Segregation” (Mendel’s first law)

โดย Chand *et al.*, 2005 และ Divu *et al.*, 2008b; 8 ตำแหน่ง โดย Bhassu *et al.*, 2008, Divu *et al.*, 2008a, Bhat *et al.*, 2009 และ See *et al.*, 2009; และ 10 ตำแหน่ง โดย Charoentawee *et al.*, 2006) เมื่อรวมกับเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้อีก 15 ตำแหน่ง ทำให้จำนวนเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในกึ่งกัมกราม ที่สามารถจะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้มีมากและหลากหลายยิ่งขึ้น ประกอบกับเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาได้ในครั้งนี้ ทุกตำแหน่งได้ผ่านการทดสอบยืนยัน โดยใช้เคราะห้กับตัวอย่างพ่อ-แม่-ลูกในครอบครัวเดียวกัน ถึง 9 ครอบครัว ซึ่งไม่ปรากฏว่ามีการดำเนินงานดังกล่าวในรายงานก่อนหน้านี้ (Chand *et al.*, 2005; Charoentawee *et al.*, 2006; Bhassu *et al.*, 2008; Divu *et al.*, 2008 a; 2008 b; Bhat *et al.*, 2009; See *et al.*, 2009) ดังนั้น เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 15 ตำแหน่งที่พัฒนาได้ในครั้งนี้ จึงมีความน่าเชื่อถือสูง มีความเหมาะสม และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการดำเนินงานต่างๆ ได้อย่างมั่นใจ โดยเฉพาะการดำเนินงานที่เกี่ยวข้องในกิจกรรมการเพาะเลี้ยง และปรับปรุงพันธุ์กึ่งกัมกรามของไทย นอกเหนือจากเครื่องหมายที่มีการรายงานไว้แล้ว

สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในกึ่งกัมกราม ได้จำนวน 15 ตำแหน่ง จากโพรบที่เป็นไดนิวคลีโอไทด์ 2 ชนิด คือ (AG)₁₀ และ (TG)₁₀ ผลการศึกษาพบว่าไมโครแซเทลไลต์ที่มีลำดับเบสซ้ำ (AG)_n น่าจะเป็นไมโครแซเทลไลต์ที่พบมากที่สุด ในจีโนมของกึ่งกัมกราม เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ทั้งหมดที่พัฒนาได้ ผ่านการทดสอบยืนยันโดยใช้เคราะห้กับตัวอย่างพ่อ-แม่-ลูกในครอบครัวเดียวกัน 9 ครอบครัว จึงทำให้มีความน่าเชื่อถือสูง มีความเหมาะสม และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการดำเนินงานที่เกี่ยวข้องในกิจกรรมการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์กึ่งกัมกรามของไทยได้

อย่างมั่นใจ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของกลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำจืด สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากกรมประมง ในส่วนกิจกรรมพัฒนาการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์ ภายใต้โครงการ “การพัฒนาเครื่องหมายพันธุ์กรรมไมโครแซเทลไลต์ และการทดสอบยืนยันโดยใช้เคราะห้ระหว่างพ่อ-แม่-ลูก ในกึ่งกัมกราม” รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 50-0600-50018

เอกสารอ้างอิง

- บุญเสริม วิทย์ชำนาญกุล สุภัก เล้าอรุณ อัญชลี ทศนา ขจร กัลยาณ ศิริธัญญลักษณ์ และ Gary Nash. 2547. การนำ microsatellite markers ไปใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กึ่งกุลาคำ. ใน: รายงานการประชุมวิชาการกึ่งทะเลแห่งชาติครั้งที่ 5. โรงแรมมิราเคิลแกรนด์คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ. 29-30 มีนาคม 2547. หน้า 132.
- ศรีรัตน์ สอดสุข. 2547. การวิเคราะห์ความเป็นพ่อแม่ลูกของกึ่งกุลาคำโดยใช้เครื่องหมายพันธุ์กรรมไมโครแซเทลไลต์. เอกสารวิชาการฉบับที่ 2/ 2547 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ศรีรัตน์ สอดสุข และ พนม กระจำพจน์ สอดสุข. 2548. การพัฒนาเครื่องหมายพันธุ์กรรมไมโครแซเทลไลต์ในปูทะเล. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/ 2548 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สมพงษ์ สุวรรณทศ. 2546. กลวิธีการเพาะและอนุบาลลูกกึ่งกัมกรามในประเทศไทย. เอกสารแนะนำกรมประมง.
- วัณณะ ลีลาภัทร. 2553. การผลิตกึ่งกัมกรามปลอดโรคไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* Noda

- และ Extra small virus. Available Source: <http://www.arda.or.th/pdf/BIOSECURITY.pdf> (28 December 2010).
- Allendorf, F.W. and Ryman, N. 1987. Genetic management of hatchery stocks. In: N. Ryman and F. Utter (eds.). *Population Genetics and Fisheries Management*. University of Washington Press, Seattle. pp. 141-159.
- Auburn. 2010. Microsatellites. The Fish Molecular Genetics and Biotechnology Laboratory. Available Source: <http://www.auburn.edu/academic/agriculture/fisheries/genomics/FISH7660%202006/14.%20Marking%20the%20genome-microsatellites.pdf> (16 June 2010).
- Bhassu, S., See, L.M., Hassan, R., Siraj, S.S. and Tan, S.G. 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Malaysian giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Mol Ecol Res* 8: 983-985.
- Bhat, S., Patel, A., Das, P., Meher, P.K., Pillai, B.R. and Jayasankar, P. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Conserv Genet* 10: 1473-1475.
- Botstein, D., White R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.
- Chand, V., de Bruyn, M. and Mather, P.B. 2005. Microsatellite loci in the eastern form of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Mol Ecol Notes* 5: 308-310.
- Charoentawee, K., Poompuang, S. and Na-Nakorn, U. 2006. Isolation and characterization of microsatellites in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Mol Ecol Notes* 6: 823-825.
- Charoentawee, K., Poompuang, S., Na-Nakorn, U. and Kamonrat, W. 2007. Genetic diversity of hatchery stocks of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Thailand. *Aquaculture* 271: 121-129.
- Divu, D., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 2008a. Microsatellite DNA markers in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: a tool for genetic analysis. *Mol Ecol Res* 8: 1040-1042.
- Divu, D., Khushiramani, R., Malathi, S., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 2008b. Isolation, characterization and evaluation of microsatellite DNA markers in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, from South India. *Aquaculture* 284: 281-284.
- Goudet, J. 1995. Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. *J Hered* 86: 485-486.
- ITIS. 2010. *Macrobrachium rosenbergii* (DE MAN, 1879). ITIS Report. Available Source: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=96343& (25 February 2010).
- Liu, Z.J. and Cordes, J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- SAS Institute Inc. 2000. *SAS OnlineDoc, Version 8*. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
- See, L.M., Tan, S.G. and Hassan, R. 2009. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for the genetic analysis of the Malaysian giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biochem Genet* 47: 722-726.
- Tassanakajon, A., Tiptawonnukul, A., Supangul, P. and Rimphanitchayakit, V. 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 7: 55-61.
- Wuthisuthimethavee, S., Lumubol, P., Vanavichit, A. and Tragoonrung, S. 2003. Development of microsatellite markers in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Aquaculture* 224: 39-50.