ว.วิทย. มข. 44(2) 331-344 (2559) KKU Sci. J. 44(2) 331-344 (2016)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามในบ่อเลี้ยงของเกษตรกร จังหวัดกาฬสินธุ์ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี-พีซีอาร์

Genetic Diversity of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*de Man) on Farm in Kalasin Province Using RAPD-PCR Technique

กีรวิชญ์ เพชรจุล[1*] และ มณีรัตน์ ศิริสวัสดิ์[1]

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ตำบลกาฬสินธุ์ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000

[*]Corresponding author, E-mail: pkeravit@yahoo.com

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามในบ่อเลี้ยงของเกษตรกร จังหวัดกาฬสินธุ์ ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ (RAPD-PCR) พบกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) มีทั้งหมด 3 ลักษณะ ได้แก่ กุ้งก้ามกรามก้ามฟ้า (MrB) กุ้งก้ามกรามก้ามทอง (MrG) และกุ้งก้ามกรามจิ๊กโก๋ (MrJ) สกัดดีเอ็นเอจากกล้ามเนื้อกุ้งแต่ละตัวด้วยวิธี phenol: chloroform proteinase K และคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาด 10-12 นิวคลีโอไทด์จำนวน 8 ชนิด พบไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ OPA03 และ OPA07A สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และผลการทำ RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ทั้งสองชนิดของกุ้งก้ามกรามทั้ง 3 ลักษณะพบแถบดีเอ็นเอมีจำนวน 41 แถบ ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 250-2000 คู่เบส โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลาย (polymorphic band) จำนวน 29 แถบ คิดเป็น 70.73 เปอร์เซ็นต์ และพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความหลากหลาย (monomorphic band) จำนวน 12 แถบ คิดเป็น 29.27 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำรูปแบบ RAPD-PCR มาสร้าง UPGMA dendrogram โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc version 2.11x พบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกุ้งฝอย (*M. lanchesteri* de Man) ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบที่สามารถแยกออกจาก *M. rosenbergii* อย่างชัดเจน กลุ่มที่ 2 เป็นกุ้งก้ามกรามทั้งหมด (*M. rosenbergii*; MrB, MrG และ MrJ) สามารถแยกได้สองกลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย MrJ เพียงลักษณะเดียวเท่านั้นกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย MrB และ MrG ซึ่งทั้งสองกลุ่มใหญ่และสองกลุ่มย่อยของกลุ่มที่ 2 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 52.00 และ 67.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดง

ให้เห็นว่ากุ้งก้ามกรามในบ่อเลี้ยงของเกษตรกรจังหวัดกาฬสินธุ์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งจากข้อมูลนี้จะเป็นแนวทางนำไปสู่การคัดเลือก การปรับปรุงสายพันธุ์ การอนุรักษ์และการจัดการพ่อแม่พันธุ์ของกุ้งก้ามกรามที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้าต่อไป

ABSTRACT

The objective of this research was to investigate genetic diversity of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) on farm in Kalasin province using RAPD-PCR technique. *M. rosenbergii* was found 3 characteristics such as: giant freshwater prawn blue claws (MrB), giant freshwater prawn gold claws (MrG) and giant freshwater prawn dwarfism (MrJ). Genomic DNA was extracted from the muscle of each individual of specimens with phenol: chloroform proteinase K method and screened appropriate oligonucleotide primers for amplification using 8 oligonucleotide primers, 10-12 base nucleotide length. The results showed that primer OPA03 and OPA07A were able to amplify the DNA in RAPD-PCR reaction. For RAPD-PCR of these 2 primers of all *M. rosenbergii* showed 41 bands within sizes of 250-2000 bp. DNA fingerprints showed 29 polymorphic bands (70.73%) and 12 monomorphic bands (29.27%). The UPGMA dendrogram of RAPD-PCR pattern, constructed using NTSYSpc version 2.11x gave 2 groups of genetic relationships. Group 1 composed of (*M. lanchesteri* de Man) which separated clearly from group 2. Group 2 consisted of all *M. rosenbergii* (MrB, MrG and MrJ) which can be divided into 2 subgroups: subgroup 1 was only giant freshwater prawn dwarfism (MrJ) and subgroup 2 consisted of giant freshwater prawn blue claws (MrB) and giant freshwater prawn gold claws (MrG). The similarity coefficient between 2 groups and subgroups of group 2 exhibited approximately 52.00 and 67.50 percentages, respectively. This study showed different genetic diversity of *M. rosenbergii* farmed in Kalasin province. This information will benefit screening, breeding, conservation and broodstock management for desirable trait of commercial giant freshwater prawn in near future.

คำสำคัญ: กุ้งก้ามกราม ความหลากหลายทางพันธุกรรม ดีเอ็นเอ อาร์เอพีดี-พีซีอาร์

Keywords: *Macrobrachium rosenbergii* de Man, Giant freshwater prawn, Genetic diversity, DNA, Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)

บทนำ

กุ้งก้ามกรามจัดเป็นกุ้งน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีชื่อสามัญว่า Giant freshwater prawn และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Macrobrachium rosenbergii* de Man) จัดอยู่ชั้น (class) Malacostraca อันดับ (order) Decapada วงศ์ (family) Palaemonidae (Nandlal and Pickering, 2005) ลักษณะทั่วไปส่วนหัวและอกจะปกคลุมด้วยเปลือกชิ้นเดียวกัน ลำตัวมีลักษณะเป็นปล้อง

จำนวน 6 ปล้อง กรีมีรูปโค้งขึ้นมีลักษณะหยักเป็นฟันเลื่อย ด้านบนมีจำนวน 13-16 ซี่ ด้านล่างมีจำนวน 10-14 ซี่ โคนกรีกว้างและหนา ส่วนบริเวณปรายกรียาวแหลม แผ่นฐานหนวดคู่ที่ 2 เปลือกคลุมหัวมีหนามเล็กๆ ทั่วไป ใต้ตามีหนามเล็กๆ 2 อัน มีหนวดสองคู่ หนวดคู่ที่ 1 ส่วนของโคนหนวดหนา แบ่งออกเป็น 3 ข้อปล้อง โดยปล้องที่ 3 แยกออกเป็นสองเส้น หนวดคู่ ที่ 2 ซึ่งยาวกว่าหนวดคู่ที่ 1 ส่วนโคนหนวดแบ่งออกเป็น 5 ข้อปล้อง แขนงอันนอกมีลักษณะเป็นแผ่นบางคล้ายรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า เรียกว่าแผ่นฐานหนวด (ประจวบ, 2525) ขาเดินมี 5 คู่ ขาว่ายน้ำ มี 5 คู่ ส่วนแพนหางมีลักษณะแหลมตรงปลายด้านข้างแยกเป็นแพนสองแพน ช่วยในการว่ายน้ำควบคุมทิศทางในการเคลื่อนไหว กุ้งก้ามกรามมีลักษณะพิเศษตามชื่อ คือ เพศผู้จะมีขาเดินคู่ที่ 2 ขนาดใหญ่และยาวกว่าคู่อื่นๆ มาก ซึ่งเรียกว่า “ก้าม”ก้ามยาวมีสีฟ้าหรือน้ำเงิน ตลอดทั้งก้ามมีปุ่มตะปุ่มตะป่ำ มีเปลือกสีเขียวอมฟ้าหรือน้ำเงิน กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดแต่ว่างไข่ในน้ำเค็มหรือน้ำกร่อยเมื่อฟักเป็นตัวอ่อนหรือลูกกุ้ง จะต้องอาศัยอยู่ในน้ำกร่อยระยะหนึ่งตามธรรมชาติ มีชื่อเรียกที่ต่างออกไปมากมาย เช่น กุ้งแห กุ้งใหญ่ กุ้งแม่น้ำ กุ้งหลวง และกุ้งก้ามเกลี้ยง ขณะที่กุ้งตัวเมียที่มีขนาดลำตัวเล็กกว่า เรียกกุ้งนาง กุ้งชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียใต้ ได้แก่ อินเดีย บังคลาเทศ ไปจนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ไทย พม่า เวียดนาม เขมร มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ตลอดจนทางเหนือของหมู่เกาะโอเชียเนีย และทางตะวันตกของหมู่เกาะแปซิฟิก แต่ในปัจจุบันได้ถูกนำไปเลี้ยงอย่างแพร่หลายในภูมิภาคอื่นที่มีภูมิอากาศแบบเขตร้อน เช่น ทิศเหนือและใต้ของอเมริกา อเมริกันซามัว ฮาวายหมู่เกาะตาฮิติ นิวแคลิโดเนีย และแม้กระทั่งนิวซีแลนด์ (Nandlal and Pickering, 2005) กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งที่นิยมใช้ปรุงเป็นอาหารหลายอย่างเช่น ต้มยำ เผา หรือทอด มีรสชาติดีและเป็นที่นิยมบริโภคของบุคคลทั่วไปทั้งในและต่างประเทศ เนื่องจากเนื้อแน่นและมีปริมาณมาก ซึ่งในปัจจุบันยังนิยมเลี้ยงเป็นสัตว์น้ำสวยงามอีกด้วย และความต้องการบริโภคกุ้งก้ามกรามมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามจำนวนของประชากรที่เพิ่ม จากปริมาณการส่งออกกุ้งของประเทศไทยในเดือนพฤษภาคม 2558 มากถึง 11,585 ตัน มูลค่า 3,877 ล้านบาท (กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ, 2558) และจากข้อมูลทางสถิติปี 2551-2555 ของกรมประมงพบว่าปริมาณกุ้งกรามก้ามที่จับในแหล่งน้ำธรรมชาติมีแนวโน้มลดลงอย่างมาก (กลุ่มงานวิจัยและวิเคราะห์สถิติประมง, 2557) เนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น การสร้างเขื่อนกั้นน้ำทำให้กุ้งไม่สามารถอพยพไปวางไข่ในบริเวณปากแม่น้ำได้ การทำการประมงมากเกินกำลังผลิตตามธรรมชาติ ปัญหามลภาวะเป็นพิษของสิ่งแวดล้อม เช่น การเน่าเสียของแม่น้ำลำคลอง และการทำการประมงอย่างไม่ถูกวิธี ปัจจุบันหน่วยงานของกรมประมงและฟาร์มเอกชนสามารถเพาะพันธุ์กุ้งชนิดนี้ได้จึงทำให้มีผู้เลี้ยงกุ้งชนิดนี้กันอย่างแพร่หลาย และยังสามารถเพาะพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี จึงเป็นอาชีพที่ทำรายได้ดีให้แก่เกษตรกร แต่การเพาะพันธุ์กุ้งก้ามกรามให้ประสบผลสำเร็จนั้นต้องอาศัยทักษะ ความรู้ความเข้าใจและประสบการณ์ พร้อมทั้งการดูแลเอาใจใส่ให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพดี เทคนิคการเพาะพันธุ์ของฟาร์มแต่ละแห่งอาจแตกต่างกัน ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามจำเป็นต้องทราบลักษณะของพันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพดีจากฟาร์มเพาะลูกพันธุ์เพื่อให้ได้ลูกกุ้งที่มีคุณภาพดีและเลี้ยงให้ผลผลิตสูงได้ผลตอบแทนคุ้มค่า จังหวัดกาฬสินธุ์เป็นอีกจังหวัดหนึ่งในภาคอีสานที่เกษตรกรมีการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเพื่อการค้าจำนวนมาก โดยส่วนมากจะนิยมเลี้ยงกันในแถวอำเภอยางตลาดและอำเภอใกล้เคียง มีจำนวนฟาร์มเลี้ยงกุ้งก้ามกรามประมาณ 1,295 ราย แบ่งเป็นพื้นที่การเลี้ยง 6,220 ไร่ (สำนักงานประมงจังหวัดกาฬสินธุ์, 2556) เนื่องจากมีแหล่งน้ำที่อุดมสมบูรณ์ได้รับน้ำจาก

เขื่อนลำปาว สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม อีกทั้งแรงงานในจังหวัดมีจำนวนมากสามารถหาได้ง่ายและราคาค่าจ้างแรงงานค่อนข้างถูก สามารถผลิตกุ้งก้ามกรามป้อนให้กับผู้บริโภคได้มากกว่า 10,000 ตัน/ปี (สำนักงานประมงจังหวัดกาฬสินธุ์, 2556)

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามประสบปัญหาผลผลิตต่ำ แม้ว่าจะมีการขยายตัวของการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง โดยคาดว่าน่าจะเกิดจากความเสื่อมโทรมของพันธุกรรม และการผสมเลือดชิดทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง ข้อมูลด้านพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามเป็นดัชนีบ่งชี้ ความหลากหลายของลักษณะที่เกี่ยวของกับการเจริญพันธุ์ และการรอดตาย จึงมีความจำเป็นในการคัดเลือกพันธุ์ ลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เช่นการเจริญเติบโต และความต้านทานโรค (กัณฑรีย์ เจริญทวี, 2550) เพื่อ นำมาใช้ในการอนุรักษ์ปรับปรุงพันธุ์และการจัดการพ่อแม่พันธุ์เพื่อให้ได้ลูกกุ้งที่มีคุณภาพและป้องกันการผสมเลือดชิด (อุทัยรัตน์, 2543) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน การศึกษาทางด้านดีเอ็นเอของกุ้งก้ามกรามนับว่ามีความสำคัญมาก โดยเฉพาะกุ้งก้ามกรามที่มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกัน อัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ซึ่งยากต่อการจัดจำแนกด้วยลักษณะภายนอก เทคนิค RAPD-PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ไพรเมอร์ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสสายสั้นๆ เพียง 8-10 คู่เบสโดยให้จับกับสายดีเอ็นเอแบบสุ่ม เป็นเทคนิคที่สะดวกขั้นตอนในการทำการทดลองรวดเร็วและง่าย เสียค่าใช้จ่ายน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสมาก่อน สามารถจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันได้ รวมทั้งใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสูงของสิ่งมีชีวิต (อุทัยรัตน์, 2543) และให้ผลดีในการตรวจสอบความใกล้ชิดของสายพันธุ์กุ้งก้ามกราม และเทคนิคดังกล่าวยังมีการนำมาศึกษาความแตกต่างของกุ้งสกุล *Macrobrachium* หลายชนิด เช่น *M. amazonicum, M. jelskii* และ *M. brasiliense* (Guerra et al., 2010) และศึกษาในสกุล *Penaeus* อาทิเช่น *P. monodon, P. vannamei, P. stylirostris* และ *P. semisulcatus* (Chatterjee et al., 2013; Sakaew et al., 2013; Aubert and Lightner, 2000; Niamaimadi et al., 2010) ดังนั้นเทคนิค RAPD-PCR จึงเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามในบ่อเลี้ยงของเกษตรกรในเขตพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือก การปรับปรุงสายพันธุ์การอนุรักษ์ และการจัดการพ่อแม่พันธุ์ของกุ้งก้ามกรามที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงให้ได้สายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อการค้าต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของกุ้งก้ามกราม

การเก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจากฟาร์มแบบสุ่มในเขตพื้นที่ อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์ เก็บตัวอย่างใส่ภาชนะหรือกล่องโฟม แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาทำความสะอาด เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของกุ้งก้ามกรามดัดแปลงตามวิธีของประจวบ (ประจวบ, 2525) โดยทำการแยกเพศและศึกษาจากลักษณะเด่นทางสัณฐานวิทยาของกุ้งก้ามกราม ได้แก่ ลักษณะของกรี เปลือกหุ้มตัว หนวดคู่ที่ 2 ขาเดิน ลำตัว หาง และแพนหาง (uropod) เก็บเนื้อเยื่อกุ้งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

นำเนื้อเยื่อกุ้งก้ามกรามมาสกัดดีเอ็นเอโดยทำการตัดเนื้อเยื่อจากหลอดที่เก็บเนื้อเยื่อตัวอย่างไว้แล้วประมาณ 1 cm^3 เติม lysis buffer 500 µl แล้วเติม proteinase K (10 mg/ml) 10 µl นำไป incubated ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เติม RNase A (100 µg/µl) 5 µl incubated ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตกตะกอนโปรตีนโดยเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 500 µl พลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 5-10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวใสที่อยู่ชั้นบนใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 500 µl กลับหลอดไปมาเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาของเหลวใสที่อยู่ชั้นบนไปใส่หลอดใหม่ จากนั้นนำมาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 1 ใน 10 เท่า และเติม absolute ethanol (ที่เย็น) ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรรวม กลับหลอดไปมาให้ผสมกันดี นำตั้งทิ้งไว้ในที่เย็นจัดประมาณ 45-60 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนทิ้งหมดแล้วล้างซ้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 µl อีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวทิ้งแล้วปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยตั้งหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม TE buffer ปริมาตร 50-100 µl หากตะกอนดีเอ็นเอไม่ละลายให้นำ DNA solution ไป incubated ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอละลายได้ดียิ่งขึ้น แล้วทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis และวัดความเข้มข้นของ ดีเอ็นเอด้วย UV spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

3. การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR

นำ genomic DNA ของกุ้งก้ามกรามที่ได้มาคัดเลือกไพรเมอร์โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 8 ชนิด ได้แก่ UBC122, OPA01, OPA03, OPA04, OPA05, OPA07, OPA07A และ OPA10 (ตารางที่ 1) ปฏิกิริยาในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย distilled water, 1X buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.8 µM primer, 0.05 unit *Taq* DNA polymerase และ 50 ng/µl ของ genomic DNA โดยเครื่อง PCR (polymerase chain reaction, Biometra® รุ่น TGRADIENT) โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิ initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตามด้วย 40 รอบของ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR มาทำการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มได้ไปทำการทดลองต่อไป

ตารางที่ 1 ชนิดและลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกุ้งก้ามกราม

Primers name	Sequence (5'⟶3')
UBC122	GTAGACGAGAGC
OPA01	CAGGCCCTTC
OPA03	AGTCAGCCAC
OPA04	AATCGGGCTG
OPA05	AGGGGTCTTG
OPA07	GAAACGGGTG
OPA07A	GGTGACGCAG
OPA10	GTGATCGCAG

4. การวิเคราะห์รูปแบบโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.11x

เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยอ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแล้วบันทึกข้อมูล โดยกำหนดเลขสัญลักษณ์ 1 เท่ากับการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ 0 เท่ากับการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีตำแหน่งดีเอ็นเอเดียวกันนั้น วิเคราะห์ข้อมูลที่เกี่ยวกับการเกิด หรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยโดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.11x เพื่อสร้างเป็น dendrogram ด้วยการทำ cluster analysis

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลการเก็บตัวอย่างและศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของกุ้งก้ามกราม

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของกุ้งก้ามกราม ดัดแปลงตามวิธีของประจวบ (ประจวบ, 2525) สามารถจำแนกลักษณะเด่นตามความแตกต่างด้านขนาดและสัณฐานวิทยา ขนาดของกุ้งก้ามกรามมีข้อแตกต่างตรงที่ กุ้งเพศผู้มีขนาดใหญ่กว่าเพศเมียมาก สามารถจัดจำแนกลักษณะของกุ้งก้ามกรามได้ทั้งหมด 3 ลักษณะ ดังนี้

1. กุ้งก้ามกรามก้ามฟ้า (MrB) ลักษณะเด่น กรียาวส่วนของหัวและอกอยู่รวมกันมีขนาดใหญ่มีเปลือกสีเขียวอมฟ้าหรือม่วง ก้ามยาวใหญ่มีม่วงเข้ม ตลอดทั้งก้ามมีหนามแหลมเรียงกระจัดกระจายลักษณะเจริญเติบโตช้า อัตราการเจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอ กินอาหารเก่ง (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 กุ้งก้ามกรามก้ามฟ้า (MrB)

2. กุ้งก้ามกรามก้ามทอง (MrG) ลักษณะเด่นส่วนของหัวและอกอยู่รวมกันมีขนาดเล็กมีเปลือกสีน้ำเงินอมเหลือง ก้ามเล็กปลายก้ามมีสีเหลืองทอง ตลอดทั้งก้ามมีหนามแหลมเรียงกระจัดกระจายลักษณะเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว มีอัตราการเจริญเติบโตสม่ำเสมอตลอดทั้งบ่อ (รูปที่ 2)

รูปที่ 2 กุ้งก้ามกรามก้ามทอง (MrG)

3. กุ้งก้ามกรามจิ๊กโก๋ (MrJ) มีลักษณะแคระแกร็น ลักษณะเด่น ลำตัวขนาดเล็ก มีเปลือกสีเขียวอมฟ้าหรือม่วงก้ามเล็กมีสีม่วงเข้ม ตลอดทั้งก้ามมีหนามแหลมเรียงกระจัดกระจาย ลักษณะเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตช้า ขนาดตัวเล็ก อัตราการเจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 3)

รูปที่ 3 กุ้งก้ามกรามจิ๊กโก๋ (MrJ)

2. ผลการสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อกุ้งก้ามกรามเมื่อนำมาตรวจคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดีมีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอและการแตกหักน้อย เนื่องจากใช้ตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่นำมาสกัดมีความสดทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอจำนวนมาก และเมื่อทำวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยวิธี UV spectrophotometer อัตราส่วนระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ OD_{260}/OD_{280} nm ดีเอ็นเอที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 1.5-1.8 แสดงถึงปริมาณโปรตีนเพียงเล็กน้อย

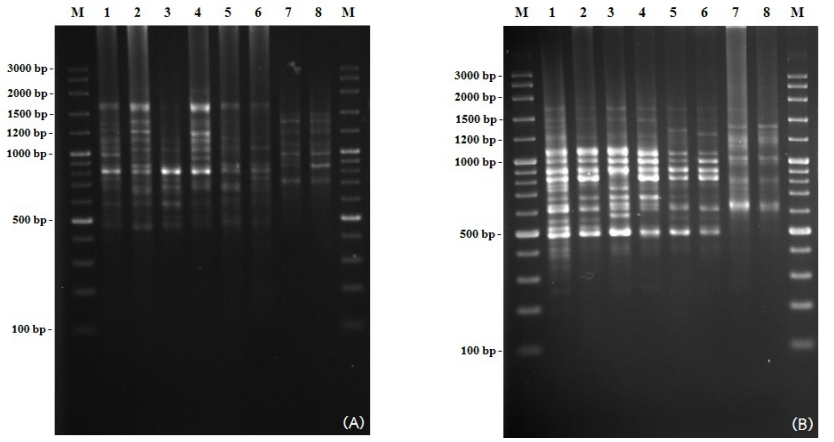
3. ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR

จากการคัดเลือกหา RAPD ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากไพรเมอร์ขนาด 10-12 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 8 ไพรเมอร์ พบว่ามี 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA03 และ OPA07A ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แต่มีรายงานการศึกษาพบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกุ้งก้ามกรามได้คือ OPA01, OPA03 OPA04 OPA09 และ OPA10 (See et al., 2008; Islam et al., 2014) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีไพรเมอร์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และเมื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมพบว่ามีแถบดีเอ็นทั้งหมด 41 แถบซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 250-2000 bp (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับการศึกษาของบัณฑิตและคณะ (2546) ที่ศึกษาด้วยเทคนิค RAPD-PCR ของกุ้งก้ามกรามที่ศึกษาด้วยไพรเมอร์ MR พบทั้งหมด 32 แถบ มีขนาดอยู่ในช่วง 362-1122 bp มี polymorphic band 28 แถบ และการศึกษาของ See et al. (2008) มีขนาดอยู่ในช่วง 250-1500 bp และแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากทั้ง 2 ไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic band ทั้งหมด 29 แถบ คิดเป็น 70.73 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากกุ้งกุลาดำที่ศึกษาทั้งหมด 9 ไพรเมอร์ พบทั้งหมด 26 แถบ และพบที่เป็น polymorphic band 16 แถบ (61.5%) (Kumar et al., 2011) ซึ่งในงานวิจัยชิ้นนี้ MrB, MrG และ MrJ มีค่าแถบทั้งหมด 36, 30 และ 24 แถบ ตามลำดับ และมี polymorphic band 12, 9 และ 4 แถบ คิดเป็น 33.33 30.00 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ไพรเมอร์ OPA03 พบ RAPD pattern ของกุ้งก้ามกราม (MrB, MrG และ MrJ) ที่เกิดขึ้น 18 แถบ มีขนาดอยู่ในช่วง 460-2000 bp ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphic band จำนวน 14 แถบ คิดเป็น 77.78 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ได้แก่แถบดีเอ็นเอขนาด 500 620 680 760 890 900 950 1000 1100 1150 1190 1200 1350 และ 2000 bp ซึ่งมีจำนวนน้อยกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบ 21 แถบ (Islam et al., 2014) และมีแถบดีเอ็นเอที่แสดง monomorphic band จำนวน 4 แถบ คิดเป็น 22.22 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 460 580 760 และ 1700 bp โดยพบ RAPD pattern ที่มีขนาด 500 และ 680 bp ใน MrG และ MrJ เท่านั้น และแถบที่มีขนาด 760 และ 1200 bp พบใน MrB และ MrG แถบขนาด 890 bp พบเฉพาะ MrJ และแถบขนาด 1350 bp พบเฉพาะ MrB เท่านั้น (รูปที่ 4 A)

ไพรเมอร์ OPA07A พบ RAPD pattern ของกุ้งก้ามกราม (MrB, MrG และ MrJ) ที่เกิดขึ้น 23 แถบ มีขนาดอยู่ในช่วง 250-1750 bp ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphic band จำนวน 15 แถบ คิดเป็น 65.22 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 250 350 390 450 520 550 590 610 720 780 800 1200 1300 1350 และ 1500 และมีแถบดีเอ็นเอที่แสดง monomorphic band จำนวน 8 แถบ คิดเป็น 34.78 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 410 500 600 680 900 1000 1100 และ 1750 bp โดยพบ RAPD pattern ที่มีขนาด 520 bp ในเฉพาะ MrB เท่านั้นและแถบขนาด 550 และ 780 bp พบใน MrB และ MrJ และพบแถบขนาด 610 และ 720 bp เฉพาะ MrG เท่านั้น แถบ 1200 และ 1500 bp พบใน MrB และ MrG และแถบขนาด 1500 bp ยังพบใน MrJ เพศผู้อีกด้วย (รูปที่ 4 B)

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายรูปแบบ (polymorphism) ของดีเอ็นเอของกุ้งก้ามกรามในแต่ละลักษณะ MrB, MrG และ MrJ พบว่าแถบดีเอ็นที่เกิดขึ้นทั้งหมด 12 9 และ 4 แถบ ซึ่งเป็น polymorphic band 33.33 30.00 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 4 แสดงขนาดและรูปแบบของแถบดีเอ็นของกุ้งก้ามกรามและกุ้งฝอย (Ml; out group) ที่ได้จากเทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพร์เมอร์ OPA03 (A) และ OPA07A (B)

Lane M = 100 bp DNA Ladder, Lane 1 = MrB (เพศเมีย), Lane 2 = MrB (เพศผู้), Lane 3 = MrG (เพศเมีย), Lane 4 = MrG (เพศผู้), Lane 5 = MrJ (เพศเมีย), Lane 6 = MrJ (เพศผู้), Lane 7 = Ml (เพศเมีย), Lane 8= Ml (เพศผู้)

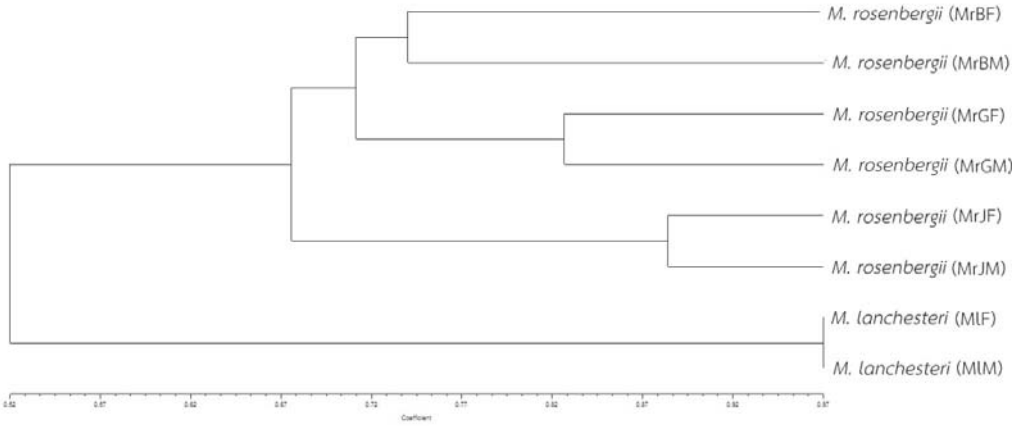
ตารางที่ 2 จำนวนแถบดีเอ็นเอของกุ้งก้ามกรามที่สังเคราะห์ได้

Primer	Size-range (bp)	No. of RAPD band	Polymorphic bands (%)	Monomorphic band (%)
OPA03	460-2000	18	14(77.78%)	4(22.22%)
OPA07A	250-1750	23	15(65.22%)	8(34.78%)
Total	250-2000	41	29(70.73%)	12(29.27%)

4. การวิเคราะห์รูปแบบโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.11x

นำแถบดีเอ็นเอของกุ้งก้ามกรามทั้ง 3 ลักษณะ MrB, MrG และ MrJ และตัวอย่างเปรียบเทียบ (out group) ได้แก่ กุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri* de Man; Ml) ที่พบในแต่ละไพรเมอร์มาวิเคราะห์ความแปรปรวนและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc version 2.11x จากนั้นนำค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบเขียนแผนภูมิสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ UPGMA dendrogram พบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 กุ้งฝอย (*M. lanchesteri*; Ml) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ใช้เปรียบเทียบ (out group) สามารถแยกออกจากกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ได้อย่างชัดเจน กลุ่มที่ 2 กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*; MrB, MrG และMrJ)สามารถแยกออกได้สองกลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย MrJ เพียงลักษณะเดียวเท่านั้น กลุ่มย่อยที่ 2 เป็น MrB และ MrG ซึ่งทั้งสองกลุ่มใหญ่และสองกลุ่มย่อยของกลุ่มที่ 2 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 52.00 และ 67.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (รูปที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามในประเทศไทยและพม่า สามารถแบ่งประชากรจากบ่อเลี้ยงออกได้ 2 กลุ่มใหญ่ โดยมีค่าดัชนีความคล้ายคลึงระหว่างกลุ่มเท่ากับ 0.65 คือ จากบ่อเลี้ยงจังหวัดสุราษฎร์ธานี และประชากรจากบ่อเลี้ยงจังหวัดสุพรรณบุรี ระนอง และกาฬสินธุ์ (จอมสุดา, 2546) และจากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามในประเทศมาเลเซียโดยเทคนิค RAPD พบว่ากุ้งก้ามกรามในแต่ละพื้นที่แตกต่างกันสามารถแยกได้ 3 กลุ่มใหญ่ เมื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมกุ้งก้ามกรามโดยการวิเคราะห์ข้อมูลจาก polymorphic banding pattern เบื้องต้นชี้ให้เห็นว่ากุ้งก้ามกรามทางทิศตะวันตกและทิศตะวันออกของประเทศมาเลเซียมีความแตกต่างกันบางส่วนระหว่างพื้นที่ (Bhassu et al., 2005: See et al., 2008) และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Islam et al. (2014) ที่ทำการศึกษาความแปรผันของกุ้งก้ามกรามโดยนำอัตราส่วนของพ่อแม่พันธุ์ในบ่อเลี้ยง 1 เพศผู้ : 1 เพศเมีย 1 เพศผู้ : 2 เพศเมีย และ 2 เพศผู้ : 1 เพศเมีย ผลจาก dendrogram ที่ได้ พบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ 2 กลุ่มคือ 1 เพศผู้ : 1 เพศเมีย และตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างกลุ่มที่เหลือจัดอยู่ในกลุ่มสอง จากผลแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วน 1 เพศผู้ : 1 เพศเมีย เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป จากผลดังกล่าวจะเห็นว่ากุ้งก้ามกรามในแต่พื้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันการเลือกพ่อแม่พันธุ์ จึงควรมีการศึกษาลักษณะเด่นทางพันธุกรรมก่อนเพื่อป้องกันการผสมเลือดชิด นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามด้วยเทคนิคอณูพันธุศาสตร์อื่นๆ อาทิเช่น การศึกษาด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งใน

ประเทศไทยพบว่ากลุ่มกุ้งก้ามกรามจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีมีพันธุกรรมแตกต่างจากกลุ่มกุ้งก้ามกรามจากจังหวัดขอนแก่น และกลุ่มที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกันมากที่สุดคือกลุ่มกุ้งก้ามกรามจากจังหวัดอ่างทองกับจังหวัดสมุทรสงคราม (Charoenwattanasak et al., 2015) และยังมีการศึกษาในกลุ่มประชากรกุ้งก้ามกรามในประเทศปากีสถาน พบว่ากุ้งก้ามกรามมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมปานกลาง (Khan et al. 2014) และมีการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกุ้งก้ามกรามในต่างประเทศที่พบว่าสามารถแยกลักษณะของกุ้งก้ามกรามได้ตามลักษณะทางภูมิประเทศและยังมีการศึกษาเพิ่มเติมในกุ้งอีกหลายๆ ชนิด เช่น *M. malcolmsonii, M. lamarrei, M. lamarrei lamarroids, Caridina gracilipes* และ *Penaeus monodon* (Bruyn et al., 2004; Wilon and Sing, 2013; Udayasuriyan et al., 2015)



รูปที่ 5 UPGMA dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของของกุ้งก้ามกราม โดยเทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ OPA03 และ OPA07A ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.11x

MrBF = กุ้งก้ามกรามก้ามฟ้า (เพศเมีย), MrBM = กุ้งก้ามกรามก้ามฟ้า (เพศผู้), MrGF = กุ้งก้ามกรามก้ามทอง (เพศเมีย), MrGM = กุ้งก้ามกรามก้ามทอง (เพศผู้), MrJF = กุ้งก้ามกรามจิ๊กโก๋ (เพศเมีย), MrJM = กุ้งก้ามกรามจิ๊กโก๋ (เพศผู้), MlF = กุ้งฝอย (เพศเมีย), MlM = กุ้งฝอย (เพศผู้)

ตารางที่ 3 จำนวนแถบและเปอร์เซ็นต์Polymorphic band และ Monomorphic band ทั้งหมดของตัวอย่างกุ้งจากการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR

Primer	*M. rosenbergii* (MrB)			*M. rosenbergii* (MrG)			*M. rosenbergii* (MrJ)			*M. lanchesteri* (Ml)		
	No. of RAPD band	No. of Poly morphic bands	No. of Mono morphic band	No. of RAPD band	No. of Poly morphic bands	No. of Mono morphic band	No. of RAPD band	No. of Poly morphic bands	No. of Mono morphic band	No. of RAPD band	No. of Poly morphic bands	No. of Mono morphic band
OPA03	15	6	9	15	7	8	10	1	9	8	1	7
OPA07	21	6	15	15	2	13	14	3	11	8	1	7
Total	36	12 (33.33%)	24 (66.67%)	30	3 (30.00%)	21 (70.00%)	24	4 (16.67%)	20 (83.33%)	16	2 (12.50%)	14 (87.50%)

สรุป

จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามในบ่อเลี้ยงของเกษตรกรในจังหวัดกาฬสินธุ์โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นด้วยเทคนิค RAPD-PCR จำนวน 8 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ 2 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้คือ OPA03 และ OPA 07A พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 41 แถบ อยู่ในช่วง 250-2000 bp แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็น polymorphic band จำนวน 29 แถบ คิดเป็น 70.73 เปอร์เซ็นต์ จากความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสามารถใช้แยกกุ้งก้ามกรามแต่ละลักษณะออกจากกันได้ และเมื่อนำมาสร้าง UPGMA dendrogram สามารถแบ่งความแตกต่างได้อย่างชัดเจนมากขึ้น แสดงให้เห็นว่ากุ้งก้ามกรามในบ่อเลี้ยงของเกษตรกรจังหวัดกาฬสินธุ์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีความแตกต่างทางด้านพันธุกรรม ซึ่งจากข้อมูลที่ได้นี้จะเป็นแนวทางนำไปสู่การคัดเลือก การปรับปรุงสายพันธุ์การอนุรักษ์และการจัดการพ่อแม่พันธุ์ของกุ้งก้ามกรามที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์เพื่อการค้าในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2558 และขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ สถานที่ในการทำวิจัย และอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน และขอขอบคุณอาจารย์ และนักศึกษาทุกๆ คนที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กัณฑรีย์ เจริญทวี. (2550). ความหลากหลายทางไมโคร แซทเทลไลท์พันธุกรรมในประชากรกุ้งก้ามกรามจากโรงเพาะฟักและธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: 66 หน้า

กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ. (2558).การค้าสินค้าประมงของไทยเดือน พฤษภาคม 2558.กองประมงต่างประเทศ กรมประมง, แหล่งข้อมูล: http://www.fisheries.go.th/foreign/images/pdf/0558.pdf. ค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม 2558.

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. (2557). หนังสือสถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2555.ศูนย์สารสนเทศกรมประมงเอกสารฉบับที่ 9/2557, แหล่งข้อมูล: http://www.fisheries.go.th/it-stat/yearbook/data_2555/menu_2555.htm. ค้นเมื่อวันที่ 8 พฤษภาคม 2558.

จอมสุดา ดวงวงษา. (2546). ความแปรผันทางพันธุกรรมกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium Rosenbergii* de Man) จากประเทศไทยและพม่าโดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น: 1-68 หน้า.

บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล คมกริช พิมพ์ภักดี และอุไร เต็งเจริญกุล. (2546). การศึกษาการใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอพีดีในเบื้องต้นในกุ้งก้ามกราม. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. 8(2): 4-10.

ประจวบ หลำอุบล. (2525). คู่มือปฏิบัติการวิชากุ้ง ปู. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ ทางทะเลคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 1-107.

สำนักงานประมงจังหวัดกาฬสินธุ์. (2556). การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม.แหล่งข้อมูล: http://www.fisheries.go.th/fpo-kalasin/main.html. ค้นเมื่อวันที่1 พฤษภาคม 2558.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. (2543). พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 56-65.

Aubert, H. and Lightner, D.V. (2000). Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the gulf of California, Mexico. Marine Biology 137: 875-885.

Bhassul, S., Hassanl, R., Jamari, Z., Guan, T.S. (2005). Genetic variation among freshwater prawns (*Macrobrachium Rosenbergii*): A Rapd And Rahms Suruey. In: the 6th National Congress on Genetics 12-14 Mav 2005, Kuala Lumpur. 159-161.

Bruyn, M.d., Wilson, J.A., and Mather P.B. (2004). Huxley's line demarcates extensive genetic divergence between eastern and western forms of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii.* Molecular Phylogenetics and Evolution 30: 251–257.

Charoenwattanasak, S., Petkham, R., Srisathapom, A., Niamphithak, P. (2015). The development and application of genetic markers for giant freshwater prawns *Macrobrachium Rosenbergii* by microsatellites. Aquaculture Research and Development 6(1): 295.

Chatterjee, N. R., Chatterjee, P. and (Dutta) Roy, S. (2013). Population structure of *Penaeus monodon* from coastal west Bengal using RAPD fingerprining. American International Journal of Research in Formal. Applied and Natural Sciences 3(1): 30-36.

Guerra, A.L., Lima, A.V.B., Taddei, F.G. and Castiglioni, L. (2010). Genetic polymorphism, molecular characterization and relatedness of *Macrobrachium* species (Palaemonidae) based on RAPD-PCR. Genetics and Molecular Research 9(4): 2317-2327.

Islam, S.S., Shah, Md.S., Rahi, Md.L. (2014). Assessment of genetic variability of prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) post larvae (PL) from the broods stocked under different sex ratios. International Journal of Aquaculture 4(9): 55-63.

Khan, S.R., Akter, H., Sultana, N., Khan, M.G.Q., Md. Wahab, A. and Md. Alam, S. (2014). Genetic diversity in three river populations of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Bangladesh assessed by microsatellite DNA markers. International Journal of Agriculture and Biology 16(1): 195-200.

Kumar, P., Sethi, S.N., Mahendran V., Nivas K. and Sundar, J. (2011). Tiger prawn (*Penaeus monodon*) brood stock of Andaman molecular characterisation by RAPD technique. Fishing Chimes 31(1): 24-27.

Nandlal, S. and Pickering, T. (2005). Freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* farming in Pacific Island countries. Vol 1. Noumea: Secretariat of the Pacific Community. pp. 5-38.

Niamaimandi, N., Arshad, A., Daud, S.K., Saed, R.C., Kiabi, B. (2010). Population structure of green tiger prawn, *Penaeus semisulcatus* (De Haan) in Bushehr waters,Persian Gulf. Iranian Journal of Fisheries Sciences 9(2): 337-341.

Sakaew, W., Pratoomthai, B., Pongtippatee, P., Flegel, T.W. and Withyachumnarnkul, B. (2013). Discovery and partial characterization of a non-LTR retrotransposon that may be associated with abdominal segment deformity disease (ASDD) in the whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. BioMed Central Veterinary Research 9: 189.

See, L.M., Hassan, R., Tan, S.G. and Bhassu, S. (2008). Genetic Characterization of wild stocks of prawns *M. rosenbergii* using random amplified polymorphic DNA Markers. Biotechnology 7(2): 338-342.

Udayasuriyan, R., Saravana Bhavan, P., Vadivalagan, C. and Rajkumar, G. (2015). Efficiency of different COI markers in DNA barcoding of freshwater prawn species. Journal of Entomology and Zoology Studies 3(3): 98-110.

Wilon, J.J. and Sing, K.W. (2013). DNA barcoding can successfully identify *Penaeus monodon,* associate life cycle stages, and generate hypotheses of unrecognised diversity. Sains Malaysiana 42(12): 1827-1829.

❑❑❑❑❑