

**AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM DNA
MARKERS: USEFULNESS FOR GENETIC MAPPING OF
PENAEUS MONODON**

BUSABUN CHAISALEE

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005**

**ISBN 974-04-5823-8
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP เพื่อประยุกต์ใช้ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมของกิ้งกูดดำ
(AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM DNA MARKERS:
USEFULNESS FOR GENETIC MAPPING OF PENAEUS MONODON)

บุญบัน ไชยสาลี 4636850 MBMG/M

วท.ม. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: กนกพร ไตรวิทย์กร, Ph.D., ALBERT J. KETTERMAN,
Ph.D., DUNCAN R. SMITH, Ph.D.

บทคัดย่อ

กิ้งกูดดำเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย การเลี้ยงกิ้งกูดที่เพิ่มจำนวนมากขึ้น ส่งผลให้เกิดผลกระทบหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปัญหาการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสมของ กิ้งกูด เทคนิคและความรู้ทางด้านอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ได้ถูกนำมาใช้เพื่อช่วยในการแก้ปัญหา ดังกล่าว ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรม AFLP ที่จำเพาะต่อการเติบโตของกิ้งกูดดำ และได้เปลี่ยนเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม SCAR ซึ่งเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ โดยได้ใช้กิ้งกูดดำที่มีอายุ 151 วัน และ จำแนกเป็น 4 กลุ่มตามเพศและขนาด DNA ของกิ้งกูด แต่ละกลุ่มได้ถูกนำมารวมกันเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ AFLP โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 96 คู่ระหว่าง *EcoRI*-ANN และ *MseI*-GNN ผลการวิเคราะห์ พบ 33 โพลิมอร์ฟิซึม จากไพรเมอร์ 24 คู่ หลังจากนั้น ไพรเมอร์ 24 คู่นี้ได้ถูกนำไปวิเคราะห์กับตัวอย่างจำนวน 24 ตัวอย่าง พบว่าให้ผล 2 โพลิมอร์ฟิซึม นอกจากนี้ 80 คู่ไพรเมอร์ระหว่าง *EcoRI*-ANN และ *MseI*-GNN ได้นำไปวิเคราะห์กับตัวอย่างกิ้งกูด 24 ตัว ที่ใช้ในการรวม DNA เบื้องต้นและพบว่ามี 91 โพลิมอร์ฟิซึม จาก 36 คู่ไพรเมอร์ เครื่องหมายพันธุกรรม AFLP จำนวน 8 เครื่องหมายได้นำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม SCAR และได้นำไปวิเคราะห์กับตัวอย่างกิ้งกูดที่ใช้ในการวิเคราะห์ AFLP และพบว่า เครื่องหมาย SFE9M38-3 SCAR สามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างกิ้งกูดดำตัวใหญ่และตัวเล็กได้ โดยมีความถูกต้องที่วิเคราะห์ได้ในเบื้องต้นประมาณ 71% นอกจากนี้ เครื่องหมาย SFE9M38-3 SCAR ยังให้ผลความถูกต้องประมาณ 62% เมื่อนำมาทดสอบกับกิ้งกูดดำอีกจำนวน 86 ตัว เครื่องหมายพันธุกรรม AFLP และ SCAR ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์ รวมถึงการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมของกิ้งกูดดำได้ต่อไป

**AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM DNA MARKERS:
USEFULNESS FOR GENETIC MAPPING OF PENAEUS MONODON**

BUSABUN CHAISALEE 4636850 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: KANOKPORN TRIWITAYAKORN, Ph.D., ALBERT J.
KETTERMAN, Ph.D., DUNCAN R. SMITH, Ph.D.,**ABSTRACT**

Penaeus monodon is one of the economically important species in Thailand. Farming of *P. monodon* has dramatically increased, and is also facing several problems such as infectious diseases and poor broodstock selection. The objectives for this project were to develop Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers specific to growth trait of *P. monodon* using E-ANN/M-GNN primer combinations, and to convert identified AFLP markers to Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) markers. The AFLP technique was used to identify polymorphisms from 4 pools of shrimp, large male, large female, small male and small female pools using 96 primer combinations of *EcoRI*-ANN/*MseI*-GNN. Of these, 24 primer combinations generated 33 polymorphic bands. All 24 primer combinations were used to amplify with 24 individual samples that were used to construct the DNA pools, resulting in 2 polymorphic markers. Moreover, an additional 80 primer combinations were screened with individual samples, resulting 91 polymorphic markers which were generated from 36 primer combinations. In order to exploit the identified AFLP markers to Marker Assisted Selection (MAS) program, the AFLP markers should be converted to SCAR markers. The eight AFLP markers that showed P-values of less than 0.05 were converted to SCAR markers. The results revealed that the SFE9M38-3 SCAR marker showed polymorphism in genomic DNA of 24 individual samples with 71% phenotype prediction. This SCAR marker was further tested with 86 additional shrimp samples indicating that it can predict the phenotype of growth trait with 62% phenotype prediction. In conclusion, the results of this study demonstrated that the SFE9M38-3 marker seems to be a potential marker that can be used to exploit the MAS program of shrimp.

KEY WORDS: PENAEUS MONODON / AFLP MARKER / SCAR MARKER

87 pp. ISBN 974-04-5823-8