รายงานการวิจัย

เรื่อง

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลสำหรับการจำแนกกุ้งเครย์ฟิช (Crayfish) ที่เลี้ยงในฟาร์มของเกษตรกรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

An application of molecular genetic markers for classification of farmed crayfish in northeastern Thailand.

พันธิวา แก้วมาตย์

กฤติญา แสงภักดี

กรรณิการ์ ทองดอนเปรียง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2561)

TITLE : An application of molecular genetic markers for classification of farmed crayfish in northeastern Thailand.

RESEARCHER : Assistant professor Dr. Puntivar Kaewmad
Mr.Kittiya Sangpakdee
Assistant Professor Kannikar Thongdonpriang

Organization : Major Biology, Faculty of Science and Technology

ACADEMIC YEAR : 2019

ABSTRACT

The study of external morphology of red claws crayfish specimens from 4 provinces Include; Roi Et, Khon Kaen, Maha Sarakham and Udon Thani, it was found that the red claws were normal and had complete organs. There are greenish brown color according to the nature of shrimp. The head is firmly attached to the body part. The hard shell is naturally shiny. The flesh is firmly attached to the clear, clean shell. The color of the shrimp flesh is clear pink. The DNA extraction of red claws crayfish from 8 provinces (fresh shrimp; Roi Et, Khon Kaen, Maha Sarakham and Udon Thani, s hrimp s ample preservation; Sa Kaeo, Yasothon, Nakhon Ratchasima and Chiang Rai) could be amplified the fragment of Cytochrome C oxidase I (COI) in mitochondria using universal primers Specific to COI (COI-C03 and COI-C01 / Chmr4 and Chmf4). The product PCR were approximately size 700-800 base pairs and 1000-1600 base pairs respectively. The results for studied the evolutionary relationships derived from the Neighbor joining method and Maximum likelyhood, it was found that DNA barcode technique can be used to separate the population of red claws crayfish from habitat of clearly.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้ศึกษาข้อมูลพื้นฐานด้านพันธุกรรมโดย การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลสำหรับการจำแนกกุ้งเครย์ฟิช (Crayfish) ที่เลี้ยงในฟาร์มของเกษตรกรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน และยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์กุ้งก้ามแดง เพื่อพัฒนาระบบเศรษฐกิจ นอกจากนี้ยังได้รับความร่วมมือจากหลายภาคส่วนไม่ว่าจะเป็น อาจารย์ เจ้าหน้าที่ นักศึกษาสาขาวิชาชีววิทยา ทำให้รายงานเล่มนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี และที่สำคัญอย่างยิ่งขอขอบคุณสำนักงานวิจัยแห่งชาติที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ปี 2561 จึงขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

2562

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ชื่อเรื่อง : การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลสำหรับการจำแนกกุ้งเครย์ฟิช (Crayfish) ที่เลี้ยงในฟาร์มของเกษตรกร ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ผู้วิจัย : ผศ.ดร.พันธิวา แก้วมาตย์
นายกฤติญา แสงภักดี
ผศ.กรรณิการ์ ทองดอนเปรียง

หน่วยงาน : สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ปีที่แล้วเสร็จ : 2562

บทคัดย่อ

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของตัวอย่างกุ้งก้ามแดงสดจาก 4 จังหวัด คือ ร้อยเอ็ด ขอนแก่น มหาสารคาม และอุดรธานี พบว่า กุ้งก้ามแดงมีรูปร่างปกติและมีอวัยวะครบ มีสีน้ำตาลอมเขียวตามธรรมชาติของกุ้ง ส่วนหัวติดแน่นกับส่วนลำตัว เปลือกแข็งเป็นเงามันตามธรรมชาติ เนื้อติดแน่นกับเปลือก ค่อนข้างใส สะอาด สีของเนื้อกุ้ง มีสีชมพูใส ทำการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างกุ้งก้ามแดง 8 จังหวัด (กุ้งสด; ร้อยเอ็ด ขอนแก่น มหาสารคาม และอุดรธานี, กุ้งในน้ำยารักษาสภาพ; สระแก้ว ยโสธร นครราชสีมา และเชียงราย) ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอย่างกุ้งก้ามแดง พบว่ามีคุณภาพดีสามารถนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยยีน Cytochrome C oxidase I (COI) ของไมโทคอนเดรีย ด้วยไพรเมอร์ที่มีลักษณะเป็น universal primers ที่จำเพาะต่อยีน COI (COI-C03 และ COI-C01 / Chmr4 และ Chmf4) หลังจากเพิ่มปริมาณแล้วตรวจสอบคุณภาพของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700-800 คู่เบส และ 1000-1600 คู่เบส ตามลำดับ นำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Neighbor joining และ Maximum Likelihood และพบว่าการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมแบบบาร์โค้ดสามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มจังหวัดต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา

กุ้งเครย์ฟิช หรือกุ้งล็อบสเตอร์น้ำจืด มีถิ่นกำเนิดทั้งในทวีปอเมริกาเหนือ ยุโรป เอเชียตะวันออก และออสเตรเลีย ซึ่งปัจจุบันมีมากกว่า 500 สายพันธุ์ มักอาศัยอยู่ตามโขดหินหรือใต้ขอนไม้ตามหนองน้ำ หรือลำธาร ปัจจุบันกระแสการเลี้ยงกุ้งเครย์ฟิชกำลังเป็นที่นิยมในหลายมิติทั้งในทางบวกและทางลบ ทั้งการเลี้ยงเป็นแฟชั่นในหมู่วัยรุ่น ด้วยความที่มีสีสันหลากหลายสวยงาม และเป็นสัตว์น้ำที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ มีรูปร่างบึกบึนน่าเกรงขาม เลี้ยงง่าย กินซากพืชซากสัตว์เป็นอาหาร ราคาเริ่มต้นตั้งแต่หลักร้อยไปจนถึงหลายพันบาท และในอีกมุมหนึ่งกุ้งชนิดนี้ได้รับความสนใจจากเกษตรกรเป็นจำนวนมาก เนื่องด้วยจากการเห็นสื่อโฆษณาต่างๆ ประกอบกับอยู่ในช่วงที่ราคาข้าวตกต่ำมีโรคและศัตรูพืชรบกวนทำให้ต้นทุนในการทำนาสูง และไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน ดังนั้นเกษตรกรหลายรายจึงต้องการรายได้เสริม ด้วยเหตุนี้จึงทำให้วงการตลาดกุ้งเริ่มขยายตัวมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งแต่เดิมกุ้งเครย์ฟิชเป็นที่รู้จักในวงการปลาตู้มานานมีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในเฉพาะกลุ่มเลี้ยงปลาตู้เท่านั้น โดยนำเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทยนานพอสมควร ส่งผลให้ตลาดการเลี้ยงกุ้งชนิดนี้ราคาตกต่ำอยู่พักใหญ่ และประกอบกับนักวิชาการบางหน่วยงาน มีข้อมูลที่น่าสนใจในด้านสิ่งแวดล้อม หากเกิดเล็ดรอดไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ อาจเป็นอันตรายกับสัตว์น้ำท้องถิ่นบางชนิดเพราะกุ้งเหล่านี้สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้เป็นอย่างดี ขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว และอาจส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อมในแหล่งน้ำในธรรมชาติได้ ซึ่งกุ้งกลุ่มนี้มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกัน โดยเฉพาะตอนที่ยังเป็นตัวอ่อน หากมีการหลุดรอดไปในธรรมชาติการจำแนกด้วยลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถใช้ในการระบุชนิดได้อย่างแน่ชัด และอาจมีความผิดพลาดสูง เพราะฉะนั้นการนำเครื่องหมายทางพันธุกรรมมาช่วยในการจำแนกเป็นอีกวิธีที่สามารถแก้ไขปัญหาในจุดนี้ได้ และทำให้ทราบข้อมูลที่อย่างรวดเร็ว ใช้ระยะเวลาสั้นไม่ต้องรอถึงโตเต็มวัย นำเฉพาะซากมาตรวจสอบได้ จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจที่ควรนำมาพัฒนาเพื่อช่วยในการจัดจำแนกกุ้งเครย์ฟิช

กุ้งเครย์ฟิชสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วงศ์ใหญ่ ๆ คือ Astacoidea หรือที่นิยมเรียกกันว่า กุ้งสาย P ซึ่งเป็นวงศ์ใหญ่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือและทวีปยุโรป โดยรวมแล้วเครย์ฟิชมีรูปร่าง มีลักษณะเด่นคือ ก้ามมีหนาม ขนาดโตเต็มที่ประมาณ 20 เซนติเมตร วงศ์ที่ 2

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
BANSOMDEJCHAOPHRAYA RAJABHAT UNIVERSITY

Parastacoidea หรือที่นิยมเรียกกันว่า กุ้งสาย C ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในออสเตรเลีย ปาปัวนิวกินี และอินโดนีเซีย เครย์ฟิช ในวงศ์นี้ก้ามจะไม่มีหนาม ขนาดเมื่อโตเต็มที่ประมาณ 30-40 เซนติเมตร สายพันธ์ที่นิยมเลี้ยงในไทยคือกุ้งสาย C ซึ่งนอกจากจะเลี้ยงเพื่อความสวยงามแล้ว ในปัจจุบันพบว่านิยมนำมาเลี้ยงเป็นกุ้งเนื้อเพื่อเพิ่มรายได้ โดยเฉพาะในกลุ่มกุ้งก้ามแดง เนื่องจากกุ้งเหล่านี้เลี้ยงง่าย โตเร็ว ไม่ว่าจะเลี้ยงในสภาวะแบบใดก็สามารถปรับตัวได้ดี ไม่มีโรครบกวนไม่กัดกินข้าวในนาสามารถเลี้ยงร่วมกันได้ มูลจากกุ้งก้ามแดงใช้เป็นปุ๋ยแก่ต้นข้าว และตลาดมีความต้องการมาก ปัจจุบันได้มีการจัดตั้งกลุ่มเกษตรกรผู้สนใจเป็นระบบสหกรณ์ควบคุมราคาการซื้อขายราคาของพ่อ-แม่พันธุ์ขึ้น เพราะสามารถส่งขายกุ้งแก้มแดงได้ โดยกุ้งเนื้อขายกิโลกรัมละ 750-800 บาท ขนาดกุ้ง 12-15 ตัวต่อกิโลกรัม ใช้ระยะเวลาเลี้ยงในบ่อดินรวม 7-8 เดือน นอกจากนี้สามารถเพาะพันธุ์ลูกกุ้งขายได้ (ฉวีวรรณ หนูนุ่น, 2554) จากการแพร่ขยายของตลาดในภูมิภาคต่างๆ จนถึงปัจจุบัน ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือก็มีเกษตรกรมีความสนใจในการเพาะเลี้ยงจำนวนมากทั้งเลี้ยงในระบบโรงเรือน การเลี้ยงแบบเกษตรอินทรีย์ การเลี้ยงแบบผสมผสาน สามารถสร้างรายได้เป็นอย่างดี แต่ปัญหาจากการเพาะเลี้ยงคือเกษตรกรจะต้องหาพ่อพันธ์ แม่พันธ์สายพันธุ์เดียวกันจากแหล่งอื่นๆ อย่างที่กล่าวมาข้างต้น กุ้งเครย์ฟิชในช่วงที่เป็นตัวอ่อน 1-2 เดือนแรกมีความแตกต่างกันน้อยมากทั้งรูปร่างสี ขนาดของก้าม ทำให้แยกสายพันธุ์ได้ยาก

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการนำเครื่องหมายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลชนิดดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนก เพราะถือว่าเป็นเครื่องมือที่มีความน่าเชื่อถือ และมีความแม่นยำในการจัดจำแนกสูง ใช้ระยะเวลารวดเร็ว และเป็นวิธีที่นิยมในใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังไม่มีข้อมูลรายงานการศึกษานี้ในกลุ่มกุ้งในประเทศไทย ซึ่งการศึกษาครั้งนี้คาดหวังว่าจะสามารถช่วยแก้ปัญหาในจุดนี้ให้กับเกษตรกรได้ อีกทั้ง จากข้อมูลการปรับปรุงพันธุ์และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้น องค์ประกอบทางพันธุกรรมของประชากรจะเปลี่ยนไป เมื่อมีการคัดเลือกเข้าไปเกี่ยวข้อง โดยจะมีปริมาณลดลง และสูญเสียแหล่งพันธุกรรมได้ทุกครั้งที่มีการเพาะพันธุ์สิ่งมีชีวิตในแต่ละรุ่น ดังนั้นพันธุกรรมพื้นฐานของพันธุ์ดังเดิมถือเป็นสิ่งสำคัญมาก จึงเป็นเรื่องจำเป็นในการบริหารจัดการด้านพันธุกรรมที่ถูกต้องและเหมาะสม เพื่อจะได้ส่งเสริมชนิดพันธุ์ที่เหมาะสม ทำให้สามารถประเมินคุณภาพและศักยภาพทางพันธุกรรมของประชากรและสายพันธุ์จากข้อมูลความหลากหลาย หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกุ้งเครย์ฟิชในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้ โดยเน้นพื้นที่ในกลุ่มร้อยแก่นสารสินธุ์ (4 จังหวัด คือ ร้อยเอ็ด ขอนแก่น มหาสารคาม และกาฬสินธุ์)

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. สำรวจฟาร์มเลี้ยงกุ้งเครย์ฟิช และชนิดของกุ้งเครย์ฟิชที่นำมาเพาะเลี้ยงของเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน (กรณีศึกษา: อีสานตอนบนในกลุ่มจังหวัดร้อยแก่นสารสินธุ์)
2. ศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของกุ้งเครย์ฟิชแต่ละชนิดที่นำมาเพาะเลี้ยงของเกษตรกร
3. สร้างเครื่องหมายทางพันธุกรรมแบบบาร์โค้ดเพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของกุ้งเครย์ฟิช

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. สำรวจฟาร์มเลี้ยงกุ้งเครย์ฟิช และชนิดของกุ้งเครย์ฟิชที่นำมาเพาะเลี้ยงของเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนเน้นกลุ่มในร้อยแก่นสารสินธุ์ (ขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม และกาฬสินธุ์) โดยนับจากฟาร์มกุ้งเครย์ฟิชที่มีกุ้ง 5,000 ตัวขึ้นไป
2. ศึกษาความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของกุ้งเครย์ฟิชแต่ละชนิดที่เกษตรกรนำมาเพาะเลี้ยงในเขตภาคตะวันออกฉียงเหนือตอนบนเน้นกลุ่มในร้อยแก่นสารสินธุ์ (ขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม และกาฬสินธุ์)
3. การจำแนกชนิดพันธุ์ของกุ้งเครย์ฟิชโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมแบบบาร์โค้ด

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

กุ้งเครย์ฟิช เป็นกุ้งที่ได้รับการส่งเสริมจากโครงการหลวงให้เพาะเลี้ยงและส่งผลผลิตจำหน่ายในภัตราคารของโรงแรมใหญ่ๆ ในเขตกรุงเทพฯ และจังหวัดเชียงใหม่ ภายใต้เครื่องหมายดอยคำ โดยผู้สนใจสามารถสอบถามรายละเอียดเพิ่มเติมได้ที่งานประชาสัมพันธ์มูลนิธิโครงการหลวง 0-5381-0765 ต่อ 104, 108 หรือที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดเชียงใหม่ (ที่มา: สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา http://www.nicaonline.com) จากกระแสการเพาะเลี้ยงที่มีมากขึ้นทำให้กุ้งกลุ่มนี้มีความต้องการในตลาดสูงขึ้น จำนวนเกษตรกรที่สนใจเพาะเลี้ยงมีมากขึ้นเนื่องจากราคาสูง สามารถเลี้ยงขายเป็นกุ้งเนื้อได้ และขายเฉพาะลูกพันธุ์ได้ ซึ่งการจะได้กุ้งที่มีเนื้อดี ลูกพันธุ์ดีนั้นจำเป็นที่จะต้องได้พ่อแม่พันธุ์ที่ดี เป็นพันธุ์แท้ แต่เนื่องด้วยปัญหาในการจัดจำแนกกุ้งนั้นต้องรอจนถึงระยะตัวเต็มวัยถึงจะสังเกตลักษณะของพันธุ์ได้ ซึ่งพ่อแม่พันธุ์ในระยะนี้จะมีราคาสูง การใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์สามารถเข้ามาช่วยประเมินคุณภาพของชนิดพันธุ์ เพื่อสร้างความมั่นในแก่เกษตรกร และผู้สนใจต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งเครย์ฟิชได้

การเพาะเลี้ยงกุ้งเครย์ฟิชในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้นำพ่อแม่พันธุ์ ลูกพันธุ์มาจากหลายถิ่น เช่นนำเข้าจากต่างประเทศ นำมาจากภูมิภาคอื่นที่มีการเพาะเลี้ยง ทำให้มีฐานทางพันธุกรรมแตกต่างกัน

เมื่อฐานทางพันธุกรรมแตกต่างกัน รูปร่างสัณฐานภายนอกย่อมต่างกันแต่สามารถแยกได้เมื่อโตเต็มวัย การสร้างเครื่องหมายทางพันธุกรรมแบบบาร์โค้ดสามารถใช้ในการจำแนกกุ้งเครย์ฟิชที่เพาะเลี้ยงในพื้นที่ของเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือกลุ่มในร้อยแก่นสารสินธุ์ (ขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม และกาฬสินธุ์) ได้

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพื้นฐานเพื่อเป็นข้อมูลในการบริหารจัดการด้านพันธุกรรมที่ถูกต้องและเหมาะสม เพื่อจะได้ส่งเสริมชนิดพันธุ์ที่เหมาะสม ทำให้สามารถประเมินคุณภาพและศักยภาพทางพันธุกรรมของประชากรและสายพันธุ์ของกุ้งเครย์ฟิชในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือกลุ่มในร้อยแก่นสารสินธุ์ (ขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม และกาฬสินธุ์) ได้

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ทราบปริมาณฟาร์มของเกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งเครย์ฟิชในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนในกลุ่มร้อยแก่นสารสินธุ์ (4 จังหวัด คือ ร้อยเอ็ด ขอนแก่น มหาสารคาม และกาฬสินธุ์)
2. ทราบความแตกต่างสัณฐานวิทยาภายนอกของกุ้งเครย์ฟิชแต่ละชนิดที่นำมาเพาะเลี้ยงของเกษตรกร
3. ได้เครื่องหมายทางพันธุกรรมแบบบาร์โค้ดเพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของกุ้งเครย์ฟิช
4. และได้ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพื้นฐานเพื่อเป็นข้อมูลในการบริหารจัดการด้านพันธุกรรมที่ถูกต้องและเหมาะสม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานและลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามแดง

2.1.1 อนุกรมวิธาน

กุ้งก้ามแดง จัดเป็นสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียนที่มีการจัดลำดับทางอนุกรมวิธานไว้ดังแสดงต่อไปนี้

Phylum Arthropoda

Subphylum Crustacea

Class Malacostraca

Order Decapoda

Family Parastacidae

Genus *Cherax*

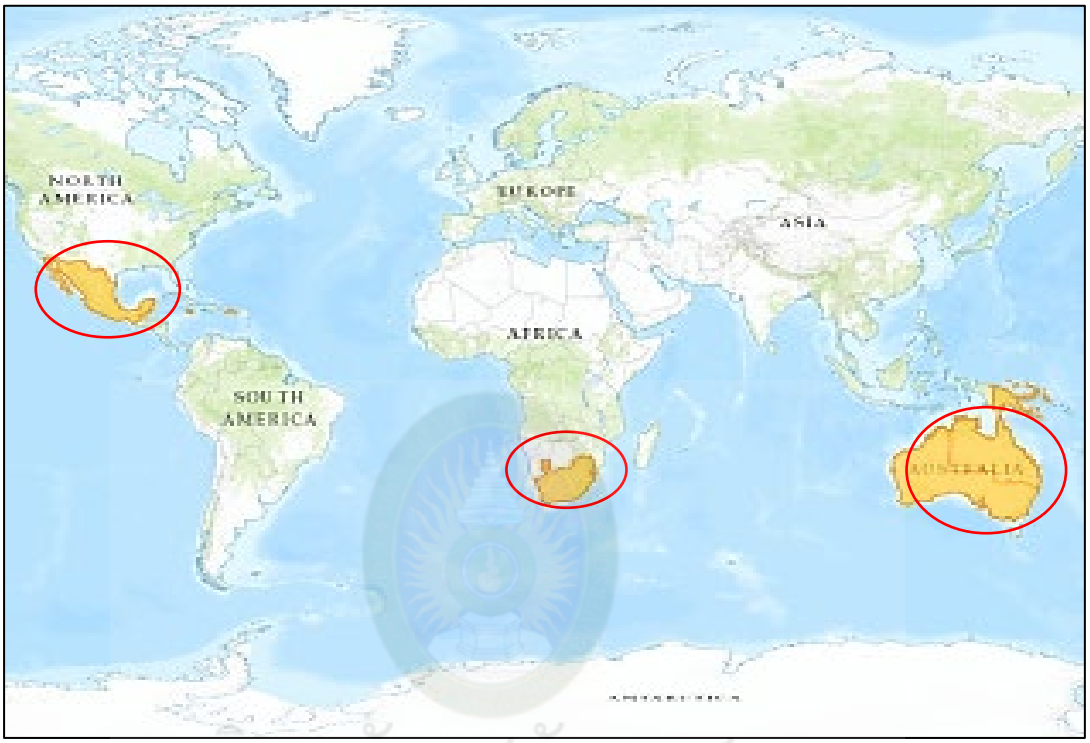
Species *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868)

กุ้งสายพันธุ์นี้มีถิ่นกำเนิดตามแหล่งน้ำจืดในทางตอนเหนือของรัฐควีนส์แลนด์ และทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศปาปัวนิวกินี (Loya Javellana, 1993) มีการแพร่กระจายพันธุ์ไปในแอฟริกาใต้ เม็กซิโก จาเมกาและเปอร์โตริโก และเนื่องจากกุ้งก้ามแดงในสกุลนี้เป็นกุ้งก้ามแดงที่มีขนาดใหญ่สกุลหนึ่ง อีกทั้งมีก้ามที่เรียวยาว ไม่มีหนาม และมีแถบสีแดงที่ก้าม จึงมีชื่อสามัญว่า Redclaw Crayfish และมีชื่ออื่นๆที่เรียกกันทั่วไปว่า กุ้งล็อบสเตอร์น้ำจืด กุ้งก้ามแดงออสเตรเลีย กุ้งก้ามแดงควีนส์แลนด์ กุ้งสีน้ำเงินเขตร้อน กุ้งน้ำจืดสีน้ำเงิน เป็นต้น โดยทั่วไปแล้วกุ้งก้ามแดงเป็นสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง แต่มีโครงสร้างยึดเกาะและป้องกันตัวห่อหุ้มอย่างแข็งแรงอยู่ภายนอกตัว ลักษณะตัวนั้นเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ มีขนาดความยาวประมาณ 8-12 นิ้ว ไม่รวมก้าม ลำตัวส่วนมากจะเป็นสีน้ำเงินอมเขียวหรือสีน้ำตาลอมเขียว และอาจมีสีน้ำตาลเข้มบ้าง ลักษณะเด่นของกุ้งก้ามแดงนั้นคือ มีก้าม (cheliped) เรียวยาวขนาดใหญ่ ไม่มีหนาม และมีแถบสีแดงที่ก้าม สามารถเอาไว้ใช้จับเหยื่อและขุดดินได้ดี ซึ่งในปัจจุบันมีการบรรยายอนุกรมวิธานของกุ้งเครย์ฟิชมากกว่า 500 ชนิด โดยมากกว่าร้อยละ 50 เป็นกุ้งเครย์ฟิชที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือ สามารถแบ่งกุ้งเครย์ฟิช ออกตามถิ่นกำเนิดตามธรรมชาติ คือ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1. กลุ่ม Procambarus เรียกว่า สาย P มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกา และยุโรป

2. กลุ่ม Cherax เรียกว่า สาย C มีถิ่นกำเนิดในโซน ออสเตรเลีย ปาปัวนิวกินี และอินโดนีเซีย



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 2.1 เขตการกระจายตัวของกุ้งก้ามแดง
ที่มา : (กษิดิศ วรรณุรักษ์, 2558)

2.1.2 ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามแดง

วงศ์ Parastacidae

สกุล *Cherax*

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cherax quadricarinatus*

ชื่อสามัญ กุ้งล๊อบสเตอร์น้ำจืด กุ้งก้ามแดงออสเตรเลีย กุ้งเรนโบว์ Redclaw, Rainbow Crayfish, Blue Lobster.

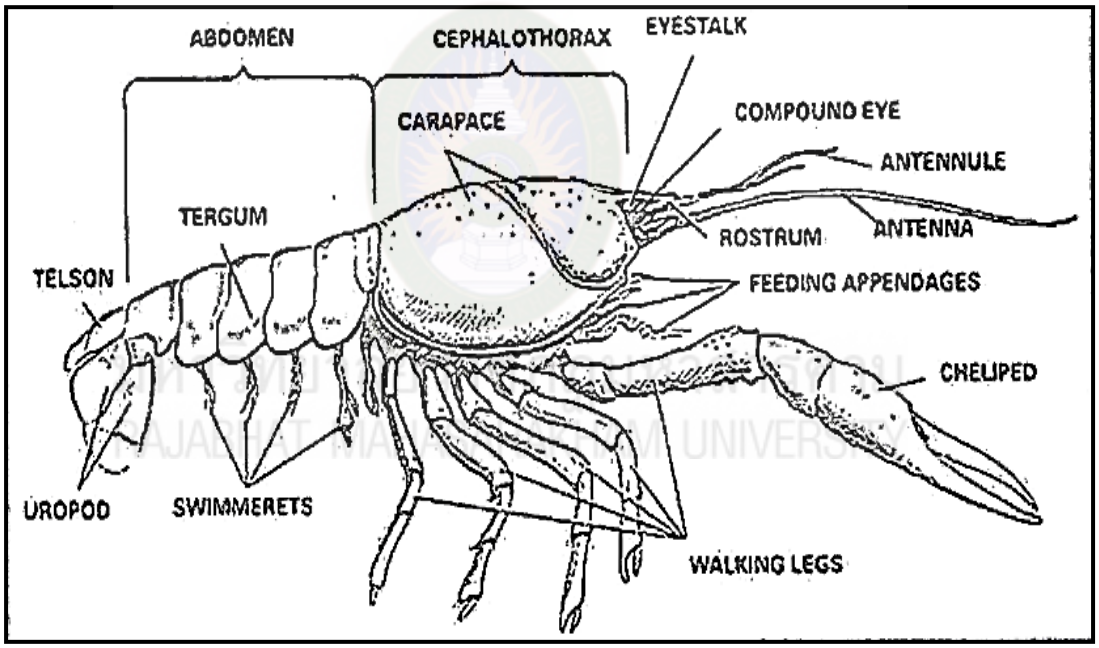
กุ้งก้ามแดงสายพันธุ์ซีแรกซ์ (Cherax) มีก้ามขนาดใหญ่ เรียบไม่มีหนาม เพศผู้มีแถบสีแดงที่ปลายก้ามด้านนอก ร่างกายของกุ้งแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยมีส่วนหัวรวมกับส่วนอก เรียกว่า

เซฟาโลทอแรกซ์ (cephalothorax) มีจำนวนปล้อง 13 ปล้อง และส่วนท้องมีจำนวนปล้อง 6 ปล้อง ระยางค์ของลำตัวประกอบด้วย

- ระยางค์ส่วนหัว มี 5 คู่ คือ หนวด 2 คู่ (antenna & antennule) ขากรรไกรล่าง (mandible) 1 คู่ มีลักษณะเป็นฟันบดแข็ง ขากรรไกรบน (maxilla) 2 คู่ ทำหน้าที่ช่วยจับอาหารเข้าปาก

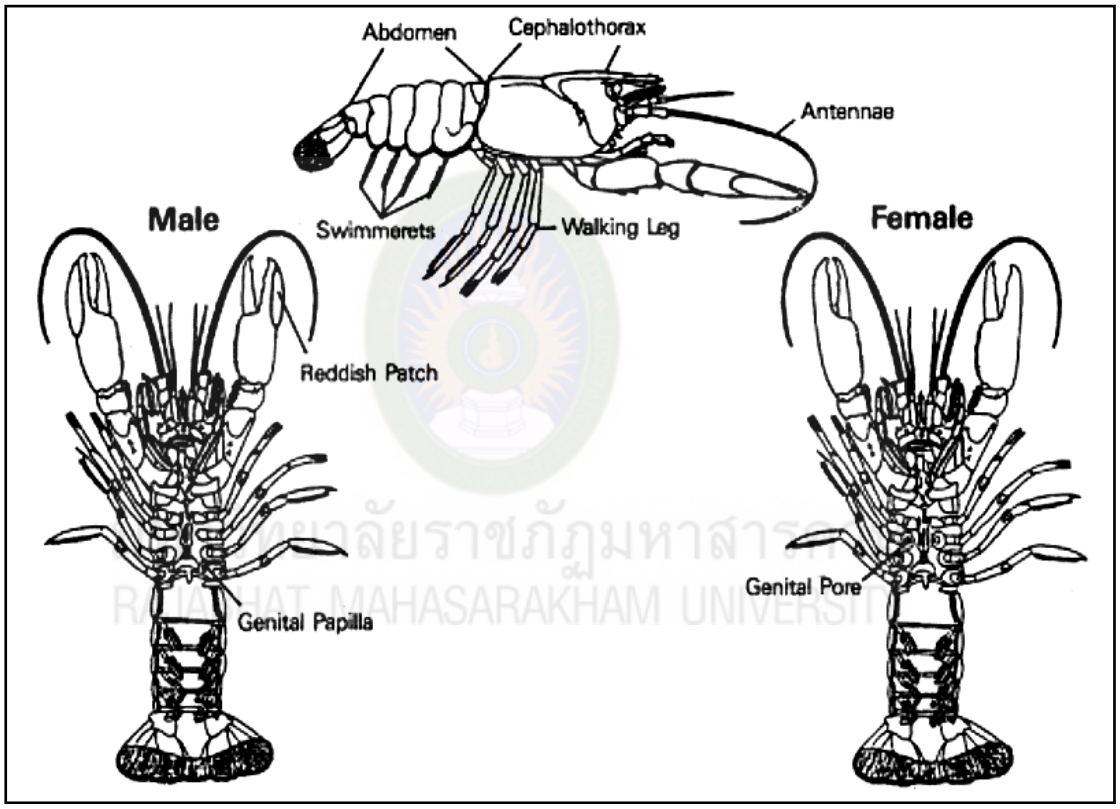
- ระยางค์ส่วนอกมี 8 คู่ คือ ระยางค์ที่ใช้ในการกิน (maxilliped) ขนาดเล็ก 3 คู่ ขาเดิน 5 คู่ ขาเดินคู่แรกเปลี่ยนเป็นก้ามหนีบ (cheliped) ใช้จับเหยื่อ

- ระยางค์ส่วนท้อง มี 6 คู่ คือ ขาว่ายน้ำ (pleopod หรือ swimmeret) 5 คู่ ใช้ว่ายน้ำ คู่สุดท้ายเป็นแพนหาง (uropod)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกุ้งก้ามแดง
ที่มา : (สุธิพงศ์ ถิ่นเขาน้อย, 2558)

การจำแนกเพศ สามารถทำได้โดยจับกุ้งหงายท้องแล้วสังเกตอวัยวะสืบพันธุ์ที่ เรียกว่า gonopods ที่ช่วงขาเดิน โดยกุ้งตัวผู้มีอวัยวะคล้ายตะขอบริเวณขาเดินคู่ที่2 และ 3 ซึ่งตะขอนี้มันจะเอาไว้เกี่ยวเกาะตัวเมียตอนผสมพันธุ์ สังเกตที่บริเวณขาเดิน ถ้าเป็นเพศผู้จะมีอวัยวะสืบพันธุ์ (papillae) บริเวณขาเดินคู่สุดท้าย (คู่ที่ 4) ส่วนเพศเมียจะมีอวัยวะสืบพันธุ์(annulus ventralis) เป็นแผ่นทรงวงรีสีขาวๆ ขนาดประมาณ1-2 มิลลิเมตร บริเวณขาเดินคู่ที่ 3 นอกจากนี้บริเวณขาว่ายน้ำคู่แรกและคู่ที่ 2 ของตัวผู้จะถูกพัฒนาขึ้นเป็นแขน เล็กๆสองข้าง (petasma) มีไว้สำหรับส่งผ่านถุงน้ำเชื้อไปยังตัวเมีย

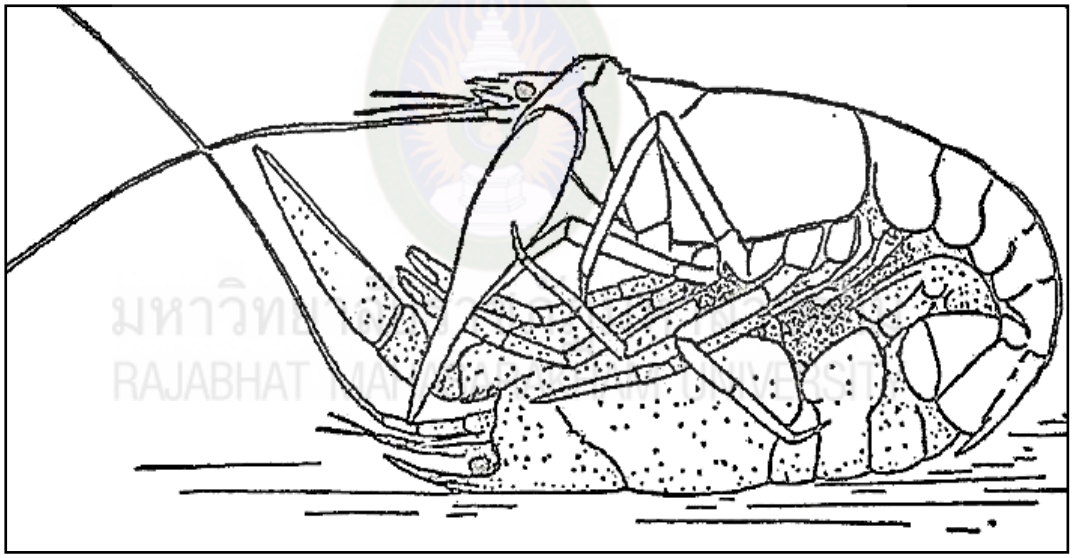


ภาพที่ 2.3 การจำแนกเพศของกุ้งก้ามแดง

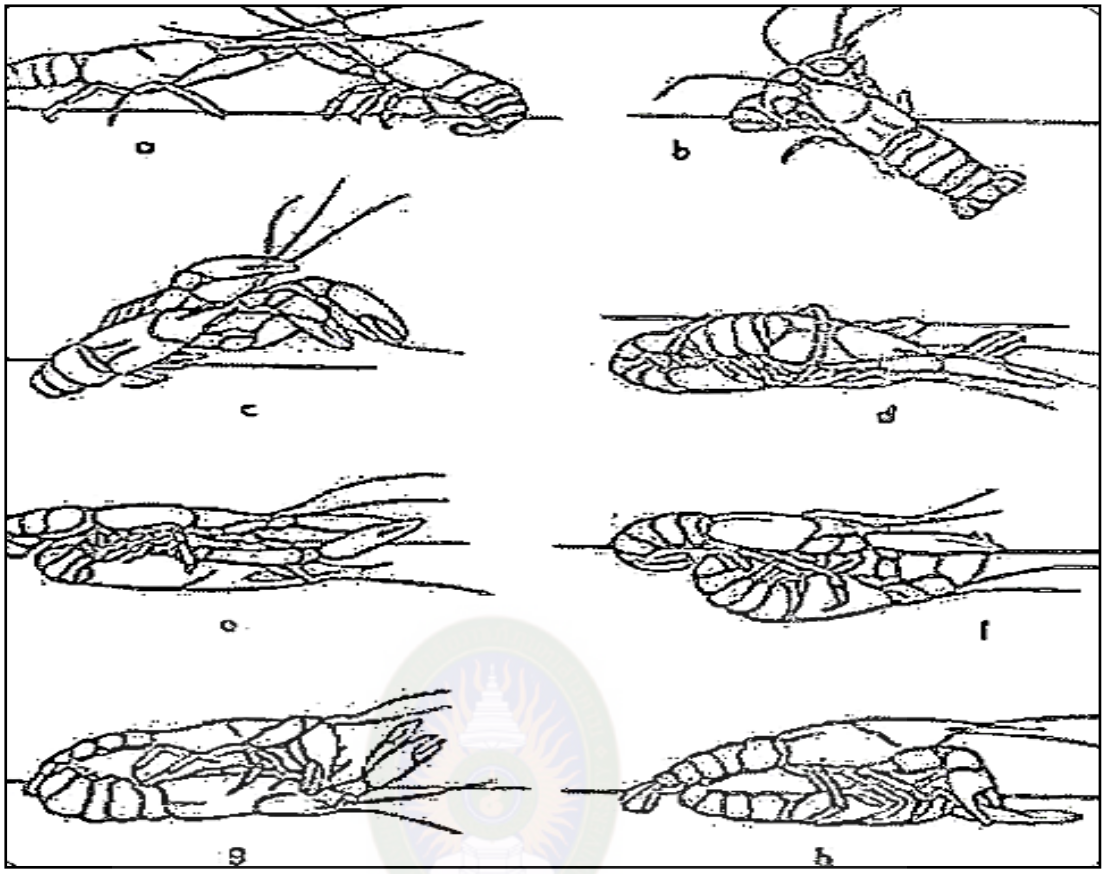
ที่มา : (Michael Masser, 1997)

2.1.3 การสืบพันธุ์ของกุ้งก้ามแดง

การสืบพันธุ์เริ่มโดยตัวผู้เข้าประกบตัวเมียทางด้านหลัง และพลิกลำตัวตัวเมียให้หงายท้อง แล้วตัวผู้เข้าประกบโดยใช้ตะขอพิเศษ เรียกว่า gonopods อยู่บริเวณขาเดินคู่ที่2 และ 3 ล็อคตัวเมียเอาไว้ในท่าท้องชนท้อง หันหัวไปในทิศทางเดียวกัน หลังจากนั้นตัวผู้จะส่งผ่านถุงน้ำเชื้อไปบริเวณท้องของตัวเมีย กระบวนการที่กุ้งผสมพันธุ์กันใช้เวลา 1-2 นาที หลังจากนั้นผู้เลี้ยงสามารถย้ายกุ้งตัวเมียไปยังบ่ออนุบาล เพื่อเป็นการเตรียมที่อยู่สำหรับลูกกุ้งในอนาคต หลังจากนั้นตัวเมียจะคอยผลิตไข่ขึ้นมาไว้บริเวณขาว่ายน้ำเป็นกระจุกๆ มองคล้ายพวงองุ่น หลังจากที่ไข่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว ตัวเมียจะหาที่หลบซ่อนนอนนิ่งไม่ยอมกินอะไร ระยะเวลาที่ตัวอ่อนใช้ในการพัฒนารูปร่างนั้นจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ปริมาณอาหาร และคุณภาพน้ำด้วย แต่โดยเฉลี่ยไข่จะพัฒนาจนเป็นตัวอ่อนที่มีหน้าตาเหมือนโตเต็มวัยภาย ใน3-4สัปดาห์ (สุธิพงศ์ ถิ่นเขาน้อย, 2558)



ภาพที่ 2.4 การจำลองขณะตัวผู้ทำการส่งถ่ายถุงน้ำเชื้อ
ที่มา : (สุธิพงศ์ ถิ่นเขาน้อย, 2558)



ภาพที่ 2.5 การจำลองพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของกุ้งก้ามแดง

ที่มา : (สุธิพงศ์ ถิ่นเขาน้อย, 2558)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.1.4 วงชีวิตของกุ้งก้ามแดง

ไข่กุ้งเมื่อปฏิสนธิและฟักเป็นตัวอ่อนจะมีขั้นตอนการพัฒนาเปลี่ยนรูปร่างจนเป็นตัวเต็มวัย หลายช่วงด้วยการลอกคราบ โดยทั่วไปกุ้งมีช่วงพัฒนาตัวอ่อน ซึ่งมีระยะหลัก 5 ระยะ คือ ระยะนอเพลียส ระยะซูเอีย ระยะไมซิส ระยะโพสต์ลาวา และระยะโตเต็มวัย

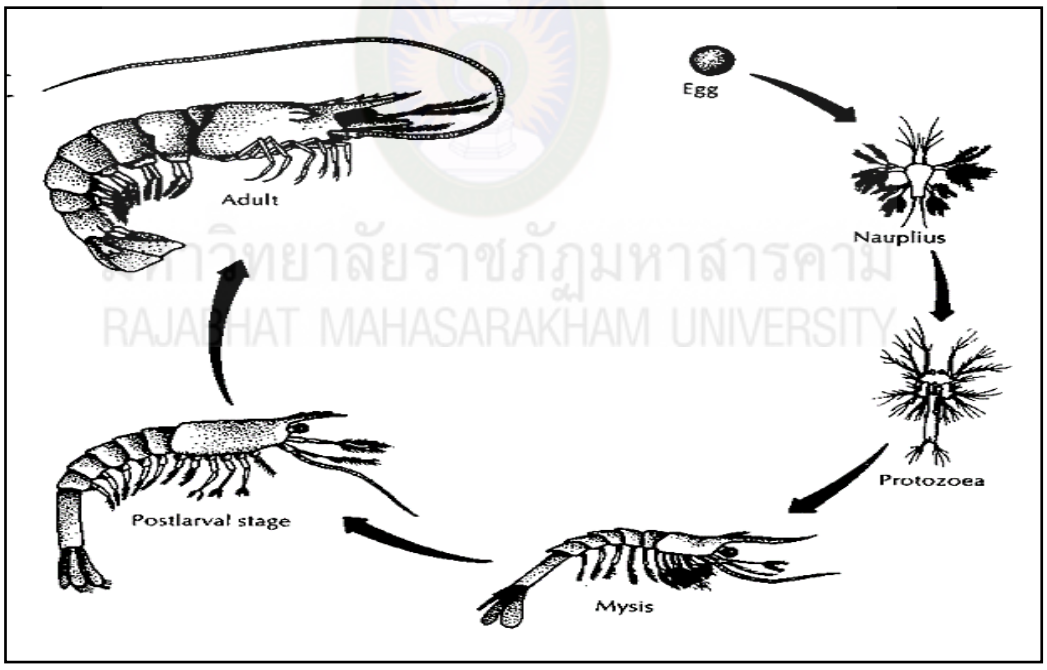
ระยะที่ 1 ระยะนอเพลียส (nauplius) มีตัวย่อว่าระยะ N เป็นระยะแรกที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ มีขนาดเล็กมองด้วยตาเปล่าเกือบไม่เห็น กุ้งระยะนี้ลูกกุ้งมีรูปร่างคล้ายแมงมุม ส่วนหัวและลำตัวไม่แยกออกจากกันและยังไม่แบ่งเป็นปล้อง ยังไม่ต้องการอาหาร เนื่องจากมีถุงอาหารสำรอง (yolk sac) ที่ติดมากับตัว ลูกกุ้งดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนประมาณ 2 วัน ระยะนี้ลอกคราบ 6 ครั้ง ภายใน 40-50 ชั่วโมง การลอกคราบแต่ละครั้งจะมีการพัฒนาขนาดลำตัวและเปลี่ยนรูปร่างก่อนเข้าระยะที่ 2

ระยะที่ 2 ระยะซูเอีย (zoea) มีตัวย่อว่า ระยะ Z ลูกกุ้งมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวและลำตัวแยกจากกันโดยเริ่มแบ่งเป็นปล้อง ระยะนี้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยลอกคราบ 3 ครั้ง ผู้เลี้ยงกุ้งเรียกระยะนี้ว่า กุ้งหงายตัว

ระยะที่ 3 ระยะไมซิส (mysis) มีตัวย่อว่า ระยะ M ลูกกุ้งว่ายน้ำแบบหัวชี้ลง มีการพัฒนารูปร่างโดยลอกคราบ 3 ครั้ง ลักษณะเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเหมือนพ่อแม่ ผู้เลี้ยงกุ้งเรียกระยะนี้ว่า กุ้งตะแคงตัว

ระยะที่ 4 ระยะโพสต์ลาวา (postlarva) มีตัวย่อว่าระยะ P เป็นระยะที่ลูกกุ้งมีลักษณะใกล้เคียงกับพ่อแม่มาก แต่ขนาดเล็กกว่า มีรยางค์ต่างๆครบทุกส่วนทำหน้าที่อย่างสมบูรณ์ และมีพัฒนาการไปเรื่อยๆจนเข้าสู่กุ้งวัยรุ่น (juvenile) โดยแบ่งเป็น 25 ระยะ ภายใน 25 วัน เรียกว่าระยะ P1-P25 เริ่มว่ายน้ำเฉียงขึ้นเหมือนพ่อแม่ ผู้เลี้ยงกุ้งเรียกระยะนี้ว่า กุ้งคว่ำ

ระยะที่ 5 ระยะโตเต็มวัย (Adult) มีการลอกคราบถึง 25 ครั้ง หลังการลอกคราบแต่ละครั้งรูปร่างจะสมบูรณ์ยิ่งขึ้น



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 2.6 วงชีวิตกุ้งก้ามแดง

ที่มา : (www.farmthailand.com, 2557)

2.1.5 การลอกคราบของกุ้งก้ามแดง

ระยะก่อนการลอกคราบ (Premolt) กุ้งจะไม่กินอาหารจะสังเกตได้ว่ากุ้งเริ่มกินอาหารไม่หมด แต่กุ้งจะดึงสารอาหารและพลังงานจากอาหารที่สะสมไว้ที่ตับมาใช้แทน การสร้างคราบใหม่จะเริ่มสร้างไคตินจากอาหารที่สะสมไกลโคเจนที่ถูกสะลมไว้จะลดลงเนื่องจากถูกนำไปสร้างไคตินในการเปลี่ยนเป็นเปลือกใหม่ ในระยะนี้จะพัฒนาเข้าสู่ระยะลอกคราบเร็วหรือไม่ขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารที่จะพัฒนาเป็นเปลือกใหม่ หากกุ้งได้รับสารอาหารและเปลี่ยนเป็นไคตินได้มากก็จะลอกคราบได้เร็ว แต่ในกรณีหากเกิดปัญหาการกินชะงัก หรือสารอาหารไม่เพียงพอที่จะเปลี่ยนให้อยู่ในรูปไคตินในเปลือกใหม่ ช่วงระยะเวลาในการลอกคราบก็จะยืดออกไป 3-5 วัน ระยะนี้ความต้องการออกซิเจนของเซลล์จะเพิ่มขึ้น จะมีการดูดซึมพวกแร่ธาตุและสารอินทรีย์ต่างๆที่สะสมอยู่ที่เปลือกเก่ากลับเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านระบบเลือด ทำให้คราบเก่าอ่อนนุ่มลง

ระยะลอกคราบ (Intermolt) ในระยะนี้กุ้งจะหยุดการเคลื่อนไหว กิจกรรมต่างๆเริ่มลดลง ปริมาณกลูโคส โปรตีนและไขมันในเลือดจะเพิ่มสูงขึ้น รวมทั้งการรับออกซิเจนเข้าสู่ร่างกายก็จะเพิ่มขึ้น เนื่องจากกุ้งต้องใช้พลังงานมากในการลอกคราบ เมื่อลอกคราบเสร็จแล้วจะมีการดูดซึมน้ำเข้าสู่ร่างกายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยดูดซึมจากกระแสเลือดและเนื้อเยื่อของร่างกาย ระยะนี้จะสั้นมาก เพราะเป็นระยะที่อันตรายที่สุดในวงจรชีวิตมักพบการสูญเสียกับกุ้งที่สะสมสารอาหารไม่เพียงพอ กุ้งลอกคราบไม่ออก ลอกคราบติด เปลือกนิ่ม และมักกินกันเอง

ระยะหลังการลอกคราบ (Postmolt) หลังจากการลอกคราบสมบูรณ์แล้ว การสะสมแคลเซียมก็เริ่มต้นทันทีเพื่อช่วยเร่งการแข็งตัวของเปลือก ระยะนี้จะมีการดึงน้ำและแร่ธาตุเข้าสู่ร่างกายมากที่สุด เพื่อเพิ่มขนาดและน้ำหนักตัวของร่างกาย มีดารสะสมแคลเซียมที่บริเวณคราบชั้นนอก เมื่อเปลือกเริ่มแข็งก็จะเริ่มมีการเคลื่อนไหวและเริ่มกินอาหารเพิ่มขึ้นหลังจากการระยะพักจากการลอกคราบ หรือคราบใหม่แข็ง

หลังการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเสร็จสมบูรณ์ อาหารที่กุ้งกินในแต่ละวันจะเริ่มเพิ่มมากขึ้น อาหารที่กินเข้าไปจะถูกใช้ไปในการดำรงชีวิตประจำวัน ส่วนที่เหลือจะถูกเปลี่ยนไปสะสมในตับ อยู่ในรูปของสารอาหารพวกโปรตีน ไขมัน และไกลโคเจน เพื่อนเป็นอาหารและพลังงานสำรองในการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารที่จำเป็นในการสร้างเปลือกใหม่อีกครั้ง ด้วยกลไกลทางธรรมชาติกุ้งจะรู้ตัวเองว่าสารอาหารต่างๆที่สะสมไว้เพียงพอสำหรับการลอกคราบแล้ว การกินอาหารจะเริ่มลดลงเล็กน้อยและเตรียมเข้าสู่ระยะลอกคราบอีกครั้งเป็นวัฏจักรเช่นนี้ตลอดวงชีวิตของกุ้ง

ช่วงความถี่ในการลอกคราบแต่ละครั้ง กุ้งจะมีความถี่และความห่างในการลอกคราบแต่ระยะแตกต่างกันตามอายุของกุ้ง ดังนี้

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

อายุ 1-30 วัน กุ้งมีน้ำหนักประมาณ 2-5 กรัม ช่วงการลอกคราบ 6-7 วัน/ครั้ง
อายุ 30-60 วัน กุ้งมีน้ำหนักประมาณ 6-9 กรัม ช่วงการลอกคราบ 7-8 วัน/ครั้ง
อายุ 60-90 วัน กุ้งมีน้ำหนักประมาณ 10-15 กรัม ช่วงการลอกคราบ 9-10 วัน/ครั้ง
อายุ 90-120 วัน กุ้งมีน้ำหนักประมาณ 16-22 กรัม ช่วงการลอกคราบ 12-13 วัน/ครั้ง

ภาพที่ 2.7 การลอกคราบของกุ้งก้ามแดง
ที่มา : (สุธิพงศ์ ถิ่นเขาน้อย, 2558)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.2 เครื่องหมายทางพันธุกรรม

เครื่องหมาย (marker) คือตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะเจาะจงในด้านต่างๆ ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ได้นำเอาเครื่องหมายที่เป็นเครื่องบ่งชี้ลักษณะทางด้านการเกษตรต่างๆ มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปฏิบัติให้สูงขึ้น ซึ่งเครื่องหมายที่ใช้สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทคือ

1. Morphological markers เป็นตัวบ่งชี้ทางสรีรวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาคือลักษณะที่ปรากฏโดยทั่วไปที่สามารถสังเกตได้ ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือใดๆเป็นตัวบ่งชี้ เป็นลักษณะที่แสดงออกภายนอก เช่น ลักษณะความสูง, ลักษณะสี, ลักษณะความแตกต่างของใบ ขนจะงอยปาก เป็นต้น

2. Biochemical markers คือการใช้โมเลกุลทางชีวเคมีเป็นตัวระบุถึงความแตกต่างในพืชที่ทำการศึกษา เช่น การใช้ isozyme หรือ protein ในการศึกษาพืช หรือสัตว์ต่างชนิดหรือต่างพันธุ์

3. DNA markers คือการใช้ดีเอ็นเอมาเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบถึงความแตกต่างในระดับของยีน หรือดีเอ็นเอในพืชที่เราทำการศึกษา ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะมากกว่าเครื่องหมายชนิดอื่น โดยศึกษาจากความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนโมเลกุลดีเอ็นเอ (ศุภมิตร เมฆฉาย, 2555)

เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอสามารถใช้บ่งชี้ลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจในสัตว์ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ ซึ่งมีอยู่ 2 รูปแบบ (1) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอตั้งอยู่บนยีนที่ควบคุมลักษณะนั้น โดยความผันแปรของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเป็นสาเหตุที่แท้จริงของการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏ และ (2) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอตั้งอยู่ในบริเวณข้างเคียงกับยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจโดยที่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอดังกล่าว ไม่มีผลโดยตรงต่อความผันแปรของลักษณะปรากฏ แต่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะปรากฏ และถ่ายทอดทางพันธุกรรมในรูป linkage marker (disequilibrium หรือ equilibrium) ไปกับยีนเป้าหมายเสมอ
เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ ที่ใช้บ่งชี้ลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจในปศุสัตว์ ส่วนใหญ่มักจะเป็นแบบที่ 2

การทำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดได้แนวคิดมาจากการทำบาร์โค้ดในสินค้าต่าง ๆ เพื่อประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดและจำแนกสิ่งมีชีวิต ให้มีความถูกต้อง รวดเร็วและง่ายต่อการนำมาใช้ โดยอาศัยหลักการที่ว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่แสดงลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ซึ่งแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่น ตามหลักการวิวัฒนาการของ ชาร์ล ดาร์วิน นักอนุกรมวิธานจึงได้เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์สั้น ๆ ของดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดสูงแต่มีความต่างระหว่างชนิดเดียวกันต่ำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด ในปี ค.ศ. 2003 ได้มีการจัดตั้ง Consortium for the Barcode of Life (CBOL) ขึ้นเพื่อรวบรวมและจัดทำฐานข้อมูลกลาง ทำเป็นมาตรฐานและคู่มือในการทำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด การนำข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์มาใช้เพื่อทำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดมีหลักการสำคัญคือ จีนที่ศึกษาต้องมีอัตราวิวัฒนาการเหมาะสมกับกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา

การทำ DNA barcode มีวัตถุประสงค์เพื่อ ใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการระบุสิ่งมีชีวิต และมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีนักอนุกรมวิธานในการสร้างระบบอ้างอิงที่ถูกต้อง เพราะฐานข้อมูลจะต้องเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้จากตัวอย่างที่มีการระบุชนิดอย่างถูกต้องโดยนักอนุกรมวิธาน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เท่านั้น DNA barcode จึงเป็นเครื่องมือวิเคราะห์อย่างง่ายที่มีพื้นฐานอยู่บนความรู้ของนักอนุกรมวิธานในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต ข้อมูล ณ เดือนมีนาคม ปี ค.ศ. 2008 มีลำดับนิวคลีโอไทด์หรือข้อมูล DNA barcode อยู่ในฐานข้อมูลของ The International Barcode of Life project (iBOL) ทั้งหมด 363,584 ลำดับ (จากสิ่งมีชีวิต 50,039 ชนิด) และมี 136,338 ลำดับ (จากสิ่งมีชีวิต 13,761 ชนิด) เป็นข้อมูลเข้าเกณฑ์ของการใช้เป็น DNA barcode ได้ (Frezal and Leblois, 2008)

สำหรับบริเวณที่ใช้เป็น DNA barcode นั้นต้องมีคุณสมบัติ 3 ประการ ได้แก่

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนนั้นมีความแตกต่างมากพอที่จะทำให้แยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ แต่ต้องมีความแตกต่างภายในชนิดเดียวกันต่ำมากหรือไม่มีเลย

2. เป็นดีเอ็นเอที่มีบริเวณอนุรักษ์ที่สามารถให้ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer เข้ามาจับเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณนั้นด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้

3. มีขนาดที่เหมาะสมประมาณ 500-800 คู่เบส (base pair; bp)

ซึ่งการเลือกบริเวณที่จะนำมาใช้เป็น DNA barcode มีความสำคัญมาก หากเลือกบริเวณที่นำมาใช้เป็น DNA barcode ได้เหมาะสมกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาจะทำให้เทคนิค DNA barcode เป็นเทคนิคที่สามารถนำไปใช้ได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

การศึกษา DNA barcode ในสัตว์นั้น เริ่มโดย Hebert *et al*. (2003) ได้ใช้บริเวณดีเอ็นเอของจีน Cytochrome c oxidase I (COI) ที่มีขนาดประมาณ 650 bp ในตำแหน่งเบสที่ 58–705 ทางด้าน 5′ ของจีน COI อ้างอิงตามจีโนมในไมโทคอนเดรียของหนู (Frezal and Leblois, 2008) ซึ่งค่อนข้างประสบความสำเร็จอย่างมากในกลุ่มสัตว์ เนื่องจากจีน COI มีข้อดีกว่าจีนในไมโทคอนเดรียบริเวณอื่นๆ คือ มีขนาดสั้นประมาณ 650 bp สามารถเพิ่มปริมาณด้วย universal pirmer ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ครอบคลุมขอบเขตของความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในกลุ่มสัตว์ได้อย่างดี นอกจากนี้ลำดับดีเอ็นเอของจีน COI ยังให้ความแตกต่างในสัตว์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จุฑามาศ วงศ์ภูมิ และบุญมี กวินเสกสรร (มปป.) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งเคยหรือเคย (Krill) ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ได้จากธรรมชาติ ให้คุณค่าทางโภชนาการสูง มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ ได้มีการนำกุ้งเคยไปประยุกต์ใช้ในการประกอบอาหารประเภทต่าง ๆ คนไทยได้มีการนำกุ้งเคยมาใช้ในการทำกะปิ โดยศึกษากุ้งเคย 3 สกุลคือสกุล *Acetes, Lucifer* และ *Mesopodopsis* โดยใช้เทคนิค Random Polymorphic DNA (RAPD) จากการทดลองทำ

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสไม่จำเพาะขนาด10นิวคลีโอไทด์รวมทั้งสิ้น 8 ไพรเมอร์ คือ S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 และ S8 กับดีเอ็นเอต้นแบบของกุ้งเคย พบว่าไพรเมอร์ S7 และ S8 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนสูง ซึ่งทำให้เกิดแทบดีเอ็นเอที่ 30 คู่เบสขนาดประมาณ 60 นาโนกรัม ในการทำอาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ S7 และ S8 พบว่ายังไม่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของกุ้งเคยทั้ง 3 สกุลได้

จอมสุดา ตวงวงษา (2546) กล่าวถึงเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA) เป็นวิธีการหาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR : Polymerase Chain Reaction) โดยการใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่เป็น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonecleotides) ที่มีลำดับเบสสั้น ๆ เพียง 8-10 คู่เบส (bp) โดยให้จับกับสายดีเอ็นเอแบบสุ่มก็จะได้ดีเอ็นเอ (DNA: Deoxyribonucleic acid) ที่เป็นผลผลิตของพีซีอาร์ (PCR product) สามารถนำไปใช้หาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ เทคนิคนี้สามารถทำได้สะดวก ขั้นตอนในการทำการทดลอง รวดเร็วและง่าย ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสที่ใช้ ในการตรวจเช็คผลจะใช้รูปถ่ายภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (ultraviolet) แทนการใช้สารกัมมันตรังสี ในปฏิกิริยาจำเป็นต้องมีการควบคุมองค์ประกอบของปฏิกิริยาให้เหมาะสม เทคนิคนี้จึงเหมาะในการจำแนกชนิดของกุ้งเคยในแต่ละสายพันธุ์

อัญชลี ทัศนาขจร (2546) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซเทลไลต์ ตรวจสอบตัวอย่างกุ้งกุลาดำจาก 5 จังหวัด แบ่งเป็นโซนอันดามัน และอ่าวไทย ใช้เครื่องหมายในการตรวจสอบ 5 โลกัส โดยพบว่ากุ้งฝั่งอันดามันมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกุ้งฝั่งอ่าวไทย ($P<.001$) และเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์สามารถแยกความแตกต่างภายในกุ้งฝั่งอ่าวไทยประชากรของชุมพร และตราด ($P<.001$) แต่ไม่พบความแตกต่างในกุ้งฝั่งอันดามัน ($P<.05$) และพบว่ากุ้งชุมพรมีพันธุกรรมใกล้ชิดกับกุ้งอันดามันมากกว่ากุ้งจากตราดที่อยู่ในฝั่งเดียวกัน ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่ามีการปะปนของพันธุกรรมเนื่องจากการเคลื่อนย้ายกุ้งมาเลี้ยงในแถบนี้ จากข้อมูลที่ได้นี้นับเป็นประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำของไทย ตลอดจนการวางแผนในการปล่อยลูกกุ้งสู่ธรรมชาติเพื่อไม่ให้มีการปะปนระหว่างประชากรกุ้งที่มีพันธุกรรมต่างกัน อันจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้

โอปอล์ สิวะสุธรรม และคณะ (2556) ได้ศึกษาโครงสร้างของกุ้งกุลาดำ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลและพบว่าสามารถนำมาใช้ในการประมาณค่าความสัมพันธ์ทางเครือญาติได้เช่นกัน โดยวิธี relatedness estimators (alias kinship estimators) มีวัตถุประสงค์ เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี relatedness estimators

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

(molecular relatedness) จากประชากรที่ไม่ทราบพันธุ์ประวัติ (unknown pedigree) โดยใช้ข้อการเจริญเติบโตในรูปของความยาวรวม ที่อายุ 6 เดือน (total length, TL6) ของประชากรกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่ได้จากการผสมแบบธรรมชาติ จำนวน 32 ครอบครัว ภายใต้การดูแลของหน่วยกักกันโรคจากพ่อแม่พันธุ์กุ้ง (Shrimp Quarantine Center; SQC) มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยเริ่มจากวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) ของลูกกุ้งที่ได้จากการสุ่มในแต่ละครอบครัว จำนวน 3,200 ตัว มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ microsatellite จำนวน 7 ตำแหน่ง (BTPm8, BTPm47, CUPmo2, CUPmo15,DPm109, DPm110 and DPm313) โดยวิธี Restricted Maximum Likelihood (REML) จากการประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรม พบว่าอัตราพันธุกรรมของความยาวรวมที่อายุ 6 เดือน มีค่าเท่ากับ 0.28±0.16 และค่าการผสมพันธุ์จะอยู่ในช่วง -2.43E+00 ถึง 7.58E+00 ซึ่งค่าที่ได้มีความแม่นยำและสามารถนำไปใช้ในการคัด เลือกพันธุ์กุ้งที่ไม่ทราบพันธุ์ประวัติในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ได้

Marzano, *et al.* (2009) กุ้งเคร์ยฟิชแดง (*Procambarus clarkii*) มีการกระจายตัวอุดมสมบูรณ์เพิ่มมากขึ้นในอิตาลี ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีการรุรานของกุ้งเครย์ฟิชกลุ่ม Cambaridae แต่ไม่ใช่ *P. clarkia* ที่สำคัญคือที่การตรวจพบกุ้ง marbled crayfish ในแหล่งน้ำตอนกลางของอิตาลีเป็นครั้งแรก ซึ่งกุ้งกลุ่มนี้มีนิสัยการสืบพันธุ์แบบ parthenogenetic ทำให้เพิ่มขยายจำนวนได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ระดับโมเลกุลโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากบริเวณยีน COI โดยใช้ไพรเมอร์ HCO 2198 และ LCO 1490 (Folmer *et al*. 1994;

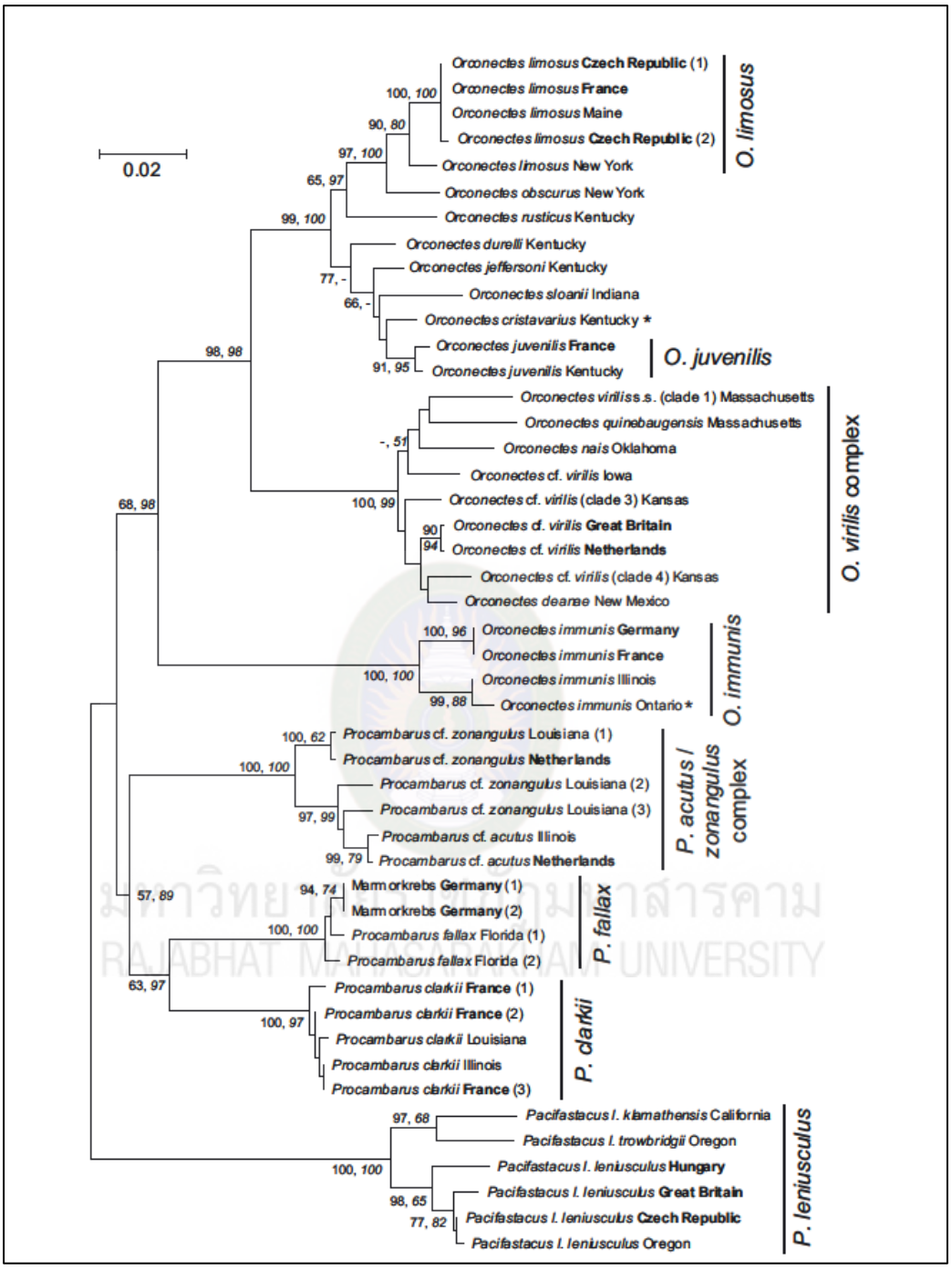
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Trontelj *et al.* 2005; Dawnay *et al*. 2007) ผลที่ได้พบว่าไม่มีความแตกต่างใด ๆ ภายในประชากร *P. clarkii* และพบว่ากุ้งทั้งกลุ่มลูกผสม และกลุ่ม *P. clarkii* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงมาก แม้ว่ารูปแบบของการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างสองเผ่าพันธุ์ของกุ้งนั้นยังไม่สามารถแสดงได้ชัดเจน แต่ก็สามารถแยกชนิดของกุ้งเครย์ฟิชออกจากกันได้และกลุ่มวิจัยคาดว่าจะสามารถพบข้อมูลเกี่ยวกับเส้นทางใหม่ของการแพร่กระจายพันธุ์และภัยคุกคามที่เกิดโดยสายพันธุ์ที่สืบพันธุ์แบบ parthenogenesis ต่อไป

Filipova, L. *et al.* (2011) ศึกษาการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกกุ้งเคร์ยฟิชที่แพร่กระจายในยุโรป เนื่องจากกุ้งกลุ่มนี้จัดเป็นพันธุ์ต่างถิ่น (alien crayfish) ที่มีต้นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือได้เข้ามาเป็นที่ยอมรับในยุโรปในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา แต่การระบุตัวตนของพวกเขามักจะทำให้เกิดความสับสน ซึ่งวัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้คือการตรวจสอบสถานะการจัดหมวดหมู่ของประชากรกุ้งในยุโรปโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด ซึ่งจะใช้ลำดับดีเอ็นเอของ

ยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ในการจำแนกประชากรของกุ้งในอเมริกาเหนือและกุ้งในยุโรป สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อบริเวณขาของกุ้งเครย์ฟิช และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ HCO2198 และ LCO 1490 ตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอพบว่ามีขนาด 658 bp วิเคราะห์ความสัมพันทางพันธุกรรมด้วยซอฟแวร์ MEGA 4.0 ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สามารถนำมาสนับสนุนลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนก *Orconectes juvenilis* จากประชากรในภาคตะวันออกฝรั่งเศส และกุ้งลายหินอ่อน (Marmorkrebs) ซึ่งเป็นสัตว์ที่สืบพันธุ์แบบ parthenogenetic ของชนิด *Procambarus fallax* ซึ่งเป็นกุ้งที่อยู่ในภาคตะวันตกเฉียงใต้ของเยอรมนี และผลของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์พบว่ากุ้ง *Procambarus* acutus จากเนเธอร์แลนด์ มีความคล้ายคลึงกับ *P. cf. acutus*. จากอเมริกา จากการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดพันธุ์ของสัตว์ต่างถิ่นกันมาก เป็นประโยชน์สำหรับนักวิชาการที่จะทำให้ได้ข้อมูลอย่างรวดเร็วและถูกต้องของกุ้งที่แปลกใหม่ในยุโรปและยังให้ข้อมูลเชิงลึกได้ ซึ่งผลจากการสร้างเดนโดรแกรมของประชากรกุ้งเครย์ฟิชได้ดังนี้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ 2.8 เดนโดรแกรมของประชากรกุ้งเครย์ฟิช ในการจำแนกประชากรของกุ้งในอเมริกาเหนือ และกุ้งในยุโรป

ที่มา: Filipova, L. *et al.* (2011)

Wong, L. L. *et al.* (2011) ได้ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากบริเวณยีน cytochrome oxidase I (COI) เพื่อการระบุชนิดของสัตว์น้ำ โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้มีศักยภาพสำหรับการระบุชนิดได้อย่างรวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำมาก โดยการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบนี้เพื่อระบุสายพันธุ์ของปลากลุ่ม catfish ที่เลี้ยงในประเทศ และกลุ่มที่นำเข้า ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างปลาทั้งหมด 9 ชนิด รวมทั้งพันธุ์ลูกผสมด้วย จากการเพิ่มปริมาณยีน COI โดยใช้ primer cocktails ชนิด C_FishF1t1 และ C_FishR1t1 ได้ลำดับดีเอ็นเอขนาด 651 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ พบว่าความสัมพันธ์ภายในกลุ่มชนิดเดียวกันมีค่าสูงถึง 98% โดยประมาณ นับว่าการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถใช้ในการระบุชนิดของปลาได้ดี เหมาะกับการใช้เพื่อการติดฉลากผลิตภัณฑ์ ในประเทศสหรัฐอเมริกา และควรมีการพัฒนาในปลาทุก ๆ ชนิด โดยเฉพาะปลาเศรษฐกิจ และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อื่น ๆ เพื่อให้เกิดความถูกต้อง และแม่นยำในการค้าระหว่างประเทศ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ข้อมูลและแหล่งที่มาของข้อมูล

รวบรวมข้อมูลการศึกษา จากเอกสารและงานวิจัยที่เผยแพร่ในฐานข้อมูลงานวิจัย และจากการสอบถามชาวบ้าน และชาวประมงในพื้นที่

3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

กุ้งเครย์ฟิชในฟาร์มของเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนในกลุ่มร้อยแก่นสารสินธุ์ (4 จังหวัด คือ ร้อยเอ็ด ขอนแก่น มหาสารคาม และกาฬสินธุ์)

3.3 เครื่องมือในการวิจัย

การสำรวจในภาคสนาม (field survey) หรือการลงมือปฏิบัติมีความสำคัญต่อการวิจัยเชิงคุณภาพทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง และแม่นยำ

3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

แบ่งขั้นตอนการดำเนินงานเป็น 3 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 สำรวจและศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกกุ้งเครย์ฟิชในฟาร์มของเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนในกลุ่มร้อยแก่นสารสินธุ์ (4 จังหวัด คือ ร้อยเอ็ด ขอนแก่น มหาสารคาม และกาฬสินธุ์)

สำรวจกุ้งเครย์ฟิชที่เลี้ยงในในฟาร์มของเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยได้รับความอนุเคราะห์ในด้านข้อมูลของกลุ่มเกษตรตกรผู้เลี้ยงกุ้งเครย์ฟิชในภาคอีสานจากศูนย์บริการวิชาการแก่ชุมชน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซึ่งเป็นภาคส่วนที่ส่งเสริม และจัดตั้งสหกรณ์การเลี้ยงกุ้งเครย์ฟิชในจังหวัดนครนายก

นำกุ้งเครย์ฟิชที่สำรวจได้ มาศึกษาความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก โดย

- ศึกษาองค์ประกอบส่วนหัว ส่วนกลาง ส่วนท้อง
- ลักษณะของก้าม
- ลักษณะสี
- ลักษณะเปลือกหุ้มด้านนอก

การรักษาตัวอย่างกุ้งเครย์ฟิช ในน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 10% โดยอัตราส่วนน้ำยา 1 ส่วนต่อน้ำ 3 ส่วน แล้วจึงนำมาดองในน้ำยาแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% เพื่อนำไปศึกษาในห้องปฏิบัติการ

การวิเคราะห์คุณภาพอาหาร

วิเคราะห์โปรตีนส่วนผสมของอาหารเม็ดสำเร็จรูปดัดแปลงที่มีส่วนผสมจากวัตถุดิบธรรมชาติ ตามวิธีการของเจล ดาห์ล (Kjeldahl method) เป็นการวิเคราะห์โปรตีนในอาหาร โดยการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลักคือ

1. การย่อยตัวอย่าง (Digestion) ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น ไนโตรเจนในตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูงโดยมีสารเร่งปฏิกิริยา เช่น $CuSO_4$, Se, $HgSO_4$, HgO หรือ $FeSO_4$

2. การกลั่นแอมโมเนีย (Distillation) โดยใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ มาทำปฏิกิริยากับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ได้จากการย่อยตัวอย่างแล้ว จะได้ก๊าซแอมโมเนีย ซึ่งจับก๊าซนี้ได้ด้วยสารละลายบอริค

3. การไตเตรตเพื่อหาปริมาณไนโตรเจน (Titration) เป็นการนำสารละลายกรดบอริคซึ่งจับก๊าซแอมโมเนียไว้ มาไตเตรต กับสารละลายมาตรฐานกรดเกลือ (Hydrochloric acid; HCl)

4. การคำนวณ นำปริมาณสารละลายมาตรฐานกรดเกลือ ที่ใช้ในการไตเตรต ไปคำนวณ หาปริมาณไนโตรเจน แล้วคูณกับ Kjeldahl factor ซึ่งค่าเฉลี่ยของไนโตรเจนในโปรตีนอยู่ที่ร้อยละ 16 ได้เป็นค่าโปรตีนหยาบ (crude protein; CP)

การวิเคราะห์คุณภาพของกุ้งก้ามแดง

จะวิเคราะห์จากรูปร่างปกติและมีอวัยวะครบ (ยกเว้นหนวดกุ้ง) มีสีตามธรรมชาติของกุ้ง ส่วนหัวติดแน่นกับส่วนลำตัว เปลือกแข็ง เป็นเงามันตามธรรมชาติ เนื้อติดแน่นกับเปลือกเนื้อแน่น ค่อนข้างใสและไม่ขุ่นขาว ตามมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 7019-2556

สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลกาฬสินธุ์ RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY KALASIN

ขั้นตอนที่ 2 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ และสร้างเครื่องหมายทางพันธุกรรม

1. สกัดดีเอ็นเอ (DNA)

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ ด้วยชุดสารสกัด Genomic DNA extraction kit (RBC Bioscience) ตามขั้นตอนการสกัดที่ระบุไว้ในคู่มือของชุดสารสกัด ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังนี้

ขั้นตอนการการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้งโดยชุดสารสกัด Genomic DNA extraction kit

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อกุ้งให้ได้ 20 มิลลิกรัม ลงในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GT buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด

2. เติม proteinase k ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 30 นาที ระหว่างที่บ่มให้กลับหลอดไปมาทุก 5 นาที

3. เติม GB buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันประมาณ 5 วินาที เพื่อให้ตัวอย่างผสมกัน นำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 20 นาที และกลับหลอดทุก 5 นาที

4. ในขั้นตอนนี้นำ Elution buffer (200 ไมโครลิตร ต่อตัวอย่าง) อุ่นในอ่างน้ำร้อน 70 องศาเซลเซียล

5. เมื่อครบเวลาแล้วนำสารละลายในหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วแยกสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่

6. หลังจากบ่มที่ 70 องศาแล้วเติม RNaseA ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

7. เติม Ethanol 200 ไมโครลิตร ลงในหลอด vortex ประมาณ 10 วินาที จะปรากฏเส้นสายขึ้น

8. ย้ายสารละลายใส่ในหลอด GD column (วาง GD column ลงในหลอด collection tube) ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งสารละลายที่ได้

9. เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน GD column และปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 วินาทีทิ้งสารละลายในหลอด collection tube

10. เติม Wash buffer (ที่เติม ethanol แล้ว) ปริมาณ 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm 30 วินาที

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
RAJAPHAT PHANOMRUAM UNIVERSITY

11. เทสารละลายทิ้ง และย้ายหลอดไปที่ collection tube ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm 3 นาที (ปกติจะเติม 100 ไมโครลิตร ถ้าต้องการความเข้มข้นของ DNA มาก เติม 15-50 ไมโครลิตร)

12. เปลี่ยนหลอด GD column วางในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตรเติม Elution buffer ที่อุ่นไว้แล้ว ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ปล่อยทิ้งไว้ 2 นาที

13. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm 30 วินาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

14. เก็บหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตรในข้อ 13 ที่มีสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) และตรวจคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้

2. ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส (agarose gel electrophoresis)

การสกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดดีเอ็นเอ และตรวจคุณภาพดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร และ หาอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรกับ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอและตรวจคุณภาพ และทำอิเล็กโตรโฟเรซิส เพื่อศึกษาด้านคุณภาพ ได้แก่ ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และปริมาณ ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 % ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปถ่ายภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งสามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอโดยประมาณได้

3. การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของกุ้งเครย์ฟิช

การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนของกุ้งเครย์ฟิชแต่ละชนิด ไปสกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดดีเอ็นเอ และตรวจคุณภาพดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร และ หาอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรกับ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอและตรวจคุณภาพ และทำอิเล็กโตรโฟเรซิสเพื่อศึกษาด้านคุณภาพ ได้แก่ ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และปริมาณ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากบริเวณจีนที่ต้องการ บริเวณที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 1 บริเวณ คือ บริเวณยีน COI เพื่อนำไปสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

ตารางแสดงที่ 3.1 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส
เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

ส่วนประกอบของสารละลาย	ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา	ปริมาตร (µl)
1. DNA template	10 ng	5
2. Primer F (50 µM)	0.25 µM	0.125
3. Primer R (50 µM)	0.25 µM	0.125
4. Master mix (2x)	1.0 x	12.5
5. น้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออน (Deionized water)	-	7.25
ปริมาตรรวม	-	25

ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในการทำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

ใช้เครื่อง Thermal cycle รุ่น G-Strom ซึ่งการทำงานประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Hit lid ที่ 110 °C

ขั้นตอนที่ 2 เพิ่มรอบ 35 รอบ ประกอบด้วย

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที

Annealing ที่อุณภูมิ 53 °C เป็นเวลา 40 วินาที

Elongation ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 40 วินาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 store ที่ 10 °C เป็นเวลา 15 นาที หรือจนกว่าจะนำผลิตภัตณ์พีซีอาร์ออกจากเครื่อง

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งเคยร์ฟิชแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชั่น 5 (Tamura *et al*., 2011) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกุ้งเคยร์ฟิชแต่ละชนิดและส่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งเคยร์ฟิชแต่ละชนิดที่ได้ทั้งหมดไปเก็บไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อขอรับรหัสของแต่ละลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank accession number)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ขั้นตอนที่ 3. การส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากพันธุ์กุ้งเครย์ฟิชในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในกลุ่มร้อยแก่นสารสินธุ์ (4 จังหวัด คือ ร้อยเอ็ด ขอนแก่น มหาสารคาม และกาฬสินธุ์)

- จัดประชุม เสวนา ร่วมกับกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
- ถอดบทเรียน เพื่อหาแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์กุ้งเครย์ฟิช
- ประเมินความพึงพอใจในการดำเนินกิจกรรม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 4
ผลการศึกษา

กุ้งก้ามแดง หรือกุ้งล๊อบสเตอร์น้ำจืด มีชื่อสามัญว่า Redclaw Crayfish (*Cherax quadricarinatus*) ลักษณะสำคัญคือ มีก้ามขนาดใหญ่ ก้ามเรียบไม่มีหนาม เพศผู้มีแถบสีแดงที่ปลายก้ามด้านนอก กุ้งชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดในทวีปออสเตรเลีย มีการแพร่กระจายไปทางตอนเหนือของรัฐควีนส์แลนด์ (Austin *et al*., 2009) อีกทั้งยังแพร่กระจายไปยังประเทศต่างๆ เช่น แอฟริกาใต้ จาไมกา และสิงคโปร์ (Shane and Yeo, 2007) ประเทศไทยได้นำเข้ากุ้งชนิดนี้มาตั้งแต่ปี 2548 เพื่อทดลองเพาะเลี้ยงสำหรับการบริโภค ด้วยลักษณะรูปร่างที่มีสีสันสวยงาม จึงมีการนำเอากุ้งชนิดนี้มาเลี้ยงในตู้ปลา และยังคงได้รับความนิยมอยู่อย่างต่อเนื่อง เพราะเลี้ยงง่ายสามารถเลี้ยงในบ่อดิน บ่อปูน อ่างน้ำกะละมัง หรือแม้กระทั่งในนาข้าวก็สามารถเลี้ยงได้

4.1 ข้อมูลการเลี้ยงกุ้งก้ามแดง

ทำการสำรวจกลุ่มเกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งก้ามแดงเป็นอาชีพหลัก และเสริมเชิงพานิชย์ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเน้นพื้นที่ในกลุ่มจังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม ร้อยเอ็ด และอุดรธานี ดังนี้

4.1.1 ข้อมูลการเลี้ยงกุ้งก้ามแดงของสหกรณ์การเกษตรเขื่อนพระปรง จังหวัดสระแก้ว

ตั้งอยู่ที่ ต.ช่องกุ่ม อ.วัฒนานคร จ.สระแก้ว รูปแบบการเลี้ยง เป็นบ่อปูน 2X3เมตร/บ่อ จำนวนพื้นที่ 1ไร่ บริเวณบ้าน และบ่อดิน นาข้าว 10 ไร่ พื้นที่เลี้ยงกุ้งขุนเป็นกุ้งเนื้อ บ่อดิน ประมาณ 20 ไร่ อาหารที่ใช้เลี้ยง อาหารสำเร็จรูป และพืชน้ำ สาหร่ายชนิดต่างๆ กล้วยน้ำว้า ผลไม้ชนิดอื่นๆ ข้าวเปลือกงอก

สายพันธุ์กุ้งเริ่มแรกการเลี้ยง ได้มาจากโครงการหลวงดอยอินทนนท์ จ.เชียงใหม่ และสายพันธุ์นำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย ประสบการณ์การเลี้ยง 10-13 ปี

สภาพการเลี้ยง เพาะขยายพันธุ์ในโรงเรือนบ่อปูนโดยใช้พ่อพันธุ์ 2 ตัว ต่อ แม่พันธุ์ 5 ตัว พื้นที่/จำนวนกุ้ง 10 ตัว/1 ตรม. จำนวนพ่อ-แม่พันธุ์และลูกกุ้งทุกขนาด ประมาณ 30,000-60,000 ตัว

ราคากุ้งเนื้อเพื่อบริโภค กุ้งก้ามแดง กก.ละ 250-600 บาท

ภาพที่ 4.1 สถานที่เลี้ยงกุ้งก้ามแดงของสหกรณ์การเกษตรเขื่อนพระปรง จังหวัดสระแก้ว

4.1.2. ข้อมูลการเลี้ยงกุ้งก้ามแดงของเกษตรกร ชายณรงค์เครย์ฟิชฟาร์ม จ.มหาสารคาม (3 ปี)

ตั้งอยู่ที่ อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม รูปแบบการเลี้ยง เป็นบ่อปูน 100 ตรว. บริเวณบ้านและบ่อดิน นาข้าว พื้นที่เลี้ยงกุ้งขุนเป็นกุ้งเนื้อ บ่อดิน ประมาณ 3 ไร่ อาหารที่ใช้เลี้ยง อาหารสำเร็จรูป และพืชน้ำ สาหร่ายชนิดต่างๆ กล้วยน้ำว้า ผลไม้ชนิดอื่นๆ

สายพันธุ์กุ้งเริ่มแรกการเลี้ยง ได้มาจากสหกรณ์การเกษตรเขื่อนพระปรง อ.วัฒนานคร จ. สระแก้ว

สภาพการเลี้ยง เพาะขยายพันธุ์ในบ่อฟิวเจอร์บอร์ด บ่อปูนโดยใช้พ่อพันธุ์ 2 ตัว ต่อ แม่พันธุ์ 5 ตัว พื้นที่/จำนวนกุ้ง 10 ตัว/1 ตรม. จำนวนพ่อ-แม่พันธุ์และลูกกุ้งทุกขนาด ประมาณ 1,000 -2,000 ตัว

ราคากุ้งเนื้อเพื่อบริโภค กุ้งก้ามแดง กก.ละ300-450 บาท

ภาพที่ 4.2 สถานที่เลี้ยงกุ้งก้ามแดงของชายณรงค์เครย์ฟิชฟาร์ม จ.มหาสารคาม

4.1.3. ข้อมูลการเลี้ยงกุ้งก้ามแดงของเกษตรกร ตู่เครย์ฟิชฟาร์ม จังหวัดอุดรธานี (3 ปี)

ตั้งอยู่ที่ ต.หนองหาน อ.หนองหาน จ.อุดรธานี รูปแบบการเลี้ยง ขนาดพื้นที่บ่อฟิวเจอร์บอร์ด 20 ตรว. บริเวณบ้าน เลี้ยงกุ้ง พื้นที่ขุนเป็นกุ้งเนื้อ บ่อดิน ประมาณ 1 ไร่ อาหารที่ใช้เลี้ยง อาหารสำเร็จรูป และพืชน้ำ สาหร่ายชนิดต่างๆ

สายพันธุ์กุ้งเริ่มแรกการเลี้ยง ได้มาจากสหกรณ์การเกษตรเขื่อนพระปรง อ.วัฒนานคร จ.สระแก้ว

สภาพการเลี้ยง เพาะขยายพันธุ์ในบ่อฟิวเจอร์บอร์ด โดยใช้พ่อพันธุ์ 1 ตัว ต่อ แม่พันธุ์ 3 ตัว พื้นที่/จำนวนกุ้ง 5 ตัว/1 ตรม. จำนวนพ่อ-แม่พันธุ์และลูกกุ้งทุกขนาด ประมาณ 300-500 ตัว

ราคากุ้งเนื้อเพื่อบริโภค กุ้งก้ามแดง กก.ละ300-450 บาท

ภาพที่ 4.3 สถานที่เลี้ยงกุ้งก้ามแดงของตู่เครย์ฟิชฟาร์ม จังหวัดอุดรธานี

4.1.4. ข้อมูลการเลี้ยงกุ้งก้ามแดงของเกษตรกร เต๋าเคร์ยฟิชฟาร์ม จังหวัดขอนแก่น (3 ปี)

ตั้งอยู่ที่ ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น รูปแบบการเลี้ยงเป็นพื้นที่บ่อปูน 2X3เมตร/บ่อ จำนวนพื้นที่ 1งาน บริเวณที่นา และบ่อดิน นาข้าว 2ไร่ พื้นที่เลี้ยงกุ้งขุนเป็นกุ้งเนื้อ บ่อดิน ประมาณ 2 ไร่ อาหารที่ใช้เลี้ยง อาหารสำเร็จรูป และพืชน้ำ สาหร่ายชนิดต่างๆ กล้วยน้ำว้า

สายพันธุ์กุ้งเริ่มแรกการเลี้ยง ได้มาจากสหกรณ์การเกษตรเขื่อนพระปรง จ.สระแก้ว **สภาพการเลี้ยง** เพาะขยายพันธุ์ในโรงเรือนบ่อปูนโดยใช้พ่อพันธุ์ 2 ตัว ต่อ แม่พันธุ์ 5 ตัว พื้นที่/จำนวนกุ้ง 10 ตัว/1 ตรม. จำนวนพ่อ-แม่พันธุ์และลูกกุ้งทุกขนาด ประมาณ 500-2,000 ตัว **ราคากุ้งเนื้อเพื่อบริโภค** กุ้งก้ามแดง กก.ละ300-450 บาท

ภาพที่ 4.4 สถานที่เลี้ยงกุ้งก้ามแดงของเต๋าเคร์ยฟิชฟาร์ม จังหวัดขอนแก่น

4.1.5. ข้อมูลการเลี้ยงกุ้งก้ามแดงของเกษตรกร คุณพรชัยฟาร์มกุ้งก้ามแดงร้อยเอ็ด จังหวัดร้อยเอ็ด (5 ปี)

ตั้งอยู่ที่ ต.ขี้เหล็ก อ.อาจสามารถ จ.ร้อยเอ็ด รูปแบบการเลี้ยงเป็นพื้นที่บ่อปูน 2X3 เมตร/บ่อ จำนวนพื้นที่ 1 ไร่ บริเวณบ้าน และบ่อดิน นาข้าว 20 ไร่ พื้นที่เลี้ยงกุ้งขุนเป็นกุ้งเนื้อ บ่อดิน ประมาณ 20-30 ไร่ อาหารที่ใช้เลี้ยง อาหารสำเร็จรูป และพืชน้ำ สาหร่ายชนิดต่างๆ กล้วยน้ำว้า

สายพันธุ์กุ้งเริ่มแรกการเลี้ยง ได้มาจากสหกรณ์การเกษตรเขื่อนพระปรง จ.สระแก้ว

สภาพการเลี้ยง เพาะขยายพันธุ์ในโรงเรือนบ่อปูนโดยใช้พ่อพันธุ์ 2 ตัว ต่อ แม่พันธุ์ 5 ตัว พื้นที่/จำนวนกุ้ง 10 ตัว/1 ตรม. จำนวนพ่อ-แม่พันธุ์และลูกกุ้งทุกขนาด ประมาณ 30,000-50,000 ตัว

ราคากุ้งเนื้อเพื่อบริโภค กุ้งก้ามแดง กก.ละ 300-600 บาท

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.5 สถานที่เลี้ยงกุ้งก้ามแดงของคุณพรชัยฟาร์มกุ้งก้ามแดงร้อยเอ็ด จังหวัดร้อยเอ็ด

4.2 การศึกษาลักษณะภายนอกของกุ้งก้ามแดง

การจัดลำดับอนุกรมวิธานของกุ้งก้ามแดง

วงศ์ Parastacidae

สกุล *Cherax*

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cherax quadricarinatus*

ชื่อสามัญ Redclaw, Rainbow Crayfish, Blue Lobster.

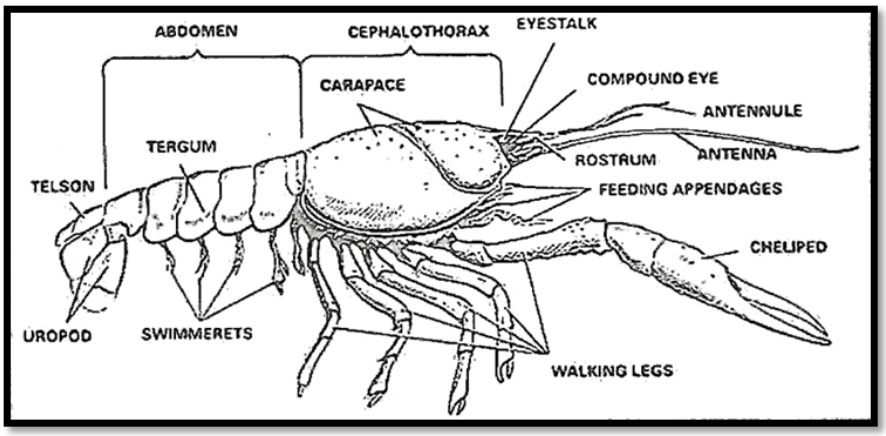
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กุ้งก้ามแดงสายพันธุ์ซีแรกซ์ (Cherax) มีก้ามขนาดใหญ่ เรียบไม่มีหนาม เพศผู้มีแถบสีแดงที่ปลายก้ามด้านนอก ร่างกายของกุ้งแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยมีส่วนหัวรวมกับส่วนอก เรียกว่า เซฟาโลทอแรกซ์ (cephalothorax) มีจำนวนปล้อง 13 ปล้อง และส่วนท้องมีจำนวนปล้อง 6 ปล้อง ระยางค์ของลำตัวประกอบด้วย

- ระยางค์ส่วนหัว มี 5 คู่ คือ หนวด 2 คู่ (antenna & antennule) ขากรรไกรล่าง (mandible) 1 คู่ มีลักษณะเป็นฟันบดแข็ง ขากรรไกรบน (maxilla) 2 คู่ ทำหน้าที่ช่วยจับอาหารเข้าปาก

- ระยางค์ส่วนอกมี 8 คู่ คือ ระยางค์ที่ใช้ในการกิน (maxilliped) ขนาดเล็ก 3 คู่ ขาเดิน 5 คู่ ขาเดินคู่แรกเปลี่ยนเป็นก้ามหนีบ (cheliped) ใช้จับเหยื่อ

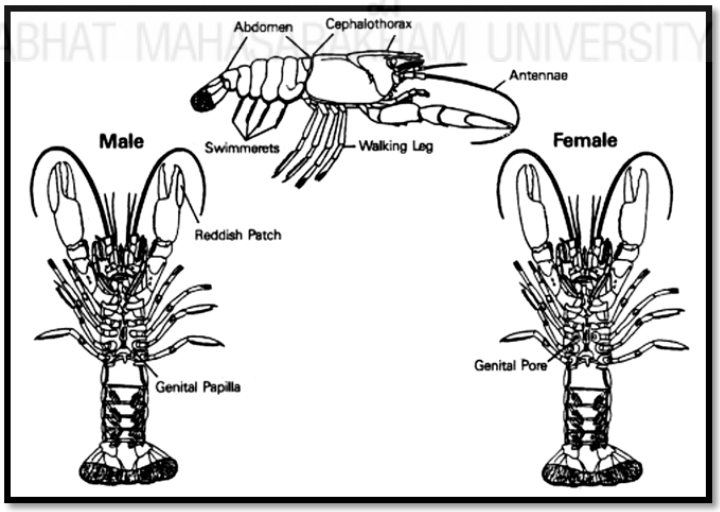
- ระยางค์ส่วนท้อง มี 6 คู่ คือ ขาว่ายน้ำ (pleopod หรือ swimmeret) 5 คู่ ใช้ว่ายน้ำ คู่สุดท้ายเป็นแพนหาง (uropod)



ภาพที่ 4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกุ้งก้ามแดง
ที่มา : (สุธิพงศ์ ถิ่นเขาน้อย, 2558)

การจำแนกเพศ สามารถทำได้โดยจับกุ้งหงายท้องแล้วสังเกตอวัยวะสืบพันธุ์ที่ เรียกว่า gonopods ที่ช่วงขาเดิน โดยกุ้งตัวผู้มีอวัยวะคล้ายตะขอบริเวณขาเดินคู่ที่2 และ 3 ซึ่งตะขอนี้มันจะเอาไว้เกี่ยวเกาะตัวเมียตอนผสมพันธุ์ สังเกตที่บริเวณขาเดิน ถ้าเป็นเพศผู้จะมีอวัยวะสืบพันธุ์ (papillae) บริเวณขาเดินคู่สุดท้าย (คู่ที่ 4) ส่วนเพศเมียจะมีอวัยวะสืบพันธุ์(annulus ventralis) เป็นแผ่นทรงวงรีสีขาวๆ ขนาดประมาณ1-2 มิลลิเมตร บริเวณขาเดินคู่ที่ 3 นอกจากนี้บริเวณขาว่ายน้ำคู่แรกและคู่ที่ 2 ของตัวผู้จะถูกพัฒนาขึ้นเป็นแขน เล็กๆสองข้าง (petasma) มีไว้สำหรับส่งผ่านถุงน้ำเชื้อไปยังตัวเมีย

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

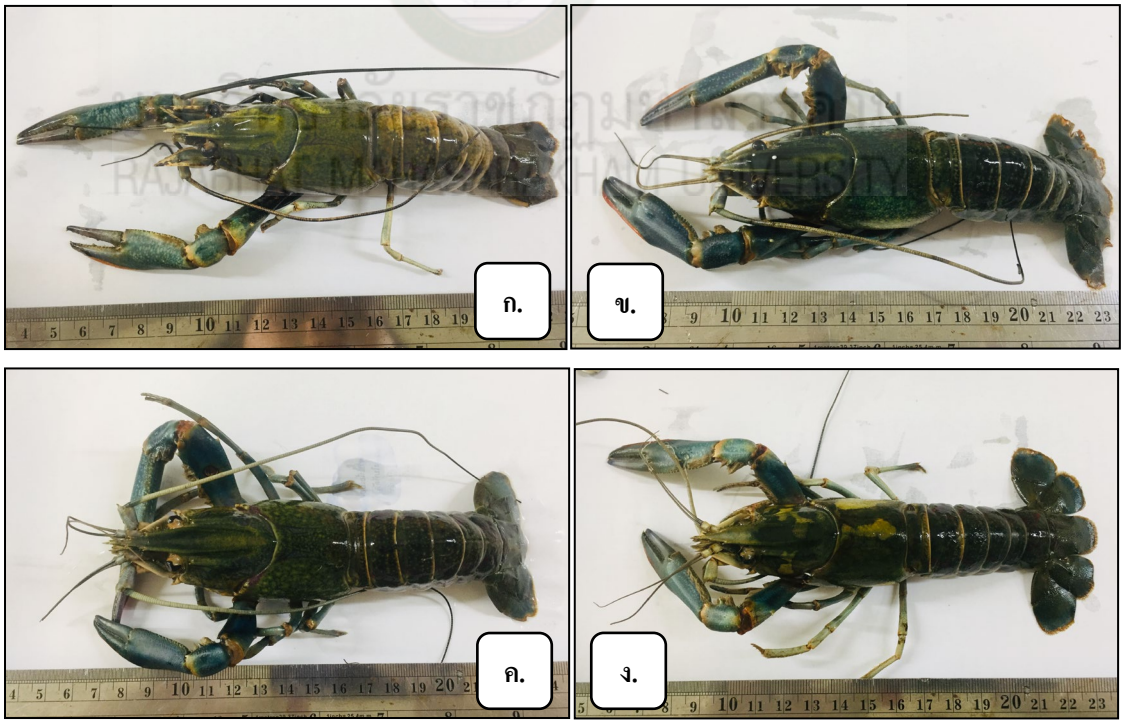


ภาพที่ 4.7 การจำแนกเพศของกุ้งก้ามแดง
ที่มา : (Michael Masser, 1997)

กุ้งก้ามแดงจากฟาร์มเกษตรกรกลุ่มตัวอย่างที่พบในจังหวัดอุดรธานี ขอนแก่น มหาสารคาม และจังหวัดร้อยเอ็ด มีรูปร่างปกติและมีอวัยวะครบ มีสีน้ำตาลอมเขียวตามธรรมชาติของกุ้ง ส่วนหัวติดแน่นกับส่วนลำตัว เปลือกแข็งเป็นเงามันตามธรรมชาติ เนื้อติดแน่นกับเปลือก เนื้อแน่น ค่อนข้างใส สะอาด ไม่มีตำหนิที่เห็นได้ชัดเจน เช่นแผลตามลำตัว หรือความพิการ ปราศจากปรสิตหรือร่องรอยที่เกิดจากการติดเชื้อหรือเป็นโรคเมื่อตรวจสอบด้วยตา ปราศจากกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ ตามมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 7019-2556

4.2.1 รูปร่างและลักษณะภายนอกของกุ้งก้ามแดง

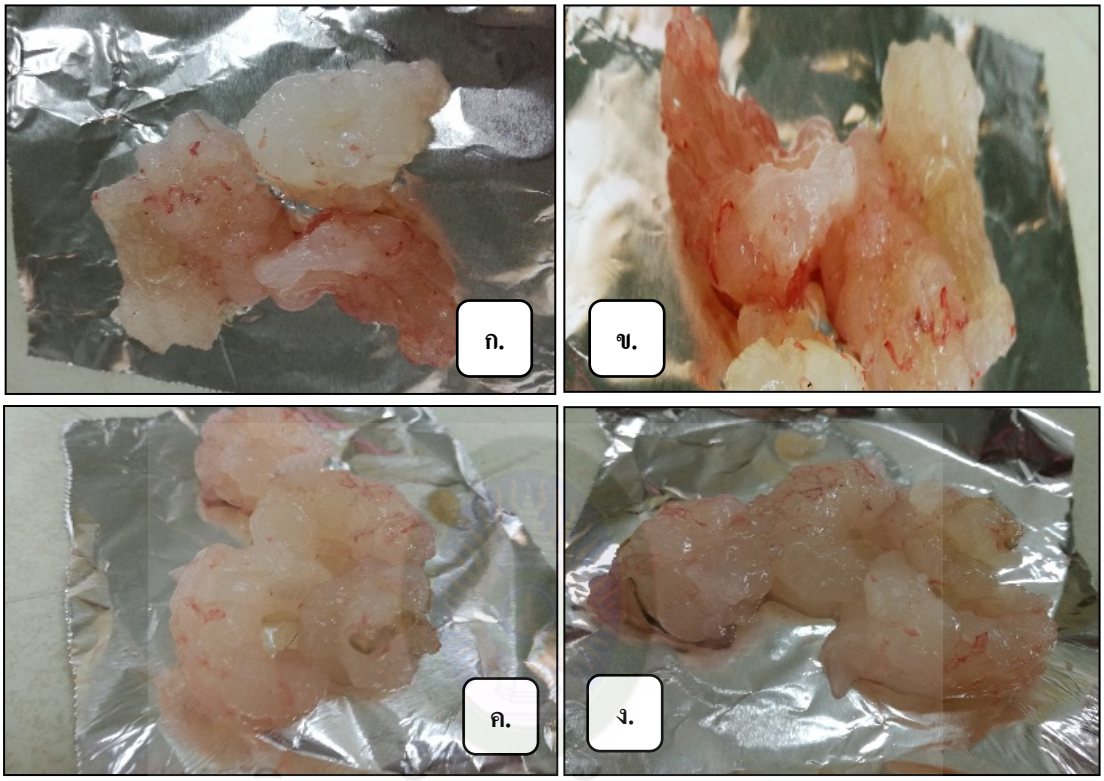
เมื่อนำมาศึกษารูปร่างและลักษณะภายนอกของกุ้งก้ามแดง พบว่าจากการวิเคราะห์กุ้งก้ามแดงที่นำมาจากฟาร์มต่างๆ มีลักษณะภายนอกที่สมบูรณ์ คือ กุ้งก้ามแดงมีรูปร่างปกติและมีอวัยวะครบ มีสีน้ำตาลอมเขียวตามธรรมชาติของกุ้ง ส่วนหัวติดแน่นกับส่วนลำตัว เปลือกแข็งเป็นเงามันตามธรรมชาติ เนื้อติดแน่นกับเปลือก เนื้อแน่น ค่อนข้างใส สะอาด ไม่มีตำหนิที่เห็นได้ชัดเจน เช่นแผลตามลำตัว หรือความพิการ ปราศจากปรสิตหรือร่องรอยที่เกิดจากการติดเชื้อหรือเป็นโรคเมื่อตรวจสอบด้วยตา (ภาพที่ 4.8) ปราศจากกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ ตามมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 7019-2556 และเมื่อพิจารณาสีของเนื้อกุ้ง มีสีชมพูใส (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.8 ก. กุ้งก้ามแดงของตู่เครย์ฟิชฟาร์ม จังหวัดอุดรธานี
ข. กุ้งก้ามแดงของชายณรงค์เครย์ฟิชฟาร์ม จ.มหาสารคาม

ค. กุ้งก้ามแดงของเต๋าเคร์ยฟิชฟาร์ม จังหวัดขอนแก่น

ง. กุ้งก้ามแดงของพรชัยฟาร์มกุ้งก้ามแดงร้อยเอ็ด



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.9 ก. เนื้อกุ้งก้ามแดงของตู่เคร์ยฟิชฟาร์ม จังหวัดอุดรธานี

ข. เนื้อกุ้งก้ามแดงของชายณรงค์เคร์ยฟิชฟาร์ม จ.มหาสารคาม

ค. เนื้อกุ้งก้ามแดงของเต๋าเคร์ยฟิชฟาร์ม จังหวัดขอนแก่น

ง. เนื้อกุ้งก้ามแดงของพรชัยฟาร์มกุ้งก้ามแดงร้อยเอ็ด

4.2.2 คุณภาพของอาหารและเนื้อกุ้งก้ามแดง

ทำการศึกษาปริมาณโปรตีนในเนื้อกุ้ง โดยวิธีการของ Kjeldahl method (Thiex and Manson, 2002;Thiex *et al*., 2002)) โดยศึกษาปริมาณโปรตีนทั้งในเนื้อกุ้งสด และในเนื้อกุ้งแห้ง (นำเนื้อกุ้งสดไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) เพื่อทำให้ปราศจากความชื้น ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน พบว่า มีปริมาณโปรตีนในเนื้อกุ้งดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์โปรตีนในเนื้อกุ้งก้ามแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง ตามวิธีการของ Kjeldahl method.

ชุดการทดลอง	ปริมาณโปรตีนของน้ำหนักสด (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณโปรตีนของน้ำหนักแห้ง (เปอร์เซ็นต์)
UD	17.44[a]	27.75[a]
MSK	17.77[a]	27.63 [a]
KK	17.47[a]	27.00 [a]
ROI	17.19[a]	27.00 [a]

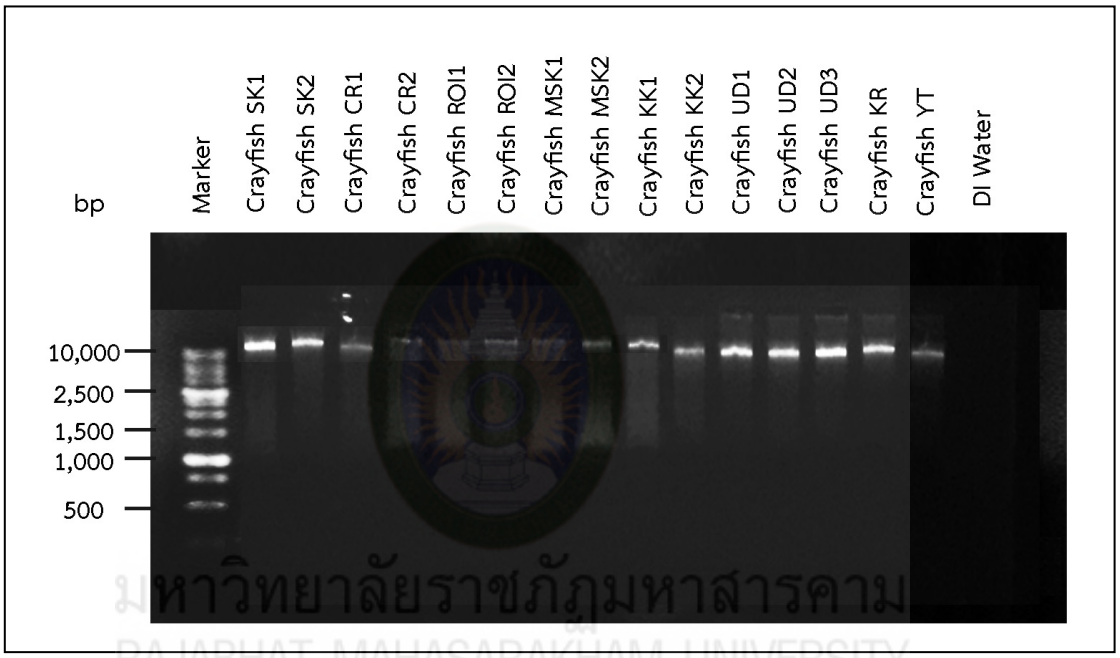
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษร [a,b,c] และ [d] ในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ DMRT ($p<0.05$)

หมายเหตุ: UD. เนื้อกุ้งก้ามแดงของตู่เคร์ย์ฟิชฟาร์ม จังหวัดอุดรธานี
MSK. เนื้อกุ้งก้ามแดงของชายณรงค์เคร์ย์ฟิชฟาร์ม จ.มหาสารคาม
KK. เนื้อกุ้งก้ามแดงของเต่าเคร์ยฟิชฟาร์ม จังหวัดขอนแก่น
ROI. เนื้อกุ้งก้ามแดงของพรชัยฟาร์มกุ้งก้ามแดงร้อยเอ็ด

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

4.3 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โคด

จากการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อของกุ้ง Crayfish 15 ตัวอย่าง ด้วยชุดสารสกัด Genomic DNA extraction kit (RBC Bioscience) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 0.8 % ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต พบว่า มีดีเอ็นเอ 15 ตัวอย่างที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี ขนาดมากกว่า 10,000 bp ที่สามารถนำไปเพิ่มปริมาณได้ ดังภาพที่ 4.10



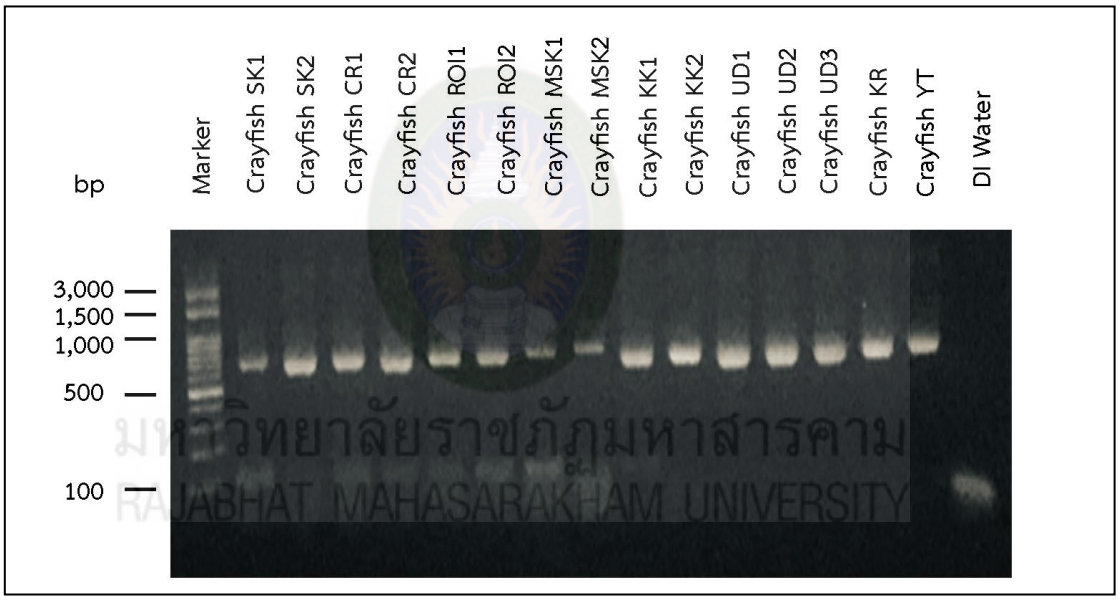
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.10 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอกุ้ง Crayfish 15 ตัวอย่าง

หมายเหตุ: SK กุ้งก้ามแดง จังหวัดสระแก้ว
CR กุ้งก้ามแดง จังหวัดเชียงราย
ROI. กุ้งก้ามแดง จังหวัดร้อยเอ็ด
MSK. กุ้งก้ามแดง จังหวัดมหาสารคาม
KK. กุ้งก้ามแดง จังหวัดขอนแก่น
UD. กุ้งก้ามแดง จังหวัดอุดรธานี
KR. กุ้งก้ามแดง จังหวัดนครราชสีมา
YT. กุ้งก้ามแดง จังหวัดยโสธร

การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โคด

จากการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอย่าง พบว่ามีดีเอ็นเอของกุ้ง Crayfish 15 ตัวอย่าง ที่สามารถนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยยีน Cytochrome C oxidase I (COI) ของไมโทคอนเดรีย ด้วยไพรเมอร์ที่มีลักษณะเป็น universal primers ที่จำเพาะต่อยีน COI (COI-C03 -5’ ACYTCYGGRTGACCAARAAYCA 3’ - COI-C01 -5’ TYTCWACWAAY CAYAAAGAYATTGG 3’) ในปฏิกิริยา PCR หลังจากเพิ่มปริมาณแล้วตรวจสอบคุณภาพของชิ้นส่วนดีเอ็นเอพบว่าขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 15 ตัวอย่าง พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700-800 คู่เบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของตัวอย่างในฐานข้อมูล Genebank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูลมากกว่า 70% ดังตารางที่ 4.2

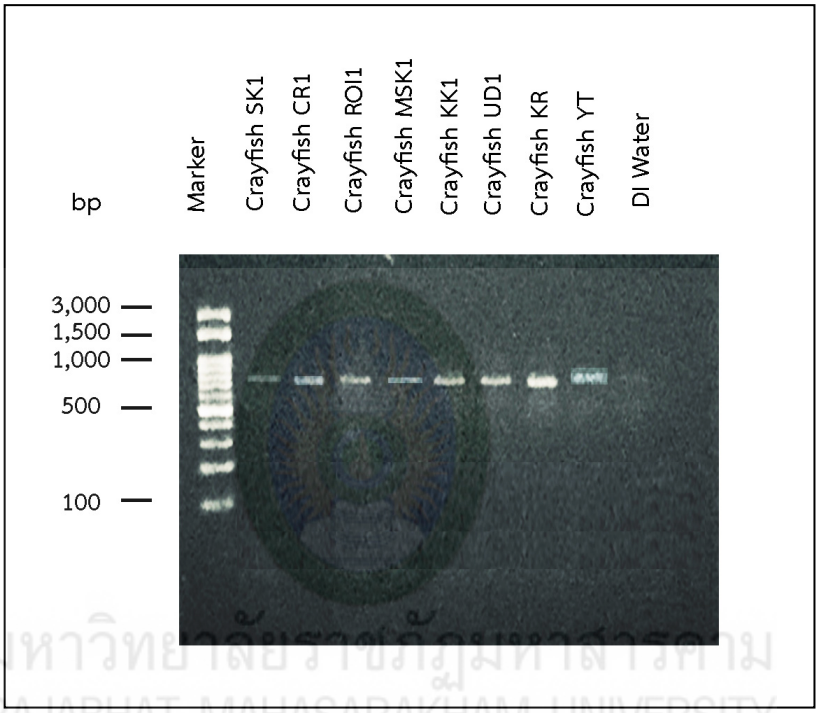


มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.11 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกุ้ง Crayfish 15 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ของยีนบริเวณ COI (COI-C03 ,COI-C01)

หมายเหตุ: SK. กุ้งก้ามแดง จังหวัดสระแก้ว
CR. กุ้งก้ามแดง จังหวัดgเชียงราย
ROI. กุ้งก้ามแดง จังหวัดร้อยเอ็ด
MSK. กุ้งก้ามแดง จังหวัดมหาสารคาม
KK. กุ้งก้ามแดง จังหวัดขอนแก่น
UD. กุ้งก้ามแดง จังหวัดอุดรธานี
KR. กุ้งก้ามแดง จังหวัดนครราชสีมา
YT. กุ้งก้ามแดง จังหวัดยโสธร

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *COI* โดยใช้ไพรเมอร์ Chmr4-C03 -5’ ACYTCRGGRTGRCCRAARAATCA 3’- Chmf4 -5’ TYTCWACWAAYCAYAAAGAYATCGG 3’-) เพื่อใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของกุ้ง Crayfish ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดความยาวแตกต่างกัน ตั้งแต่ 1,000 ถึง 1,600 คู่เบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของตัวอย่างในฐานข้อมูล Genebank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูลมากกว่า 70% ดังตารางที่ 4.2



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.12 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกุ้ง Crayfish 8 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ของยีนบริเวณ COI (Chmr4, Chmf4)

หมายเหตุ: SK. กุ้งก้ามแดง จังหวัดสระแก้ว
CR. กุ้งก้ามแดง จังหวัดเชียงราย
ROI. กุ้งก้ามแดง จังหวัดร้อยเอ็ด
MSK. กุ้งก้ามแดง จังหวัดมหาสารคาม
KK. กุ้งก้ามแดง จังหวัดขอนแก่น
UD. กุ้งก้ามแดง จังหวัดอุดรธานี
KR. กุ้งก้ามแดง จังหวัดนครราชสีมา
YT. กุ้งก้ามแดง จังหวัดยโสธร

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของตัวอย่าง บนฐานข้อมูล Genebank

Species Sequence	Length	Identities	Description	start	End	Alignment match Score	Accession N.
Crayfish SK1_COI-CO1	695	531/656 **(81%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	31	674	503 bits (272)	KX377348.1
Crayfish SK2_COI-CO1	686	520/642 **(81%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	45	682	501 bits (271)	KX377348.1
Crayfish CR1_COI-CO1	689	576/643 **(90%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CQHU cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	7	664	808 bits (437)	KY745779.1
Crayfish CR2_COI-CO1	686	607/640 **(95%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS03 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	46	683	994 bits (538)	KX377347.1

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของตัวอย่าง บนฐานข้อมูล Genebank (ต่อ)

Species Sequence	Length	Identities	Description	start	End	Alignment match Score	Accession N.
Crayfish ROI1_COI-CO1	689	523/646 **(81%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	39	680	505 bits (273)	KX377348.1
Crayfish ROI2_COI-CO1	691	541/677 **(80%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	19	679	468 bits (253)	KX377348.1
Crayfish MSK1_COI-CO1	685	368/404 **(91%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS02 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	45	442	542 bits (293)	KX377346.1
Crayfish MSK2_COI-CO1	740	464/532 **(87%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	45	566	597 bits (323)	KX377348.1

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของตัวอย่าง บนฐานข้อมูล Genebank (ต่อ)

Species Sequence	Length	Identities	Description	start	End	Alignment match Score	Accession N.
Crayfish KK1_COI-CO1	685	496/647 **(77%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	45	676	329 bits (178)	KX377348.1
Crayfish KK2_COI-CO1	797	442/484 **(91%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS02 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	23	479	636 bits (344)	KX377346.1
Crayfish UD1_COI-CO1	693	559/656 **(85%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS02 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	26	674	664 bits (359)	KX377346.1
Crayfish UD2_COI-CO1	739	614/676 **(91%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	39	680	874 bits (473)	KX377348.1

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของตัวอย่าง บนฐานข้อมูล Genebank (ต่อ)

Species Sequence	Length	Identities	Description	start	End	Alignment match Score	Accession N.
Crayfish UD3_COI-CO1	884	516/622 **(83%)**	*Cherax quadricarinatus* mitochondrion, complete genome	67	671	545 bits (295)	KF649850.1
Crayfish KR1_COI-CO1	833	641/659 **(97%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	31	680	1109 bits (600)	KX377348.1
Crayfish YT1_COI-CO1	734	571/665 **(86%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	39	680	686 bits (371)	KX377348.1
Crayfish SK1_Chmr4	1199	646/656 **(98%)**	*Cherax quadricarinatus* mitochondrion, complete genome	14	668	1153 bits (624)	KF649850.1
Crayfish CR1_Chmr4	1648	550/591 **(93%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CQHU cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	15	593	843 bits (456)	KY745779.1

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของตัวอย่าง บนฐานข้อมูล Genebank (ต่อ)

Species Sequence	Length	Identities	Description	start	End	Alignment match Score	Accession N.
Crayfish UD1_Chmr4	1554	615/631 **(97%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	3	631	1074 bits (581)	KX377348.1
Crayfish MSK1_Chmr4	1355	**-**	-	-	-	-	-
Crayfish ROI1_Chmr4	1337	623/640 **(97%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS02 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	3	641	1085 bits (587)	KX377346.1
Crayfish KK1_Chmr4	1259	624/627 **(99%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	3	629	1140 bits (617)	KX377348.1
Crayfish KR1_Chmr4	1205	632/639 **(99%)**	*Cherax quadricarinatus* isolate CS04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	3	640	1138 bits (616)	KX377348.1
Crayfish YT1_Chmr4	737	**-**	-	-	-	-	-

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เมื่อนำนิวคลีโอไทด์มา alignment เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยยีน Cytochrome C oxidase I (COI) ของไมโทคอนเดรีย ด้วยไพรเมอร์ที่มีลักษณะเป็น universal primers ที่จำเพาะต่อยีน COI (COI-C03 -5’ ACYTCYGGRTGACCAARAAYCA 3’-COI-C01 -5’ TYTCWACWAAY CAYAAAGAYATTGG 3’) พบจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่สามารถนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถนำไปวิเคราะห์ความเหมือน หรือความแตกต่าง (identity and similarity) ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 606 คู่เบส

```
Crayfish_SK1        CCA GTG AAG TGT CGG AGC GAT CAA GTA TAT AGC
Crayfish_SK2        .AT TAA ..T .A. .T. ..A TG. A.G ... ... ...
Crayfish_CR1        TGG TGA ..A C.. A.T ..G AC. G.G ... ... ...
Crayfish_CR2        A.. AAT GGA CA. .T. G.G A.. ... ... ... ...
Crayfish_ROI1       .AG TAT ... CA. .A. ..G .C. ..G ... ... ...
Crayfish_ROI2       .A. T.T .TA .A. .TA .A. ... .T. ... ... ...
Crayfish_MSK1       GTG A.A .G. .A. .T. ... ... A.G ... ... ...
Crayfish_MSK2       GTG A.A .G. .A. .T. ... ... A.G ... ... ...
Crayfish_KK1        A.. A.A ... .A. .T. .AG TG. A.G ... ... ...
Crayfish_KK2        .T. A.. TTC ... .A. ..A ... ..G ... ... ...
Crayfish_UD1        .A. AAT TCA ... ... ... ... .CG ... ... ...
Crayfish_UD2        ..G A.T G.A C.. .T. .TG ... ..G ... ... ...
Crayfish_UD3        TT. T.A G.T ... TA. ..A ... ..G ... ... ...
Crayfish_KR1        .G. T.T GGC .T. .T. ... .C. ..G ... ... ...
Crayfish_YT1        .A. A.. G.A C.. .T. G.G .C. ..G ... ... ...

Crayfish_SK1        ACT TCC CTA AGA CTG ATT TTC GGC ACC CCG AGA
Crayfish_SK2        ... ... ... ... ... ... ... ... CGA A.T T.G
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ... ... ..G C.. ... ..G
Crayfish_CR2        ... ... ... ... ... ... C.. ... ... ... ..G
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... ... CA. ..C GAG
Crayfish_ROI2       ... ... ... ... ... ... ... ... CA. ..C GAG
Crayfish_MSK1       ... ... ... ... ..A ... ... ... CGA A.T T.G
Crayfish_MSK2       ... ... ... ... ..A ... ... ... CGA A.T T.G
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... CA. ..C GAG
Crayfish_KK2        ... ... ... ... ..A ... ... ... CGA A.T T.G
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ... ... ... T.. CTA ..T T..
Crayfish_UD2        ... ... ... ... ..A ... ... ... CGA A.T T.G
Crayfish_UD3        ... ... ... ... ..A ... ... ... CGA A.T T.G
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ..A ... ... ... CGA A.T T.G
Crayfish_YT1        ... ... ... ... ..A ... ... ... CGA A.T T.G
```

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

** หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสีแดงคือช่วงที่มีความแปรผันในตัวอย่างแต่ละชนิด

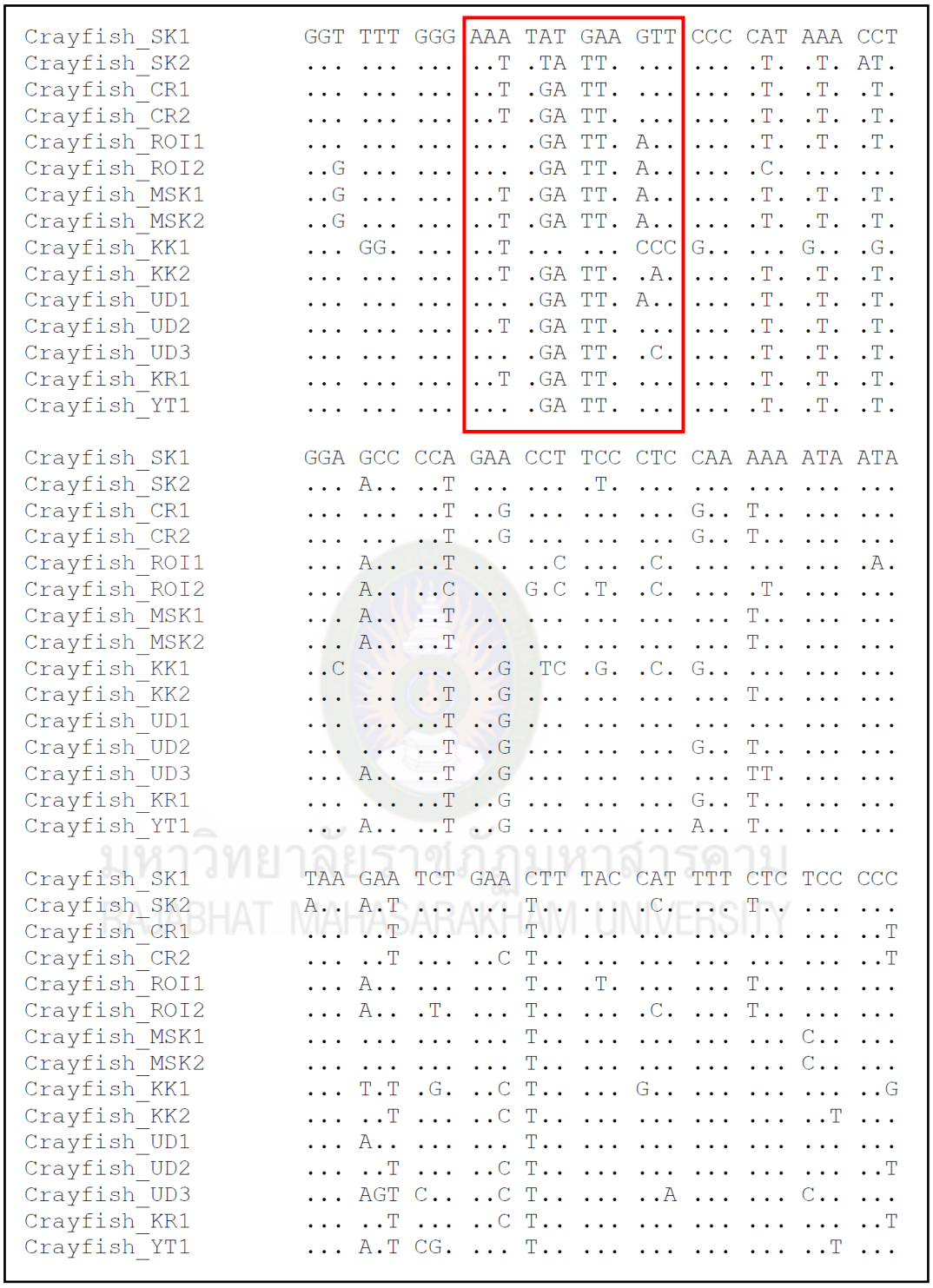
ภาพที่ 4.13 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *COI* ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0

```
Crayfish_SK1        GAA CCG AAG ATC AAT CGG AGA CGA TCG CAT TTA
Crayfish_SK2        T.. ... ... ..T ... ... ... ... ..A A.. ...
Crayfish_CR1        T.C ... ... ... ... ... ... ... ..A A.. ...
Crayfish_CR2        T.. ... ... ..T ... ... ... ... ..A A.. ...
Crayfish_ROI1       .C. ... ... ..T ... ... ... ... ..A A.. ...
Crayfish_ROI2       .T. ... ... ..T ... ... ... ... ..A A.. ...
Crayfish_MSK1       T.. ... ... ..T ... ... ... ... ..A A.. ...
Crayfish_MSK2       T.. ... ... ..T ... ... ... ... ..A A.. ...
Crayfish_KK1        ... A.C TGC C.G C.. ... ... ... ... ... .CT
Crayfish_KK2        T.. ... ... ..T ... ... ... ... ..A A.. ...
Crayfish_UD1        .C. ... ... ..T ... ... ... ... ..A A.. ...
Crayfish_UD2        T.. ... ... ..T ... ... ... ... ..A A.. ...
Crayfish_UD3        T.. ... ... ..T ... ... ... ... ..A A.. ...
Crayfish_KR1        T.. ... ... ..T ... ... ... ... ..A A.. ...
Crayfish_YT1        T.. ... ... ..T ... ... ... ... ..A A.. ...

Crayfish_SK1        TCT GTA ATC GTC ACA GCC CAC GCC TTC ATA ATG
Crayfish_SK2        .A. ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...
Crayfish_CR1        .A. ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...
Crayfish_CR2        .A. ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...
Crayfish_ROI1       .A. ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...
Crayfish_ROI2       .A. ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...
Crayfish_MSK1       .A. ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...
Crayfish_MSK2       .A. ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...
Crayfish_KK1        ... ... .A. .A. ..C ATG T.G C.T .CG ..C ...
Crayfish_KK2        .A. ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...
Crayfish_UD1        .A. ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...
Crayfish_UD2        .A. ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...
Crayfish_UD3        .A. ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...
Crayfish_KR1        .A. ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...
Crayfish_YT1        .A. ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ...

Crayfish_SK1        ATT TTC TTC ATA GTT ATG CCA ATC ATA ATT GGG
Crayfish_SK2        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ..A ... ... ... ... ...
Crayfish_CR2        ... ... ... ... ... ..A ... ... ... ... ...
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_ROI2       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK2       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... .GC ... G.T G.C GG. C.. ... ...
Crayfish_KK2        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD2        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD3        ... ... ... ... ... ... ... ... .C. ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
```

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

** หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสีแดงคือช่วงที่มีความแปรผันในตัวอย่างแต่ละชนิด

ภาพที่ 4.13 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *COI* ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0 (ต่อ)



```
Crayfish_SK1        GGT TTT GGG AAA TAT GAA GTT CCC CAT AAA CCT
Crayfish_SK2        ... ... ... ..T .TA TT. ... ... .T. .T. AT.
Crayfish_CR1        ... ... ... ..T .GA TT. ... ... .T. .T. .T.
Crayfish_CR2        ... ... ... ..T .GA TT. ... ... .T. .T. .T.
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... .GA TT. A.. ... .T. .T. .T.
Crayfish_ROI2       ..G ... ... ... .GA TT. A.. ... .C. ... ...
Crayfish_MSK1       ..G ... ... ..T .GA TT. A.. ... .T. .T. .T.
Crayfish_MSK2       ..G ... ... ..T .GA TT. A.. ... .T. .T. .T.
Crayfish_KK1        ... GG. ... ..T ... ... CCC G.. ... G.. .G.
Crayfish_KK2        ... ... ... ..T .GA TT. .A. ... .T. .T. .T.
Crayfish_UD1        ... ... ... ... .GA TT. A.. ... .T. .T. .T.
Crayfish_UD2        ... ... ... ..T .GA TT. ... ... .T. .T. .T.
Crayfish_UD3        ... ... ... ... .GA TT. .C. ... .T. .T. .T.
Crayfish_KR1        ... ... ... ..T .GA TT. ... ... .T. .T. .T.
Crayfish_YT1        ... ... ... ... .GA TT. ... ... .T. .T. .T.

Crayfish_SK1        GGA GCC CCA GAA CCT TCC CTC CAA AAA ATA ATA
Crayfish_SK2        ... A.. ..T ... ... .T. ... ... ... ... ...
Crayfish_CR1        ... ... ..T ..G ... ... ... G.. T.. ... ...
Crayfish_CR2        ... ... ..T ..G ... ... ... G.. T.. ... ...
Crayfish_ROI1       ... A.. ..T ... ..C ... .C. ... ... ... .A.
Crayfish_ROI2       ... A.. ..C ... G.C .T. .C. ... .T. ... ...
Crayfish_MSK1       ... A.. ..T ... ... ... ... ... T.. ... ...
Crayfish_MSK2       ... A.. ..T ... ... ... ... ... T.. ... ...
Crayfish_KK1        ..C ... ... ..G .TC .G. .C. G.. ... ... ...
Crayfish_KK2        ... ... ..T ..G ... ... ... ... T.. ... ...
Crayfish_UD1        ... ... ..T ..G ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD2        ... ... ..T ..G ... ... ... G.. T.. ... ...
Crayfish_UD3        ... A.. ..T ..G ... ... ... ... TT. ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ..T ..G ... ... ... G.. T.. ... ...
Crayfish_YT1        ... A.. ..T ..G ... ... ... A.. T.. ... ...

Crayfish_SK1        TAA GAA TCT GAA CTT TAC CAT TTT CTC TCC CCC
Crayfish_SK2        A.. A.T ... ... T.. ... .C. ... T.. ... ...
Crayfish_CR1        ... ..T ... ... T.. ... ... ... ... ... ..T
Crayfish_CR2        ... ..T ... ..C T.. ... ... ... ... ... ..T
Crayfish_ROI1       ... A.. ... ... T.. .T. ... ... T.. ... ...
Crayfish_ROI2       ... A.. .T. ... T.. ... .C. ... T.. ... ...
Crayfish_MSK1       ... ... ... ... T.. ... ... ... ... C.. ...
Crayfish_MSK2       ... ... ... ... T.. ... ... ... ... C.. ...
Crayfish_KK1        ... T.T .G. ..C T.. ... G.. ... ... ... ..G
Crayfish_KK2        ... ..T ... ..C T.. ... ... ... ... ..T ...
Crayfish_UD1        ... A.. ... ... T.. ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD2        ... ..T ... ..C T.. ... ... ... ... ... ..T
Crayfish_UD3        ... AGT C.. ..C T.. ... ..A ... ... C.. ...
Crayfish_KR1        ... ..T ... ..C T.. ... ... ... ... ... ..T
Crayfish_YT1        ... A.T CG. ... T.. ... ... ... ... ..T ...
```

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

** หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสีแดงคือช่วงที่มีความแปรผันในตัวอย่างแต่ละชนิด

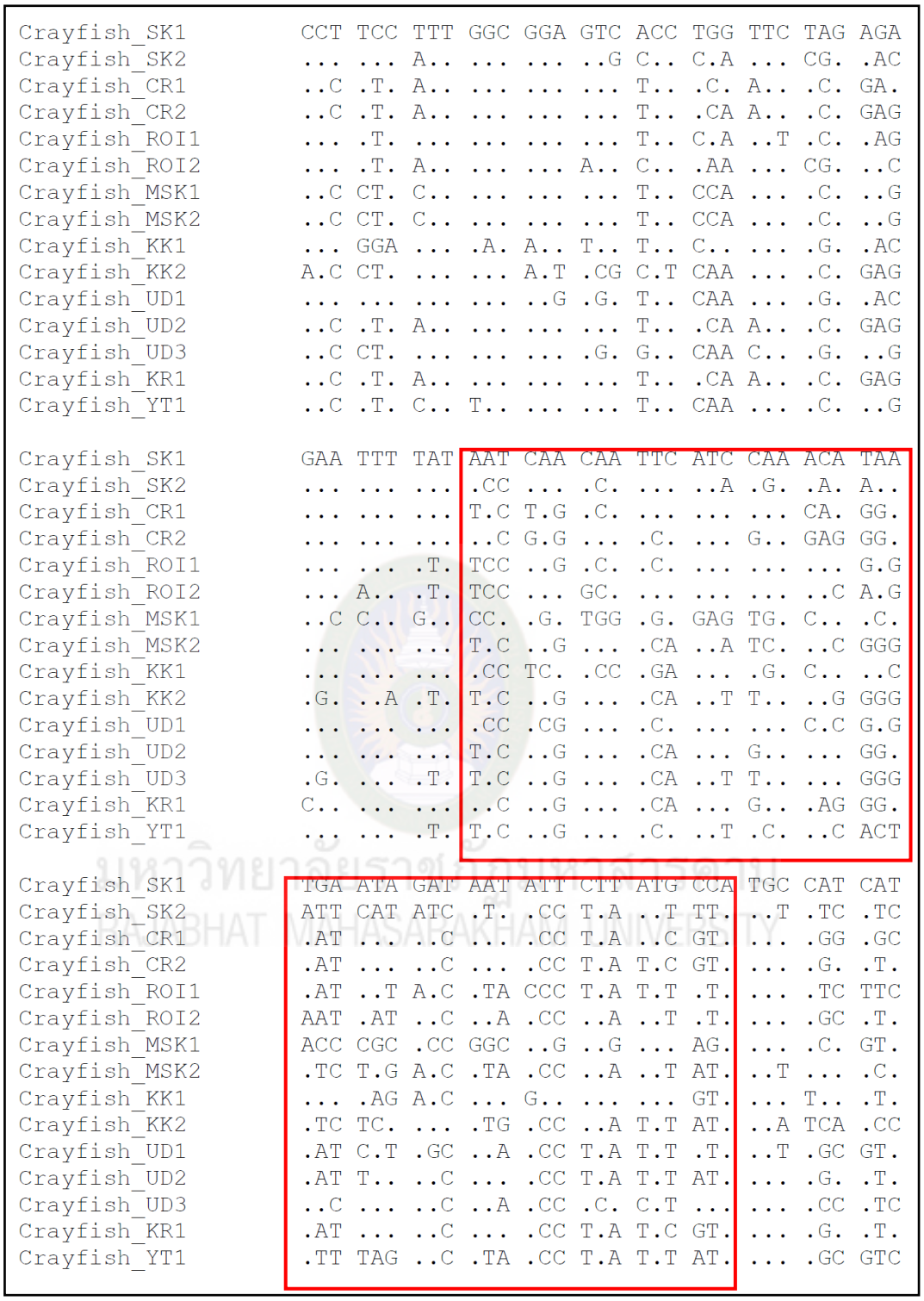
ภาพที่ 4.13 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *COI* ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0 (ต่อ)

```
Crayfish_SK1        TCG TCT TAC AAG GGA AAT GTA AAA GAG GGG CCG
Crayfish_SK2        .TC C.. ... .G. ... .TA A.. ... ... .T. .G.
Crayfish_CR1        ..T C.. ... ... ... .TA ... ... ... .T. .A.
Crayfish_CR2        ..T C.. ... .G. ... .TA ... G.. ... ... .G.
Crayfish_ROI1       .TT C.. .TA ... ... ..A A.. ... A.. ... ...
Crayfish_ROI2       .TT C.. .TA ... ... ..A A.. ... A.. ... ...
Crayfish_MSK1       ..T C.. ... .G. ... .TA ... G.. ..A ... ...
Crayfish_MSK2       CTC C.. ... C.. ... .TA ... G.. ..A ... ...
Crayfish_KK1        .T. C.. ... CC. ... CTA .CC C.C ... .T. T..
Crayfish_KK2        .TC C.. ... ... ... .TA ... G.. ... .T. T..
Crayfish_UD1        ..T C.. ... ... ... ..A A.. ... A.A ... .G.
Crayfish_UD2        ..T C.. ... .G. ... .TA ... GG. ... .T. .G.
Crayfish_UD3        .TC C.. ... .G. ... .TA ... T.. ... ... T..
Crayfish_KR1        ..T C.. ... .G. ... .TA ... G.. ... .T. .G.
Crayfish_YT1        CTC C.. ... ... ... .TA ... ... ..A .T. T..

Crayfish_SK1        GTC GGC TGG ACC TTT TAT CCT CCC TAA CAA CAT
Crayfish_SK2        .CA A.G ... ..A A.. ... ... ... ... ... ...
Crayfish_CR1        .A. CCG G.. ..A CC. ... ... ... ... ... ...
Crayfish_CR2        .A. A.G G.. ..A G.. ... ... ... ... ... ...
Crayfish_ROI1       .C. ..G G.. .AA A.. ... ..C ... ... ... ..A
Crayfish_ROI2       .C. ..G G.. .AA A.. ... ..C ... .T. .C. ...
Crayfish_MSK1       .C. ..G G.. .AA G.. ..A ... .TT C.. ..G ...
Crayfish_MSK2       .C. ..G G.. .AA G.. ..A ... .TT C.. ..G ...
Crayfish_KK1        .A. A.G G.. ... ..C ... ... ... ..G ... ...
Crayfish_KK2        .A. A.G G.. ..A G.. ... ... ... C.G ..G ...
Crayfish_UD1        .CA ..G G.. .AA A.. ... ... ... C.. ... ...
Crayfish_UD2        .A. A.G G.. ..A G.. ... ... ... ..G ... ...
Crayfish_UD3        .A. C.G G.. .AT G.. ..A ... ... C.. ..G G..
Crayfish_KR1        .A. A.G G.. ..A G.. ... ... ... ..G ..G ...
Crayfish_YT1        .A. A.G G.. ..A G.. ... ... .T. .T. ... ...

Crayfish_SK1        CCA TCG CCG AAG GGG ACA CGA CCT GCA TCT TCA
Crayfish_SK2        ... ... ... G.A .AA CA. .C. ..A T.G ... ..C
Crayfish_CR1        .A. ... G.. G.A .A. T.. ... ..G ... ... ..T
Crayfish_CR2        .A. ... ... G.. .A. T.. ... ..G ... ... ..T
Crayfish_ROI1       ... ... ... G.A ..A CA. .C. ..A .G. ... ..C
Crayfish_ROI2       ... ... ... G.A ..A C.. .C. ..A ... ... ..C
Crayfish_MSK1       ... .TC ... G.A ..A T.. ... ..G .G. ..C ..T
Crayfish_MSK2       ... .TC ... G.A ..A T.. ... ..G .G. ..C ..T
Crayfish_KK1        .A. ... ... C.A .A. T.C ... ... ... ... ..C
Crayfish_KK2        .A. ... ... GCA ..A T.. ... ..G AG. .GC ..T
Crayfish_UD1        ... ... ... G.. .AA CA. ... ..G ... ... .TC
Crayfish_UD2        .A. ... ... GGA ..A T.. ... ..G ... ... ..T
Crayfish_UD3        .A. ... ... GGA A.A T.. .C. ..A .G. AAC C.T
Crayfish_KR1        .A. ... ... G.. .AA T.. ... ..G ... ... ..T
Crayfish_YT1        ... ... ... G.A ..A ... ... ..A .G. ATC ..T
```

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

** หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสีแดงคือช่วงที่มีความแปรผันในตัวอย่างแต่ละชนิด

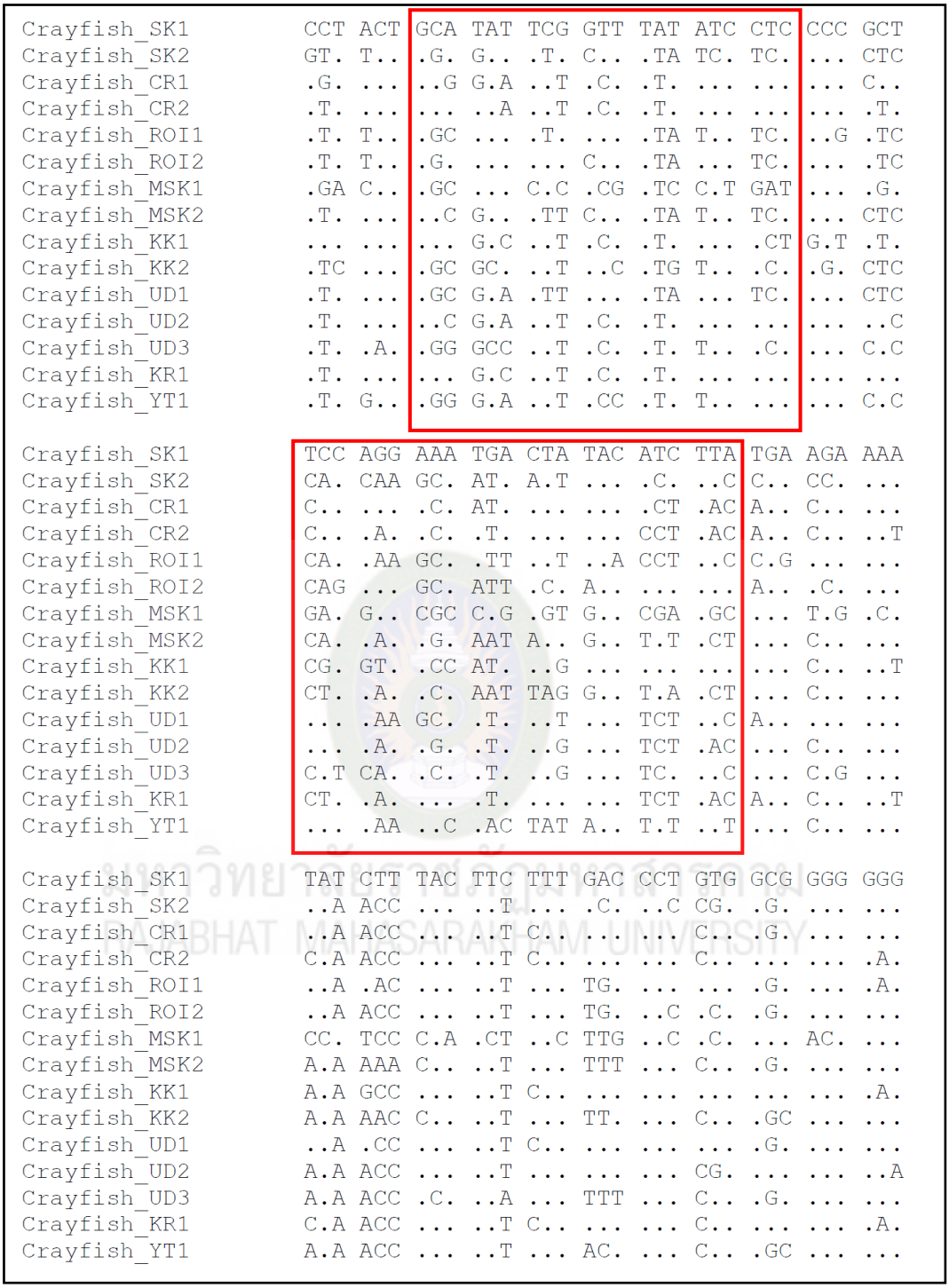
ภาพที่ 4.13 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *COI* ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0 (ต่อ)



```
Crayfish_SK1        CCT TCC TTT GGC GGA GTC ACC TGG TTC TAG AGA
Crayfish_SK2        ... ... A.. ... ... ..G C.. C.A ... CG. .AC
Crayfish_CR1        ..C .T. A.. ... ... ... T.. .C. A.. .C. GA.
Crayfish_CR2        ..C .T. A.. ... ... ... T.. .CA A.. .C. GAG
Crayfish_ROI1       ... .T. ... ... ... ... T.. C.A ..T .C. .AG
Crayfish_ROI2       ... .T. A.. ... ... A.. C.. .AA ... CG. ..C
Crayfish_MSK1       ..C CT. C.. ... ... ... T.. CCA ... .C. ..G
Crayfish_MSK2       ..C CT. C.. ... ... ... T.. CCA ... .C. ..G
Crayfish_KK1        ... GGA ... .A. A.. T.. T.. C.. ... .G. .AC
Crayfish_KK2        A.C CT. ... ... A.T .CG C.T CAA ... .C. GAG
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ..G .G. T.. CAA ... .G. .AC
Crayfish_UD2        ..C .T. A.. ... ... ... T.. .CA A.. .C. GAG
Crayfish_UD3        ..C CT. ... ... ... .G. G.. CAA C.. .G. ..G
Crayfish_KR1        ..C .T. A.. ... ... ... T.. .CA A.. .C. GAG
Crayfish_YT1        ..C .T. C.. T.. ... ... T.. CAA ... .C. ..G

Crayfish_SK1        GAA TTT TAT AAT CAA CAA TTC ATC CAA ACA TAA
Crayfish_SK2        ... ... ... .CC ... .C. ... ..A .G. .A. A..
Crayfish_CR1        ... ... ... T.C T.G .C. ... ... ... CA. GG.
Crayfish_CR2        ... ... ... ..C G.G ... .C. ... G.. GAG GG.
Crayfish_ROI1       ... ... .T. TCC ..G .C. .C. ... ... ... G.G
Crayfish_ROI2       ... A.. .T. TCC ... GC. ... ... ... ..C A.G
Crayfish_MSK1       ..C C.. G.. CC. .G. TGG .G. GAG TG. C.. .C.
Crayfish_MSK2       ... ... ... T.C ..G ... .CA ..A TC. ..C GGG
Crayfish_KK1        ... ... ... .CC TC. .CC .GA ... .G. C.. ..C
Crayfish_KK2        .G. ..A .T. T.C ..G ... .CA ..T T.. ..G GGG
Crayfish_UD1        ... ... ... .CC .CG ... .C. ... ... C.C G.G
Crayfish_UD2        ... ... ... T.C ..G ... .CA ... G.. ... GG.
Crayfish_UD3        .G. ... .T. T.C ..G ... .CA ..T T.. ... GGG
Crayfish_KR1        C.. ... ... ..C ..G ... .CA ... G.. .AG GG.
Crayfish_YT1        ... ... .T. T.C ..G ... .C. ..T .C. ..C ACT

Crayfish_SK1        TGA ATA GAT AAT ATT CTT ATG CCA TGC CAT CAT
Crayfish_SK2        ATT CAT ATC .T. .CC T.A ..T TT. ..T .TC .TC
Crayfish_CR1        .AT ... ..C ... .CC T.A ..C GT. ... .GG .GC
Crayfish_CR2        .AT ... ..C ... .CC T.A T.C GT. ... .G. .T.
Crayfish_ROI1       .AT ..T A.C .TA CCC T.A T.T .T. ... .TC TTC
Crayfish_ROI2       AAT .AT ..C ..A .CC ..A ..T .T. ... .GC .T.
Crayfish_MSK1       ACC CGC .CC GGC ..G ..G ... AG. ... .C. GT.
Crayfish_MSK2       .TC T.G A.C .TA .CC ..A ..T AT. ..T ... .C.
Crayfish_KK1        ... .AG A.C ... G.. ... ... GT. ... T.. .T.
Crayfish_KK2        .TC TC. ... .TG .CC ..A T.T AT. ..A TCA .CC
Crayfish_UD1        .AT C.T .GC ..A .CC T.A T.T .T. ..T .GC GT.
Crayfish_UD2        .AT T.. ..C ... .CC T.A T.T AT. ... .G. .T.
Crayfish_UD3        ..C ... ..C ..A .CC .C. C.T ... ... .CC .TC
Crayfish_KR1        .AT ... ..C ... .CC T.A T.C GT. ... .G. .T.
Crayfish_YT1        .TT TAG ..C .TA .CC T.A T.T AT. ... .GC GTC
```

** หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสีแดงคือช่วงที่มีความแปรผันในตัวอย่างแต่ละชนิด

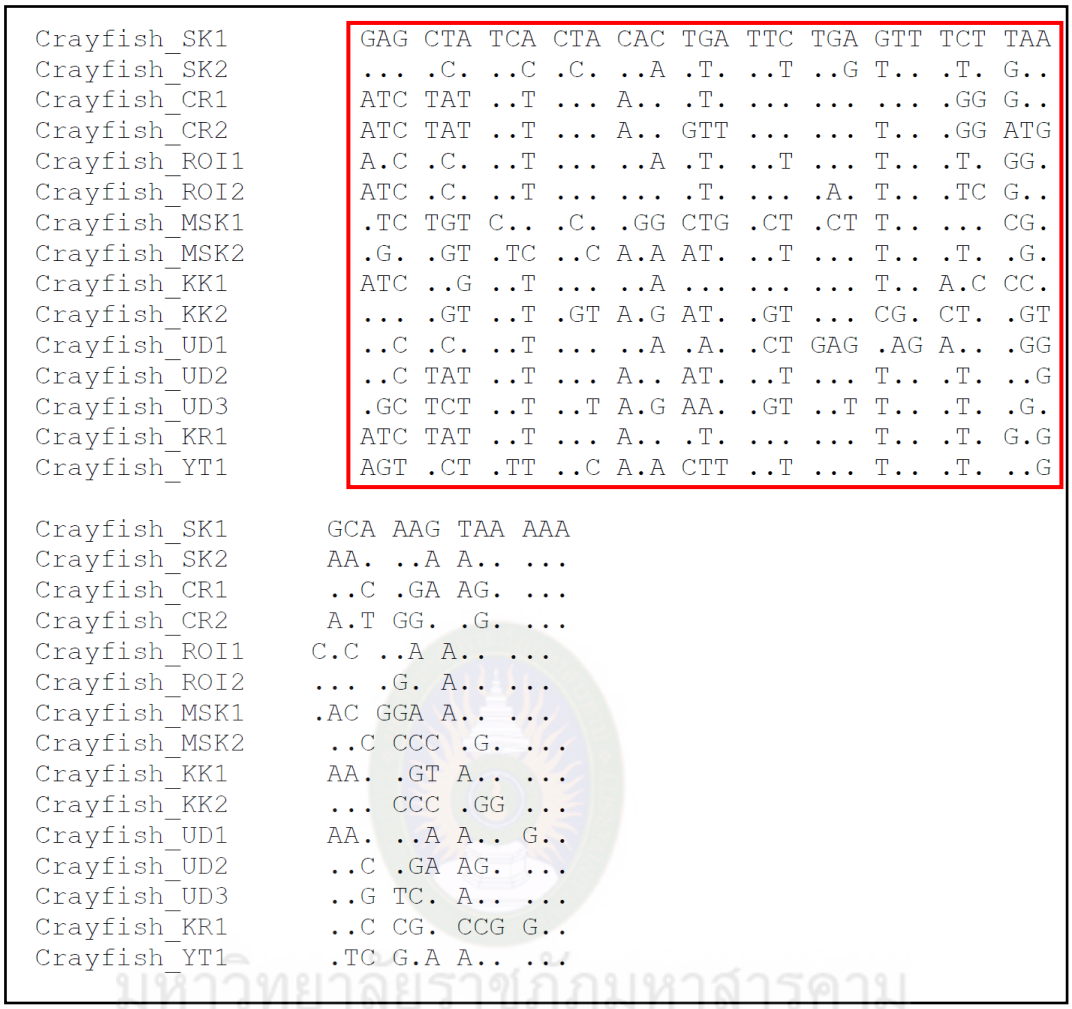
ภาพที่ 4.13 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *COI* ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0 (ต่อ)



```
Crayfish_SK1        CCT ACT GCA TAT TCG GTT TAT ATC CTC CCC GCT
Crayfish_SK2        GT. T.. .G. G.. .T. C.. .TA TC. TC. ... CTC
Crayfish_CR1        .G. ... ..G G.A ..T .C. .T. ... ... ... C..
Crayfish_CR2        .T. ... ... ..A ..T .C. .T. ... ... ... .T.
Crayfish_ROI1       .T. T.. .GC ... .T. ... .TA T.. TC. ..G .TC
Crayfish_ROI2       .T. T.. .G. ... ... C.. .TA ... TC. ... .TC
Crayfish_MSK1       .GA C.. .GC ... C.C .CG .TC C.T GAT ... .G.
Crayfish_MSK2       .T. ... ..C G.. .TT C.. .TA T.. TC. ... CTC
Crayfish_KK1        ... ... ... G.C ..T .C. .T. ... .CT G.T .T.
Crayfish_KK2        .TC ... .GC GC. ..T ..C .TG T.. .C. .G. CTC
Crayfish_UD1        .T. ... .GC G.A .TT ... .TA ... TC. ... CTC
Crayfish_UD2        .T. ... ..C G.A ..T .C. .T. ... ... ... ..C
Crayfish_UD3        .T. .A. .GG GCC ..T .C. .T. T.. .C. ... C.C
Crayfish_KR1        .T. ... ... G.C ..T .C. .T. ... ... ... ...
Crayfish_YT1        .T. G.. .GG G.A ..T .CC .T. T.. ... ... C.C

Crayfish_SK1        TCC AGG AAA TGA CTA TAC ATC TTA TGA AGA AAA
Crayfish_SK2        CA. CAA GC. AT. A.T ... .C. ..C C.. CC. ...
Crayfish_CR1        C.. ... .C. AT. ... ... .CT .AC A.. C.. ...
Crayfish_CR2        C.. .A. .C. .T. ... ... CCT .AC A.. C.. ..T
Crayfish_ROI1       CA. .AA GC. .TT ..T ..A CCT ..C C.G ... ...
Crayfish_ROI2       CAG ... GC. ATT .C. A.. ... ... A.. .C. ...
Crayfish_MSK1       GA. G.. CGC C.G .GT G.. CGA .GC ... T.G .C.
Crayfish_MSK2       CA. .A. .G. AAT A.. G.. T.T .CT ... C.. ...
Crayfish_KK1        CG. GT. .CC AT. ..G ... ... ... ... C.. ..T
Crayfish_KK2        CT. .A. .C. AAT TAG G.. T.A .CT ... C.. ...
Crayfish_UD1        ... .AA GC. .T. ..T ... TCT ..C A.. ... ...
Crayfish_UD2        ... .A. .G. .T. ..G ... TCT .AC ... C.. ...
Crayfish_UD3        C.T CA. .C. .T. ..G ... TC. ..C ... C.G ...
Crayfish_KR1        CT. .A. ... .T. ... ... TCT .AC A.. C.. ..T
Crayfish_YT1        ... .AA ..C .AC TAT A.. T.T ..T ... C.. ...

Crayfish_SK1        TAT CTT TAC TTC TTT GAC CCT GTG GCG GGG GGG
Crayfish_SK2        ..A ACC ... ..T ... .C. ..C CG. .G. ... ...
Crayfish_CR1        ..A ACC ... ..T C.. ... ... C.. .G. ... ...
Crayfish_CR2        C.A ACC ... ..T C.. ... ... C.. ... ... .A.
Crayfish_ROI1       ..A .AC ... ..T ... TG. ... ... .G. ... .A.
Crayfish_ROI2       ..A ACC ... ..T ... TG. ..C .C. .G. ... ...
Crayfish_MSK1       CC. TCC C.A .CT ..C TTG ..C .C. ... AC. ...
Crayfish_MSK2       A.A AAA C.. ..T ... TTT ... C.. .G. ... ...
Crayfish_KK1        A.A GCC ... ..T C.. ... ... ... ... ... .A.
Crayfish_KK2        A.A AAC C.. ..T ... TT. ... C.. .GC ... ...
Crayfish_UD1        ..A .CC ... ..T C.. ... ... ... .G. ... ...
Crayfish_UD2        A.A ACC ... ..T ... ... ... CG. ... ... ..A
Crayfish_UD3        A.A ACC .C. ..A ... TTT ... C.. .G. ... ...
Crayfish_KR1        C.A ACC ... ..T C.. ... ... C.. ... ... .A.
Crayfish_YT1        A.A ACC ... ..T ... AC. ... C.. .GC ... ...
```

** หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสีแดงคือช่วงที่มีความแปรผันในตัวอย่างแต่ละชนิด

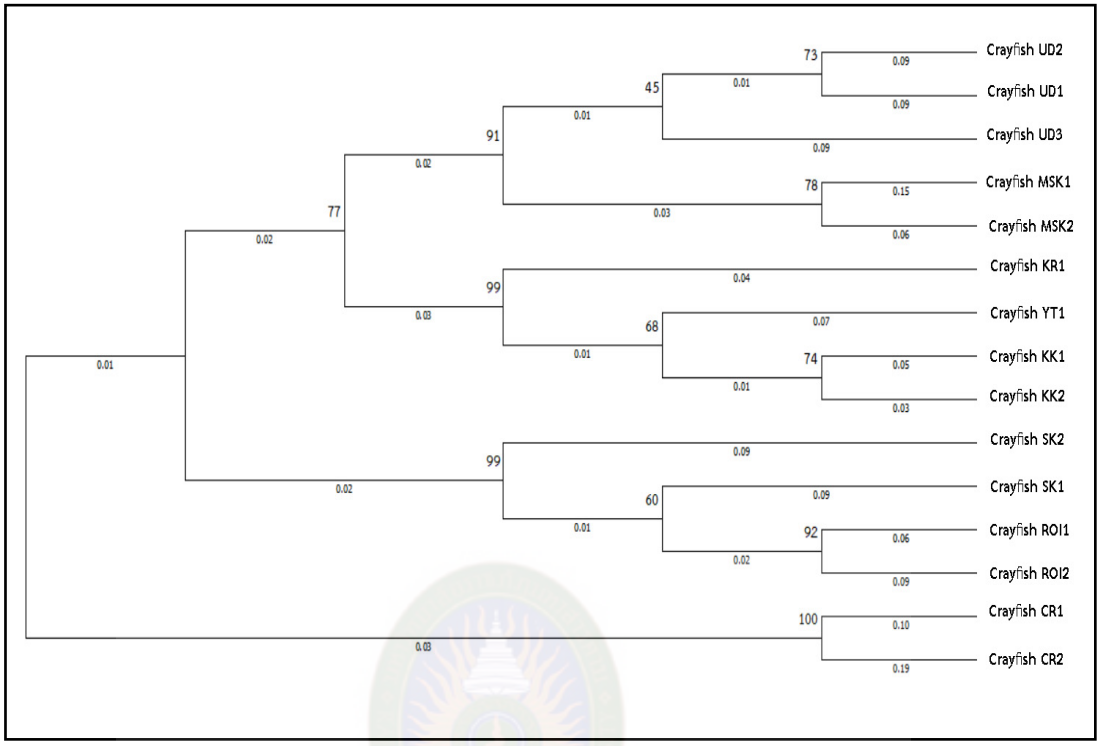
ภาพที่ 4.13 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *COI* ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0 (ต่อ)



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

** หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสีแดงคือช่วงที่มีความแปรผันในตัวอย่างแต่ละชนิด

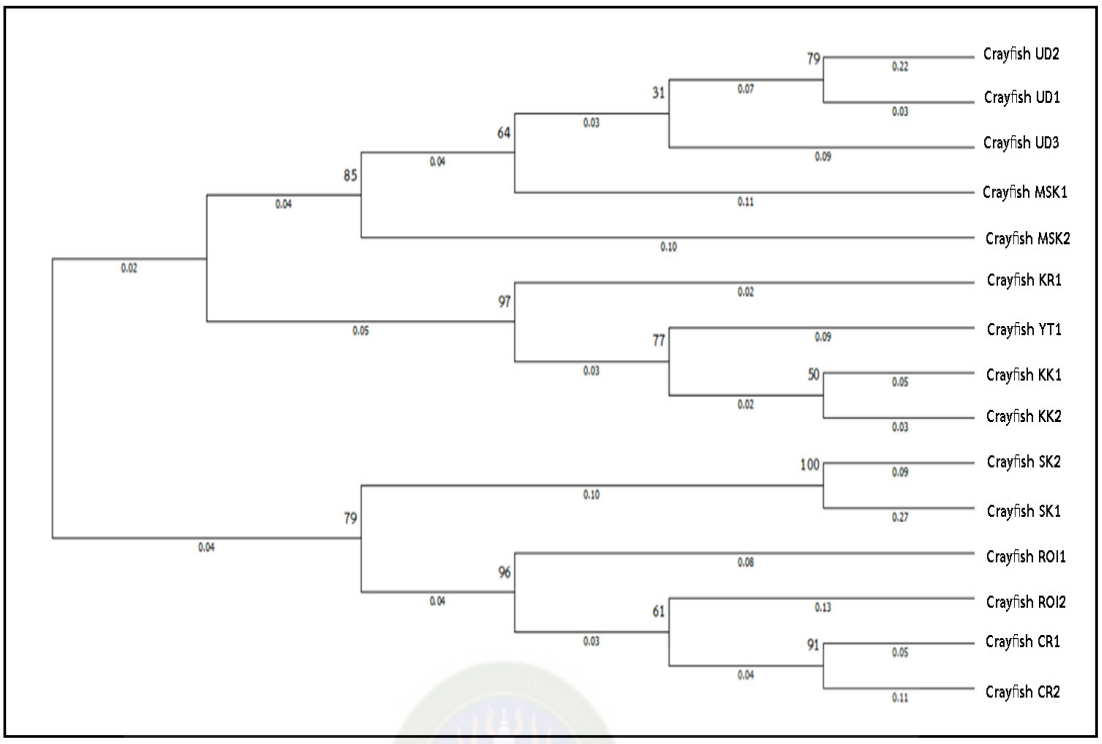
ภาพที่ 4.13 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *COI* ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0 (ต่อ)



ภาพที่ 4.14 Phylogenetic tree of *COI* sequences of crayfish was constructed using Neighbor joining method by MEGA version 6.0. The number on the branches are bootstrap confidence levels.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจาก 8 จังหวัด โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* สามารถแบ่งประชากรของกุ้งก้ามแดงออกจากกันได้ ดังภาพที่ 4.14 โดยใช้แบบแผนการสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor joining



ภาพที่ 4.15 Phylogenetic tree of *COI* sequences of crayfish was constructed using Maximum Likelihood method by MEGA version 6.0. The number on the branches are bootstrap confidence levels.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM RAJABHAT UNIVERSITY

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจาก 8 จังหวัด โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* สามารถแบ่งประชากรของกุ้งก้ามแดงออกจากกันได้ ดังภาพที่ 4.15 โดยใช้แบบแผนการสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Maximum Likelihood

ผลการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจาก 8 จังหวัดจากบริเวณ COI COI (COI-C03 -5’ ACYTCYGGRTGACCAARAAYCA 3’- COI-C01 -5’ TYTCWACWAAY CAYAAAGAYATTGG 3’) สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 เพื่อประมาณการความแตกต่างระหว่างลำดับวิวัฒนาการโดยวิธีปกติ พบว่า มีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดอยู่ระหว่าง 0.08-0.41 (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 แสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจาก 8 จังหวัดจากบริเวณ COI สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 6.0

Species	Crayfish_SK1_COI-CO1	Crayfish_SK2_COI-CO1	Crayfish_CR1_COI-CO1	Crayfish_CR2_COI-CO1	Crayfish_ROI1_COI-CO1	Crayfish_ROI2_COI-CO1	Crayfish_MSK1_COI-CO1	Crayfish_MSK2_COI-CO1	Crayfish_KK1_COI-CO1	Crayfish_KK2_COI-CO1	Crayfish_UD1_COI-CO1	Crayfish_UD2_COI-CO1	Crayfish_UD3_COI-CO1	Crayfish_KR1_COI-CO1	Crayfish_YT1_COI-CO1
Crayfish_SK1	0.00														
Crayfish_SK2	0.27														
Crayfish_CR1	0.23	0.24													
Crayfish_CR2	0.23	0.26	0.11												
Crayfish_ROI1	0.25	0.18	0.23	0.24											
Crayfish_ROI2	0.24	0.20	0.25	0.26	0.15										
Crayfish_MSK1	0.31	0.30	0.31	0.29	0.30	0.31									
Crayfish_MSK2	0.27	0.23	0.24	0.23	0.22	0.25	0.21								
Crayfish_KK1	0.29	0.34	0.32	0.31	0.35	0.34	0.41	0.37							
Crayfish_KK2	0.30	0.27	0.26	0.24	0.27	0.30	0.30	0.16	0.39						
Crayfish_UD1	0.24	0.19	0.23	0.22	0.16	0.21	0.30	0.24	0.35	0.26					
Crayfish_UD2	0.23	0.23	0.13	0.10	0.22	0.26	0.26	0.18	0.32	0.18	0.20				
Crayfish_UD3	0.29	0.26	0.24	0.24	0.25	0.28	0.28	0.19	0.38	0.18	0.25	0.18			
Crayfish_KR1	0.24	0.24	0.13	0.08	0.24	0.25	0.28	0.20	0.32	0.20	0.21	0.08	0.21		
Crayfish_YT1	0.28	0.23	0.22	0.21	0.22	0.26	0.28	0.18	0.37	0.19	0.22	0.16	0.19	0.19	0.00

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เมื่อนำนิวคลีโอไทด์มา alignment เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยยีน Cytochrome C oxidase I (COI) ของไมโทคอนเดรีย ด้วยไพรเมอร์ที่มีลักษณะเป็น universal primers ที่จำเพาะต่อยีน COI (Chmr4-C03 -5’ ACYTCRGGRTGRCCRAARAATCA 3’- Chmf4 -5’ TYTCWACWAAYCAYAAAGAYATCGG 3’-) พบจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่สามารถนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถนำไปวิเคราะห์ความเหมือน หรือความแตกต่าง (identity and similarity) ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 622 คู่เบส

```
Crayfish_SK1        GTT CCC CCG TTC TCG CCT CAA GTG TTT AAT TCG
Crayfish_CR1        A.A ... .G. ..G ... .G. ..T ... C.. ... ...
Crayfish_UD1        .CA AA. A.. .CA ... T.. ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       C.A TAT AT. .CA C.A AAC GT. A.. G.C ..G CT.
Crayfish_ROI1       A.G .AA .G. .CT C.. ... ..G ... ... ... ...
Crayfish_KK1        A.G T.A ... .CT CT. .A. ..G ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ACA AA. A.. C.. ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        ..A T.A A.T GCT CAA GG. GGG ACA G.C ..A CTT

Crayfish_SK1        GCT GTA GAA GTA TAA TTC TCC TGC TGA ACG GGG
Crayfish_CR1        ... ... ATG A.T ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD1        ... ... ... .GT C.C ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       TTC C.G .TG AA. .T. .C. G.T CA. ATT C.A CAC
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        C.. T.C .T. .CG .GC CC. CT. ... ACC T.T .TC

Crayfish_SK1        GGA AAA AGC AGA AGT CTG CAG TAA TGA AGA CGG
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD1        ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       CAT CG. GC. G.. ..C TAA AGT GT. AAG CCC G..
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        CA. C.. CT. CT. ... .AA .TT CTG CCG TCC T..

Crayfish_SK1        ATC ATA CAG GGT ATT CGG TCT ATG GAA TCC CTC
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD1        ... ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       GC. TA. T.. CTA .C. .AC AT. .AT TGG CG. TCA
Crayfish_ROI1       ... ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        ... CC. T.. TC. C.C TA. GGA .AT AG. C.. TA.
```

** หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสีแดงคือช่วงที่มีความแปรผันในตัวอย่างแต่ละชนิด

ภาพที่ 4.16 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *COI* ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

```
Crayfish_SK1        TGG TTC GTA TAT TGA TTG CTG TGG TTA TAA AAT
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ... ... .A. ... ... ...
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       CT. CC. .CT .TC CAG .C. GGA AAC C.G .CG TGC
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        CT. GC. TCC CTA CA. ACA AAC AAA C.T .C. TTA

Crayfish_SK1        TTA CAG CCC GAG AAT TGA GGA GAC TCC GGC CAA
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       CAG .T. .TT A.T G.A .CG .CC A.. G.G ..A G.G
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        ... ATA ..T ... G.C A.G .AC A.A ATG ..T TC.

Crayfish_SK1        ATG AAG GGA GAA GAT GCC TAG GTC GAC TTC CTG
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       GC. GTT T.C ..T TGG ..G CTC T.. CG. ... ..C
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        GCT .CC A.. .C. TGC A.A CCC ACT T.. ..T .AC

Crayfish_SK1        CAT GGG CGA TTG ATG CTG CTA GGG AGG TAA ACT
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       GC. CAC T.. C.C GCT GC. ..C ..T C.T .CG G..
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        G.. T.C ... C.A ..C ... G.G ... ..C .CG G..

Crayfish_SK1        GCA CCC TGT CCC GAC ACC TCT CTC TAC TAT TCC
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       ..G G.G A.C GGT AT. .G. ..A ... A.A GGC GGT
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        A.. TT. A.. GGT .T. .G. ..A TC. AGA AG. .TT
```

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

** หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสีแดงคือช่วงที่มีความแปรผันในตัวอย่างแต่ละชนิด

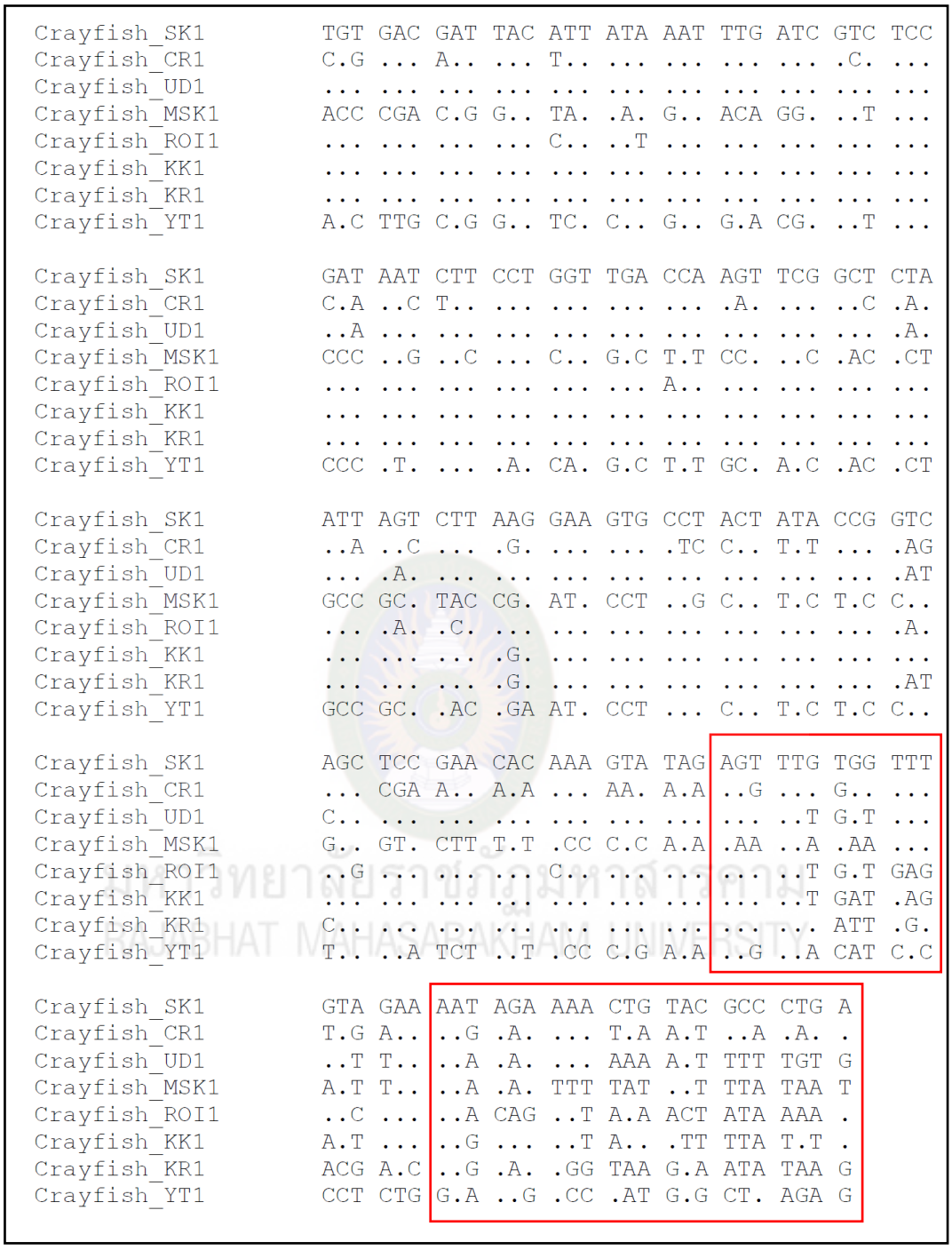
ภาพที่ 4.16 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *COI* ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0 (ต่อ)

```
Crayfish_SK1        CCT TGT AAG GAG AAG GGA GAG AGA AAA TGG TAA
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ..T ... .A. ... ... ...
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       AA. ACG GTT ATC C.C A.. ATC ..G GG. .AA CGC
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        .A. CC. GTT CTC CGC C.. AGC ..G GG. .AC CGC

Crayfish_SK1        AAG TCA GAA TCT TAT ATT ATT TAT TCG AGG GAA
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       .G. AA. ... CA. GTG .GC .AA AGG C.A GCA A..
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        GG. AGC ... CAA GGG .CC CA. ACG C.A CCT C..

Crayfish_SK1        GGC TAT AAG GGG CTC CAA GTA TAA GGG GAA CTA
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       ... C.G G.A CC. TAA A.. .GC CGC .TT .CT GGC
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        C.. C.G G.A CC. G.A A.. .G. CGC ..T ACG T.T

Crayfish_SK1        ATC AAT TCC AAA ACC CCC AAT TAT GAT TGG CAT
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... T..
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       G.T TT. C.T .GG CT. .G. CCC CC. ..C GA. ...
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        .C. TCA C.T ..G CT. .G. CC. CC. ..C GAC GC.

Crayfish_SK1        AAC TAT GAA GAA AAT CAT TAC GAA GGC GTG GGC
Crayfish_CR1        ... ... ... ... ... ... ... C.. ..G .G. ..G
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       C.. A.A A.T ..C GC. ..A GT. AG. ..T .GC .AA
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... ... C.. A.. ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        CG. GCA A.T T.T TC. ..C .G. CT. T.. .CA .AA
```

** หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสีแดงคือช่วงที่มีความแปรผันในตัวอย่างแต่ละชนิด

ภาพที่ 4.16 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *COI* ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0 (ต่อ)

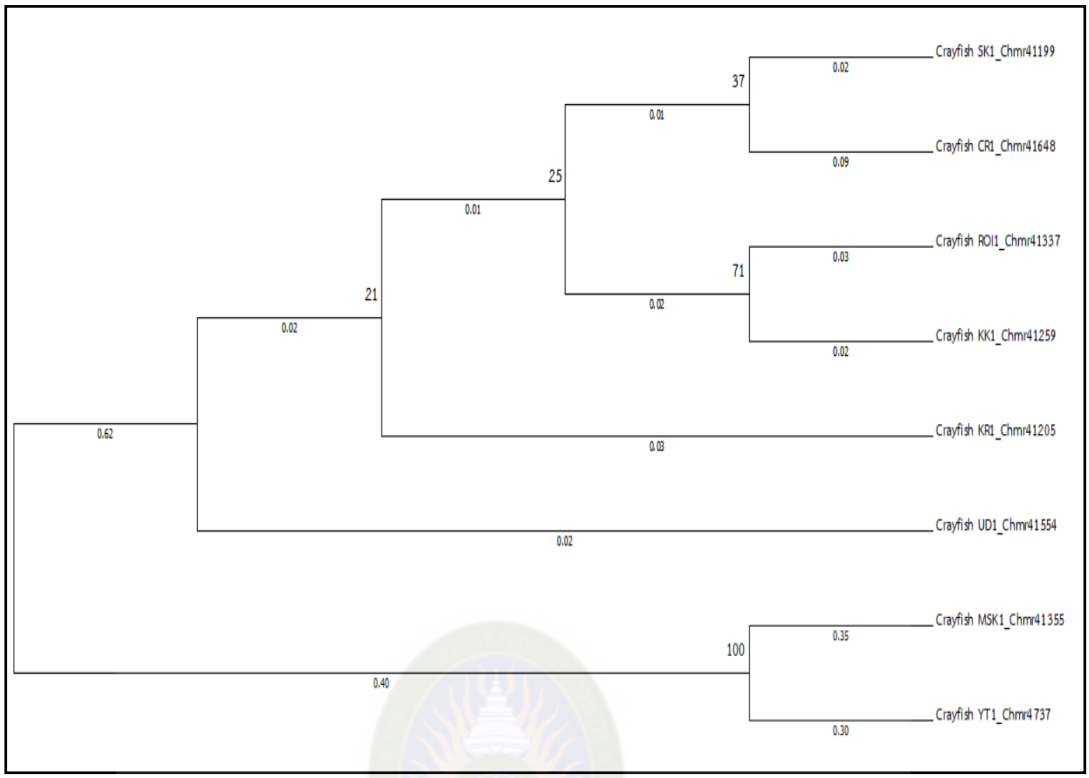
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



```
Crayfish_SK1        TGT GAC GAT TAC ATT ATA AAT TTG ATC GTC TCC
Crayfish_CR1        C.G ... A.. ... T.. ... ... ... ... .C. ...
Crayfish_UD1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_MSK1       ACC CGA C.G G.. TA. .A. G.. ACA GG. ..T ...
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... C.. ..T ... ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        A.C TTG C.G G.. TC. C.. G.. G.A CG. ..T ...

Crayfish_SK1        GAT AAT CTT CCT GGT TGA CCA AGT TCG GCT CTA
Crayfish_CR1        C.A ..C T.. ... ... ... ... .A. ... ..C .A.
Crayfish_UD1        ..A ... ... ... ... ... ... ... ... ... .A.
Crayfish_MSK1       CCC ..G ..C ... C.. G.C T.T CC. ..C .AC .CT
Crayfish_ROI1       ... ... ... ... ... ... A.. ... ... ... ...
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_YT1        CCC .T. ... .A. CA. G.C T.T GC. A.C .AC .CT

Crayfish_SK1        ATT AGT CTT AAG GAA GTG CCT ACT ATA CCG GTC
Crayfish_CR1        ..A ..C ... .G. ... ... .TC C.. T.T ... .AG
Crayfish_UD1        ... .A. ... ... ... ... ... ... ... ... .AT
Crayfish_MSK1       GCC GC. TAC CG. AT. CCT ..G C.. T.C T.C C..
Crayfish_ROI1       ... .A. .C. ... ... ... ... ... ... ... .A.
Crayfish_KK1        ... ... ... .G. ... ... ... ... ... ... ...
Crayfish_KR1        ... ... ... .G. ... ... ... ... ... ... .AT
Crayfish_YT1        GCC GC. .AC .GA AT. CCT ... C.. T.C T.C C..

Crayfish_SK1        AGC TCC GAA CAC AAA GTA TAG AGT TTG TGG TTT
Crayfish_CR1        ... CGA A.. A.A ... AA. A.A ..G ... G.. ...
Crayfish_UD1        C.. ... ... ... ... ... ... ... ..T G.T ...
Crayfish_MSK1       G.. GT. CTT T.T .CC C.C A.A .AA ..A .AA ...
Crayfish_ROI1       ..G ... ... ... C.. ... ... ... ..T G.T GAG
Crayfish_KK1        ... ... ... ... ... ... ... ... ..T GAT .AG
Crayfish_KR1        C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ATT .G.
Crayfish_YT1        T.. ..A TCT ..T .CC C.G A.A ..G ..A CAT C.C

Crayfish_SK1        GTA GAA AAT AGA AAA CTG TAC GCC CTG A
Crayfish_CR1        T.G A.. ..G .A. ... T.A A.T ..A .A. .
Crayfish_UD1        ..T T.. ..A .A. ... AAA A.T TTT TGT G
Crayfish_MSK1       A.T T.. ..A .A. TTT TAT ..T TTA TAA T
Crayfish_ROI1       ..C ... ..A CAG ..T A.A ACT ATA AAA .
Crayfish_KK1        A.T ... ..G ... ..T A.. .TT TTA T.T .
Crayfish_KR1        ACG A.C ..G .A. .GG TAA G.A ATA TAA G
Crayfish_YT1        CCT CTG G.A ..G .CC .AT G.G CT. AGA G
```

** หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสีแดงคือช่วงที่มีความแปรผันในตัวอย่างแต่ละชนิด

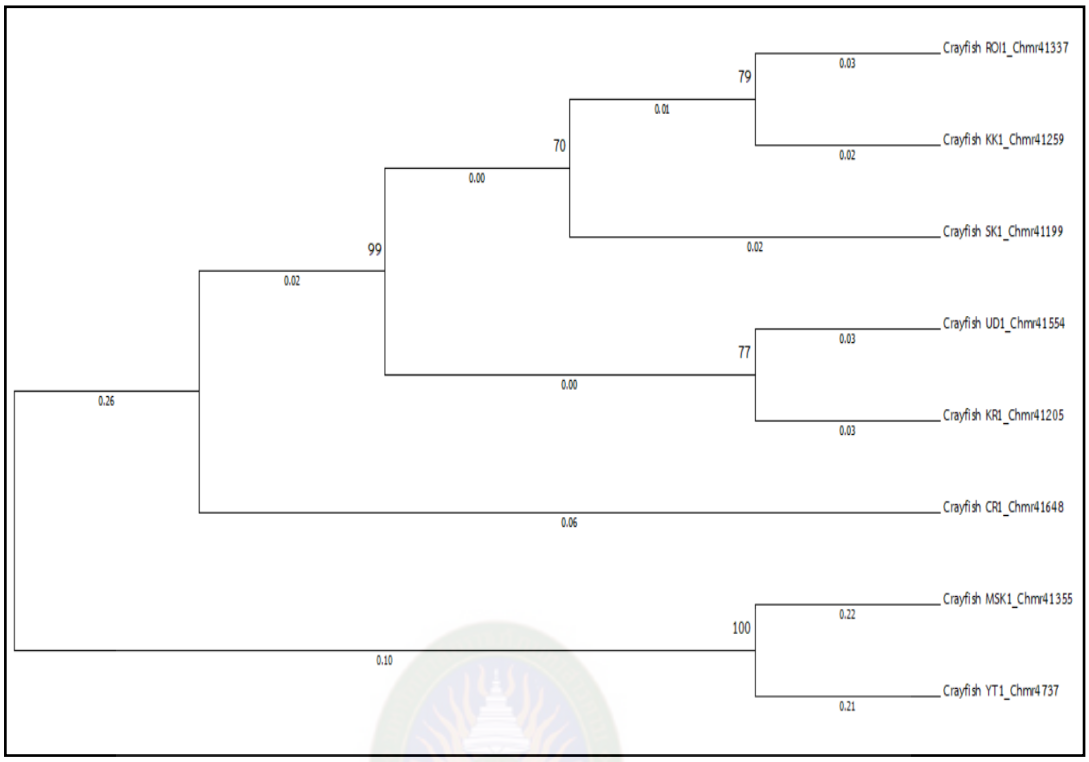
ภาพที่ 4.16 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *COI* ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0 (ต่อ)



ภาพที่ 4.17 The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model . The tree with the highest log likelihood (-3238.9445) is shown. There were a total of 622 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
RAJABHAT BANSOMDEJCHAOPHRAYA UNIVERSITY

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจาก 8 จังหวัด โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* สามารถแบ่งประชากรของกุ้งก้ามแดงออกจากกันได้ ดังภาพที่ 4.17 โดยใช้แบบแผนการสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Maximum Likelihood



ภาพที่ 4.18 The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The optimal tree with the sum of branch length = 1.01889068 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The analysis involved 8 nucleotide sequences. There were a total of 622 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์
RAJABHAT NAKHONSAWAN UNIVERSITY

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจาก 8 จังหวัด โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* สามารถแบ่งประชากรของกุ้งก้ามแดงออกจากกันได้ ดังภาพที่ 4.18 โดยใช้แบบแผนการสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor-Joining

ผลการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจาก 8 จังหวัดจากบริเวณ COI (Chmr4-C03 -5’ ACYTCRGGRTGRCCRAARAATCA 3’- Chmf4 -5’ TYTCWACWAAYCAYAAAGAYATCGG 3’-) สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 เพื่อประมาณการความแตกต่างระหว่างลำดับวิวัฒนาการโดยวิธีปกติ พบว่า มีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดอยู่ระหว่าง 0.05-0.64 (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.4 แสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจาก 8 จังหวัดจากบริเวณ COI สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 6.0

Species	Crayfish_SK1_Chmr	Crayfish_CR1_Chmr	Crayfish_UD1_Chmr	Crayfish_MSK1_Chmr	Crayfish_ROI1_Chmr	Crayfish_KK1_Chmr	Crayfish_KR1_Chmr	Crayfish_YT1_Chmr
Crayfish_SK1_Chmr	0.00							
Crayfish_CR1_Chmr	0.10	0.00						
Crayfish_UD1_Chmr	0.06	0.12	0.00					
Crayfish_MSK1_Chmr	0.64	0.63	0.63	0.00				
Crayfish_ROI1_Chmr	0.07	0.13	0.07	0.64	0.00			
Crayfish_KK1_Chmr	0.05	0.12	0.07	0.63	0.05	0.00		
Crayfish_KR1_Chmr	0.06	0.12	0.06	0.63	0.07	0.06	0.00	
Crayfish_YT1_Chmr	0.62	0.63	0.61	0.43	0.62	0.61	0.62	0.00

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

4.4 การส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากพันธุ์กุ้งเครย์ฟิชในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในกลุ่มร้อยแก่นสารสินธุ์ (4 จังหวัด คือ ร้อยเอ็ด ขอนแก่น มหาสารคาม และกาฬสินธุ์)

จากการประชุมเครือข่ายผู้เลี้ยงกุ้งก้ามแดง ได้พบปัญหาที่เกษตรกรเป็นกังวลสำหรับการเลี้ยงกุ้งก้ามแดง คือการเป็นโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงได้ทำกิจกรรมย่อยในสวนของการสำรวจและติดตามเฝ้าระวังโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot disease) ในกุ้งเดสทรัคเตอร์ (Cherax destructor) กุ้งก้ามแดง Cherax quadricarinatus ได้ผลดังนี้

ผลของกิจกรรมที่ 1 การสำรวจและติดตามเฝ้าระวังโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot disease) ในกุ้งเดสทรัคเตอร์ (*Cherax destructor*) กุ้งก้ามแดง (*Cherax quadricarinatus*)

ผลจากการสำรวจและติดตามเฝ้าระวังโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot disease) ในกุ้งเดสทรัคเตอร์ (*Cherax destructor*) กุ้งก้ามแดง (*Cherax quadricarinatus*) โดยการสำรวจพื้นที่ 5 ภูมิภาคได้แก่ ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคอีสาน ภาคตะวันออก และภาคใต้ ซึ่งใช้วิธีการสัมภาษณ์เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงและวิธีการสังเกตความเปลี่ยนของชนิดและจำนวนกุ้งก้ามแดงในฟาร์มต่อการเกิดโรคระบาดโดยเฉพาะโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot disease) พบว่า

ภาคกลาง มีเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามแดงบริโภคเป็นระบบฟาร์มอยู่ที่จังหวัด กรุงเทพมหานครฯ ปทุมธานี สระบุรี นครปฐม ลพบุรี และราชบุรี บางรายมีการเพาะเลี้ยงกุ้งเครย์ฟิชสวยงามบางชนิด คือเรดเจแปนร่วมกันกับกุ้งก้ามแดง โดยการสำรวจในครั้งนี้ ไม่พบการระบาดของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในพื้นที่ภาคกลาง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคเหนือ มีเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามแดงบริโภคเป็นระบบฟาร์มอยู่ที่จังหวัด ชัยนาท อุตรดิตถ์ พิจิตร กำแพงเพชร แพร่ เชียงใหม่ และเชียงรายมีการเพาะเลี้ยงกุ้งชนิดเดสทรัคเตอร์ร่วมกันกับกุ้งก้ามแดง โดยการสำรวจในครั้งนี้ ไม่พบการระบาดของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในพื้นที่ภาคเหนือ

ภาคอีสาน มีเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามแดงบริโภคเป็นระบบฟาร์มอยู่ที่จังหวัด นครราชสีมา ขอนแก่น อุดรธานี มหาสารคาม ร้อยเอ็ด ยโสธร บุรีรัมย์ มุกดาหาร และบึงกาฬ บางพื้นที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งเครย์ฟิชสวยงามร่วมกันกับกุ้งก้ามแดง โดยการสำรวจในครั้งนี้ พบโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในพื้นที่จังหวัด มหาสารคาม และจังหวัดขอนแก่น ของกุ้งก้ามแดงเพื่อบริโภค แต่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ เพราะเกษตรกรมีการบริหารจัดการฟาร์มที่ถูกวิธีและกำจัดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ทันท่วงที

ภาคตะวันออก มีเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามแดงบริโภคเป็นระบบฟาร์มอยู่ที่จังหวัดนครนายกฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง และสระแก้ว บางพื้นที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งเครย์ฟิชสวยงาม เช่น *Cherax maron* sp.ร่วมกันกับกุ้งก้ามแดง โดยการสำรวจในครั้งนี้ พบโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในพื้นที่จังหวัด จังหวัดสะแก้ว ของกุ้งก้ามแดงเพื่อบริโภค แต่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ เพราะเกษตรกรมีการบริหารจัดการฟาร์มที่ถูกวิธีและกำจัดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ทันท่วงที

ภาคใต้ มีเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามแดงบริโภคเป็นระบบฟาร์มอยู่ที่จังหวัด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และภูเก็ต โดยการสำรวจในครั้งนี้ ไม่พบการระบาดของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในพื้นที่ภาคใต้

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่มีระบบการจัดการที่ดีขึ้น เพราะมีประสบการณ์เกี่ยวกับโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวของกุ้งก้ามแดง ในปี 2559-2560 ที่ผ่านมา โดยทุกฟาร์มมีการกำจัดกุ้งที่เป็นโรคและเรียนรู้วิธีปฏิบัติอย่างถูกต้องตามคำแนะนำของกรมประมง ส่วนข้อมูลด้านการตลาด เกษตรกรส่วนใหญ่พบปัญหาด้านการผลิตที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค ซึ่ง ปัจจุบันราคาสินค้ากุ้งก้ามแดงเพื่อการบริโภค แบ่งตามขนาดและราคาได้ดังนี้

1. ขนาดกุ้งก้ามแดง 6-10 ตัวต่อกิโลกรัม ราคาเฉลี่ย 1,200 บาท
2. ขนาดกุ้งก้ามแดง 10-15 ตัวต่อกิโลกรัม ราคาเฉลี่ย 750-850 บาท
3. ขนาดกุ้งก้ามแดง 16-25 ตัวต่อกิโลกรัม ราคาเฉลี่ย 450-550 บาท
4. ขนาดกุ้งก้ามแดง 25-30 ตัวต่อกิโลกรัม ราคาเฉลี่ย 350-450 บาท

ดังนั้นตลาดของกุ้งก้ามแดงเพื่อการบริโภคเนื้อจึงอยู่บนพื้นฐานของราคาความเป็นจริงที่ผู้บริโภคยอมรับได้โดยเฉพาะปัจจุบันการบริโภคกุ้งก้ามแดงส่วนใหญ่เป็นกลุ่มนักท่องเที่ยวชาวจีนที่มีความนิยมอย่างมากการตลาดของกุ้งก้ามแดงขนาดตัวเล็กสุดและราคาที่ผู้บริโภคเข้าถึงได้ง่าย เกษตรกรจึงส่งขายได้ตามร้านบุปเฟ่ที่อยู่ตามแหล่งท่องเที่ยวในเขตพื้นที่ เมืองพัทยา และภูเก็ต เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม กิจกรรมการสำรวจและติดตามเฝ้าระวังโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot disease) ในกุ้งเดสทรัคเตอร์ (*Cherax destructor*) กุ้งก้ามแดง (*Cherax quadricarinatus*) ถือเป็นเรื่องที่สำคัญต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามแดงในประเทศซึ่งจะส่งผลต่อการสร้างองค์ความรู้ที่ดีต่อตัวเกษตรกร การบริหารจัดการฟาร์มที่ถูกต้อง ระบบการผลิตและการวางแผนการตลาดที่เหมาะสมต่อการสร้างอาชีพที่ดีของตัวเกษตรกรและความรับผิดชอบต่อสังคม ต่อผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ

ประโยชน์และองค์ความรู้จากโครงการวิจัยที่ให้บริการวิชาการ

1. ทราบผลจากการสำรวจความหลากหลายของชนิดพันธุ์สัตว์น้ำ กุ้งก้ามแดง ปลาท้องถิ่นระบบนิเวศ และผลกระทบของประชาชนในชุมชนใกล้อ่างเก็บน้ำพระปรง จ.สระแก้ว ในหลายมิติ

2. ทราบผลของการสำรวจและติดตามเฝ้าระวังโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot disease) ในกุ้งเดสทรัคเตอร์ (*Cherax destructor*) กุ้งก้ามแดง (Cherax quadricarinatus)

3. ทราบผลของการสำรวจข้อมูลเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งเครย์ฟิชเพื่อการบริโภคและความสัมพันธ์ของคุณภาพกุ้งเครย์ฟิชต่อผลกระทบของระบบการผลิตเพื่อเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรจากกุ้งเครย์ฟิช (Crayfish)

4. เกษตรกรสามารถนำความรู้จากผลการวิจัยไปปฏิบัติได้จริงในการบริหารจัดการพื้นที่ทำนาข้าวอินทรีย์ร่วมกับการเลี้ยงกุ้งก้ามแดง รวมทั้งการปลูกพืชผัก พืชสมุนไพร ไม้ผล เพื่อเพิ่มทางเลือกและรายได้ในครอบครัว และการรักษาระบบนิเวศ สิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมกับพื้นที่ในชุมชน

5. ได้ข้อมูลการวิจัยในทุกมิติ อาทิ ข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ ข้อมูลวิทยาศาสตร์เกษตรประยุกต์ ข้อมูลการพัฒนาต่อยอดนวัตกรรมเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับสินค้าเกษตรในหลายมิติ รวมถึงการบริหารจัดการน้ำใช้ทำการเกษตรอย่างคุ้มค่า ในการปลูกพืชหลายชนิดเพื่อเป็นทุนหมุนเวียนที่เหมาะสมกับพื้นที่ของเกษตรกรในประเทศไทย และเผยแพร่บทความในวารสารวิจัยระดับชาติ และนานาชาติ

6. สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน พัฒนาเป็นแหล่งเรียนรู้ในระบบนิเวศ สิ่งแวดล้อมที่ดีได้ รวมทั้งเป็นแหล่งเรียนรู้ถึงกระบวนการถ่ายทอด และเทคโนโลยีที่เหมาะสมกับการพัฒนาอย่างยั่งยืน

7. เกษตรกรสามารถพัฒนาองค์ความรู้เพื่อการขายสินค้าเกษตรที่ดี ในประเทศ และส่งออกต่างประเทศ ด้วยการพัฒนายกระดับพัฒนาฟาร์มที่ถูกต้องตามหลักสากล โดยการขึ้นทะเบียน GAP ของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรแห่งชาติ ที่เป็นมาตรฐานสากล อันจะส่งผลการส่งออกกุ้งเครย์ฟิชไปต่างประเทศนำรายได้เข้าประเทศไทยอย่างยั่งยืน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.19 การประชุมเครือข่ายผู้เลี้ยงกุ้งก้ามแดง

ภาพที่ 4.20 การประชุมเครือข่ายเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งก้ามแดง

ภาพที่ 4.21 การนำนักศึกษาลงพื้นที่ให้ความรู้ในเรื่องการเลี้ยงกุ้งก้ามแดง และการสังเกตอาการของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส

ภาพที่ 4.22 ถอดบดเรียนที่ได้จากการจัดกิจกรรมการสำรวจและติดตามเฝ้าระวังโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot disease) ในกุ้งเดสทรัคเตอร์ (Cherax destructor) กุ้งก้ามแดง Cherax quadricarinatus

ผลการประเมินการจัดกิจกรรม

จัดโครงการค่ายอบรมเชิงปฏิบัติการ “ ความรู้จากการวิจัยเพื่อขจัดปัญหาการเลี้ยงกุ้งก้ามแดง ” โดยเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งเครย์ฟิชในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีเกษตรกรเข้าร่วม 33 คน เป็นเพศหญิง 16 และเพศชาย 17 คน ภาพรวมใน ด้านความรู้อยู่ในความพึงพอใจระดับมากที่สุด ด้านวิทยากรและผู้ดำเนินการจัดกิจกรรมอยู่ในความพึงพอใจระดับมากที่สุด ด้านการดำเนินงานในการจัดกิจกรรมอยู่ในความพึงพอใจระดับมากที่สุด ความพึงพอใจในภาพรวมอยู่ในความพึงพอใจระดับมากที่สุด

ข้อ	รายการ	$\bar{x}$	S.D.	ระดับความพึงพอใจ
ด้านความสะดวกสบายในการเข้ารับการอบรม		**4.49**	**0.65**	**มาก**
1	ความสะดวกในการรับข้อมูลข่าวสารการอบรม	4.17	0.92	มาก
2	ความสะดวกในการลงทะเบียนเข้ารับการอบรม	4.58	0.50	มากที่สุด
3	ความสะดวกในการเดินทางเข้ารับการอบรม	4.33	0.82	มาก
4	การอำนวยความสะดวกระหว่างการอบรมและการประสานงานของเจ้าหน้าที่โครงการ	4.54	0.51	มากที่สุด
5	ความเหมาะสมของอาหาร	4.83	0.48	มากที่สุด
ด้านระยะเวลาการอบรม		**3.42**	**0.95**	**ปานกลาง**
1	ความเหมาะสมของช่วงเวลาที่จัดอบรม	3.46	1.10	ปานกลาง
2	ความเหมาะสมของระยะเวลาการอบรมแต่ละเรื่อง	3.38	0.82	ปานกลาง
3	ความเหมาะสมของจำนวนวันที่อบรม	3.42	0.93	ปานกลาง
ด้านความชัดเจนเหมาะสมของเนื้อหาสาระในการอบรม		**4.71**	**0.51**	**มากที่สุด**
1	มีเนื้อหาสอดคล้องกับการเรียนการสอน	4.71	0.55	มากที่สุด
2	กิจกรรมการทดลองสามารถนำไปใช้ในการทำโครงการได้	4.71	0.46	มากที่สุด
ด้านวิทยากร		**4.63**	**0.58**	**มากที่สุด**
1	มีความชัดเจนของเนื้อหาและการนำเสนอ	4.50	0.66	มาก
2	การถ่ายทอดของวิทยากร น่าสนใจ ชวนให้ติดตาม	4.71	0.55	มากที่สุด
3	มีความรู้ ทักษะ สามารถอธิบายเนื้อหาได้ชัดเจนและตรงประเด็น	4.71	0.55	มากที่สุด

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ข้อ	รายการ	$\bar{x}$	S.D.	ระดับความพึงพอใจ
4	ใช้ภาษาที่เหมาะสมและเข้าใจง่าย	4.54	0.66	มากที่สุด
5	การนำเสนอกระตุ้นให้คิดและสอดแทรกการนำไปใช้	4.67	0.48	มากที่สุด
ด้านเอกสาร และอุปกรณ์ประกอบการอบรม		**4.58**	**0.54**	**มากที่สุด**
1	เอกสารครอบคลุมเนื้อหาที่จำเป็นต่อการอบรม	4.63	0.49	มากที่สุด
2	เอกสารมีรายละเอียดพอที่จะนำไปใช้ได้	4.54	0.59	มากที่สุด
ด้านผลของการอบรม และการนำความรู้ไปใช้		**4.63**	**0.51**	**มากที่สุด**
1	ความรู้จากการอบรมตรงกับความต้องการของท่าน	4.54	0.51	มากที่สุด
2	ได้รับความรู้ด้านเทคนิคใหม่ๆ	4.54	0.59	มากที่สุด
3	เกิดความมั่นใจในการประกอบอาชีพ	4.67	0.48	มากที่สุด
4	เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งก้ามแดง	4.67	0.48	มากที่สุด
5	มองเห็นแนวทางในการพัฒนาวิชาชีพ	4.79	0.41	มากที่สุด
6	มีโอกาสได้แลกเปลี่ยนประสบการณ์กับเพื่อนเกษตรกร	4.63	0.49	มากที่สุด
ความพึงพอใจในภาพรวม		**4.61**	**0.55**	**มาก**

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 5
สรุป และวิจารณ์ผลการศึกษา

5.1 สรุปผลการวิจัย

เมื่อนำมาศึกษารูปร่างและลักษณะภายนอกของกุ้งก้ามแดง พบว่าจากการวิเคราะห์กุ้งก้ามแดงที่นำมาจากฟาร์มต่างๆ มีลักษณะภายนอกที่สมบูรณ์ คือ กุ้งก้ามแดงมีรูปร่างปกติและมีอวัยวะครบ มีสีน้ำตาลอมเขียวตามธรรมชาติของกุ้ง ส่วนหัวติดแน่นกับส่วนลำตัว เปลือกแข็งเป็นเงามันตามธรรมชาติ เนื้อติดแน่นกับเปลือก เนื้อแน่น ค่อนข้างใส สะอาด ไม่มีตำหนิที่เห็นได้ชัดเจน เช่นแผลตามลำตัว หรือความพิการ ปราศจากปรสิตหรือร่องรอยที่เกิดจากการติดเชื้อหรือเป็นโรคเมื่อตรวจสอบด้วยตา ปราศจากกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ ตามมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 7019-2556 และเมื่อพิจารณาสีของเนื้อกุ้ง มีสีชมพูใส

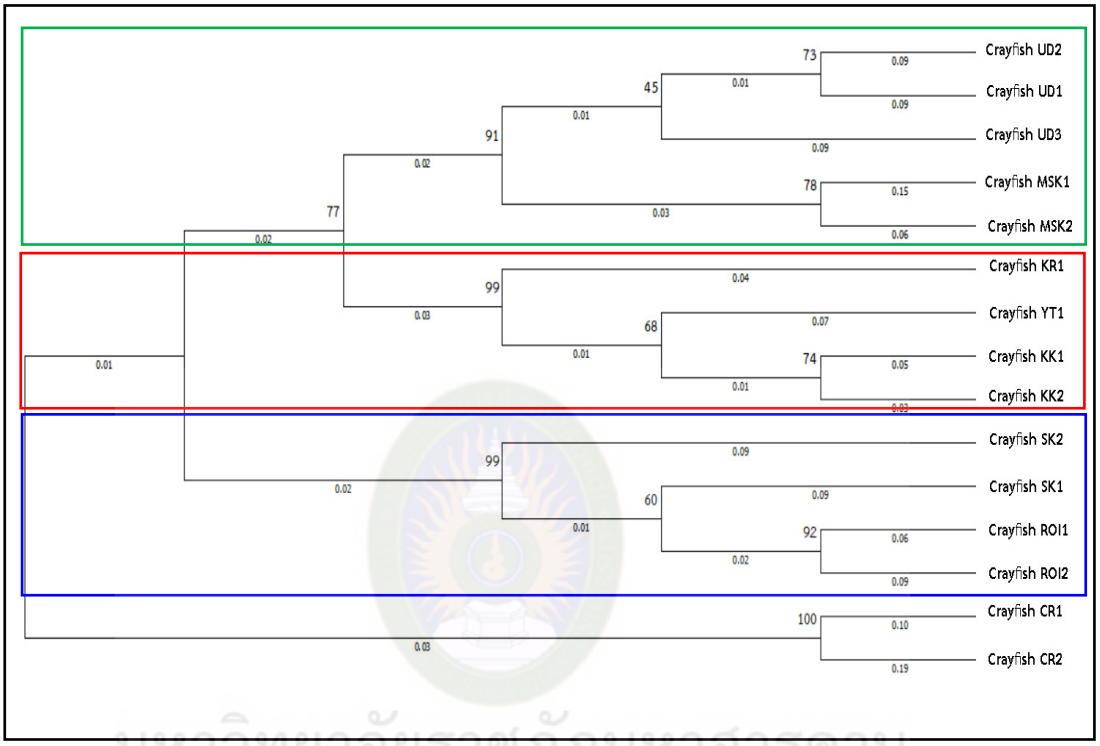
เกษตรกรส่วนใหญ่มีระบบการจัดการที่ดีขึ้น เพราะมีประสบการณ์เกี่ยวกับโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวของกุ้งก้ามแดง ในปี 2559-2560 ที่ผ่านมา โดยทุกฟาร์มมีการกำจัดกุ้งที่เป็นโรคและเรียนรู้วิธีปฏิบัติอย่างถูกต้องตามคำแนะนำของกรมประมง ส่วนข้อมูลด้านการตลาด เกษตรกรส่วนใหญ่พบปัญหาด้านการผลิตที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค ซึ่ง ปัจจุบันราคาสินค้ากุ้งก้ามแดงเพื่อการบริโภค แบ่งตามขนาดและราคาได้ดังนี้

1. ขนาดกุ้งก้ามแดง 6-10 ตัวต่อกิโลกรัม ราคาเฉลี่ย 1,200 บาท
2. ขนาดกุ้งก้ามแดง 10-15 ตัวต่อกิโลกรัม ราคาเฉลี่ย 750-850 บาท
3. ขนาดกุ้งก้ามแดง 16-25 ตัวต่อกิโลกรัม ราคาเฉลี่ย 450-550 บาท
4. ขนาดกุ้งก้ามแดง 25-30 ตัวต่อกิโลกรัม ราคาเฉลี่ย 350-450 บาท

ดังนั้นตลาดของกุ้งก้ามแดงเพื่อการบริโภคเนื้อจึงอยู่บนพื้นฐานของราคาความเป็นจริงที่ผู้บริโภคยอมรับได้โดยเฉพาะปัจจุบันการบริโภคกุ้งก้ามแดงส่วนใหญ่เป็นกลุ่มนักท่องเที่ยวชาวจีน ที่มีความนิยมอย่างมากการตลาดของกุ้งก้ามแดงขนาดตัวเล็กสุดและราคาที่ผู้บริโภคเข้าถึงได้ง่าย เกษตรกรจึงส่งขายได้ตามร้านบุปเฟ่ที่อยู่ตามแหล่งท่องเที่ยวในเขตพื้นที่ เมืองพัทยา และภูเก็ต เป็นต้น

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน Cytochrome C oxidase I (COI) ของไมโทคอนเดรีย ด้วยไพรเมอร์ที่มีลักษณะเป็น universal primers ที่จำเพาะต่อยีน COI (COI-C03 -5’ ACYTCYGGRTGACCAARAAYCA 3’- COI-C01 -5’ TYTCWACWAAY CAYAAAGAYATTGG 3’) ในปฏิกิริยา PCR หลังจากเพิ่มปริมาณแล้วตรวจสอบคุณภาพของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700-800 คู่เบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของตัวอย่างในฐานข้อมูล Genebank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูลมากกว่า 70% เมื่อนำนิวคลีโอไทด์

ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถนำไปวิเคราะห์ความเหมือนหรือความแตกต่าง (identity and similarity) ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 606 คู่เบส



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 5.1 Phylogenetic tree of *COI* sequences of crayfish was constructed using Neighbor joining method by MEGA version 6.0. The number on the branches are bootstrap confidence levels.

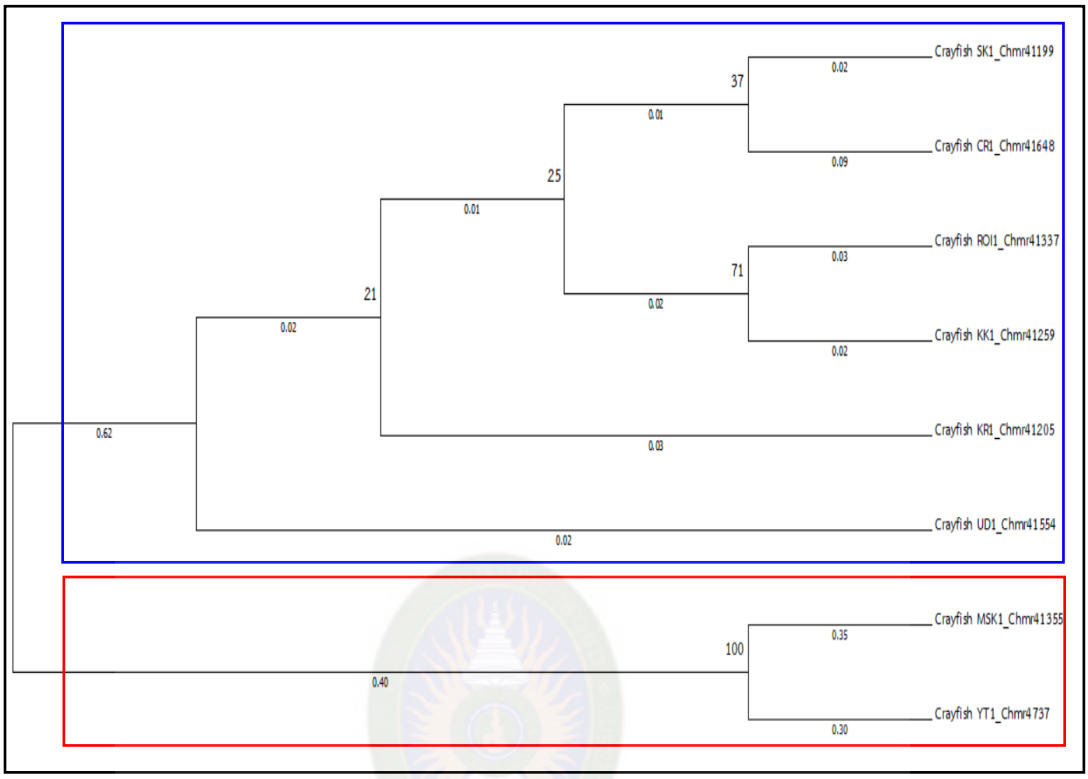
เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจาก 8 จังหวัด โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI โดยใช้ไพรเมอร์ COI-C03 -5’ ACYTCYGGRTGACCAARAAYCA 3’- COI-C01 -5’ TYTCWACWAAY CAYAAAGAYATTGG 3’) ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI สามารถแบ่งประชากรของกุ้งก้ามแดงออกจากกันได้ โดยใช้แบบแผนการสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor joining และ Maximum Likelihood สามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มจังหวัดต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน โดยกลุ่มประชากรของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดต่างๆ ขอเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดเชียงราย มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่าจังหวัดอื่น ๆ กลุ่มที่ 2 กุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจาก

จังหวัดอุดรธานีมีความใกล้ชิดกับกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดมหาสารคาม เนื่องจากรับตัวอย่างกุ้งก้ามแดงแม่พันธุ์ พ่อพันธุ์จากเกษตรกรจังหวัดมหาสารคาม ทำให้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง 0.19-0.24 กลุ่มที่ 3 ตัวอย่างกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดขอนแก่น จังหวัดยโสธร และจังหวัดนครราชสีมา มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง 0.19-0.37 กลุ่มที่ 4 คือกลุ่มตัวอย่างกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดยโสธร และจังหวัดสระแก้ว ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง 0.18-0.25

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI โดยใช้ไพรเมอร์ Chmr4-C03 -5’ ACYTCRGGRTGRCCRAARAATCA 3’- Chmf4 -5’ TYTCWACWAAYCAYAAAGAYATCGG 3’-) เพื่อใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของกุ้ง Crayfish ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดความยาวแตกต่างกันตั้งแต่ 1,000 ถึง 1,600 คู่เบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของตัวอย่างในฐานข้อมูล Genebank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูลมากกว่า 70% เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถนำไปวิเคราะห์ความเหมือนหรือความแตกต่าง (identity and similarity) ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 622 คู่เบส

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจาก 8 จังหวัด โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI โดยใช้ไพรเมอร์ Chmr4-C03 -5’ ACYTCRGGRTGRCCRAARAATCA 3’- Chmf4 -5’ TYTCWACWAAYCAYAAAGAYATCGG 3’-) ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI สามารถแบ่งประชากรของกุ้งก้ามแดงออกจากกันได้ โดยใช้แบบแผนการสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Neighbor joining และ Maximum Likelihood สามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มจังหวัดต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน โดยกลุ่มประชากรของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดต่างๆ ขอเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดสระแก้ว เชียงราย ขอนแก่น นครราชสีมา อุดรธานี และจังหวัดร้อยเอ็ด ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง 0.05-0.13 กลุ่มที่ 2 กุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดยโสธร มีความใกล้ชิดกับกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดมหาสารคาม มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.43

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ 5.2 The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model . The tree with the highest log likelihood (-3238.9445) is shown. There were a total of 622 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

จากการประชุมเครือข่ายผู้เลี้ยงกุ้งก้ามแดง ได้พบปัญหาที่เกษตรกรเป็นกังวลสำหรับการเลี้ยงกุ้งก้ามแดง คือการเป็นโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงได้ทำกิจกรรมย่อยในสวนของการสำรวจและติดตามเฝ้าระวังโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot disease) ในกุ้งเดสทรัคเตอร์ (*Cherax destructor*) กุ้งก้ามแดง *(Cherax quadricarinatus)* ซึ่งกิจกรรมการสำรวจและติดตามเฝ้าระวังโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot disease) ในกุ้งเดสทรัคเตอร์ (Cherax destructor) กุ้งก้ามแดง (Cherax quadricarinatus) ถือเป็นเรื่องที่สำคัญต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามแดงในประเทศซึ่งจะส่งผลต่อการสร้างองค์ความรู้ที่ดีต่อตัวเกษตรกร การบริหารจัดการฟาร์มที่ถูกต้อง ระบบการผลิตและการวางแผนการตลาดที่เหมาะสมต่อการสร้างอาชีพที่ดีของตัวเกษตรกรและความรับผิดชอบต่อสังคม

ต่อผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ และผลจากการจัดโครงการค่ายอบรมเชิงปฏิบัติการ “ ความรู้จากการวิจัยเพื่อขจัดปัญหาการเลี้ยงกุ้งก้ามแดง ” โดยเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งเครย์ฟิชในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีเกษตรกรเข้าร่วม 33 คน เป็นเพศหญิง 16 และเพศชาย 17 คน ภาพรวมใน ด้านความรู้อยู่ในความพึงพอใจระดับมากที่สุด ด้านวิทยากรและผู้ดำเนินการจัดกิจกรรมอยู่ในความพึงพอใจระดับมากที่สุด ด้านการดำเนินงานในการจัดกิจกรรมอยู่ในความพึงพอใจระดับมากที่สุด ความพึงพอใจในภาพรวมอยู่ในความพึงพอใจระดับมากที่สุด

5.2 วิจารณ์ผลการวิจัย

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โคดสามารถใช้ในการจัดจำแนกสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั้ง 10 ชนิดออกจากกันได้ ซึ่งแนวความคิดในการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงเอกลักษณ์จำเพาะชนิดของสิ่งมีชีวิต ถูกเสนอขึ้นโดย Hebert และคณะ (2003) ได้เสนอคำว่าดีเอ็นเอบาร์โคด เพื่อใช้สำหรับเรียกดีเอ็นเอบริเวณหนึ่ง ๆ ในจีโนมที่สามารถจำแนกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดออกจากกันได้ โดยได้ทดสอบดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียบริเวณยีน Cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*Cox1* หรือ *COI*) โดยมีความยาว 648 คู่เบส ในการระบุชนิดสัตว์ และพบว่าเป็นเครื่องมือในการระบุชนิดสัตว์หลายกลุ่มได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้มีความยาวของยีน *COI* ที่ได้จากการเพิ่ม ด้วยไพรเมอร์ที่มีลักษณะเป็น universal primers ชนิด COI-C03 -5’ ACYTCYGGRTGACCAARAAYCA 3’- COI-C01 -5’ TYTCWACWAAY CAYAAAGAYATTGG 3’) ในปฏิกิริยา PCR หลังจากเพิ่มปริมาณแล้วตรวจสอบคุณภาพของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700-800 คู่เบส และไพรเมอร์ Chmr4 - C0 3 - 5 ’ ACYTCRGGRTGRCCRAARAATCA 3 ’ - Chmf4 - 5 ’ TYTCWACWAAYCAYAAAGAYATCGG 3’-) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดความยาวแตกต่างกันตั้งแต่ 1,000 ถึง 1,600 คู่เบส เหตุที่ได้จำนวนลำดับนิวคลีโอไทป์มากกว่างานวิจัยที่ผ่านมาเนื่องจากเป็นตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้านของผลผลิต (5’ ⟶ 3’ และ 3’ ⟶ 5’) ทำให้ได้ยีนที่มีความยาวมากกว่า

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

5.3 ข้อเสนอแนะในงานวิจัยครั้งต่อไป

1. การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบบาร์โค้ดสามารถใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถใช้ศึกษาวิวัฒนาการ และความใกล้ชิดของสายพันธุ์กุ้งก้ามแดงได้ แต่หากต้องการความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้นควรมีการใช้ยีนหลายๆ บริเวณ เช่น *COI*, *Cytochrome b* หรือ *ND4* ซึ่งเป็นบริเวณยีนที่มีความแปรผันที่นิยมนำมาใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสัตว์

2. ควรใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามแดงร่วมด้วย จะได้ช่วยยืนยันการแยกกลุ่มประชากรของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากถ้านำไปใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างวิวัฒนาการของประชากรสัตว์น้ำในระบบแหล่งน้ำธรรมชาติ
3. ในปัจจุบันความนิยมเลี้ยงกุ้งก้ามแดงลดลง ทำให้การหาตัวอย่างเริ่มยากขึ้น ฟาร์มกุ้งก้ามแดงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือปิดตัวลงหลายที่ เนื่องจากประสบปัญหาจากการบริหารจัดการน้ำ การหาตลาดรองรับค่อนข้างน้อย และระบบการบริหารจัดการของเกษตรกรเอง ทำให้ปัจจุบันตลาดในการผลิตกุ้งก้ามแดงจะกระจุกตัวแถบภาคตะวันออก และภาคกลาง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บรรณานุกรม

กันยารัตน์ ไชยสุต. 2532. **เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล *Zephyranthes*.** ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ปรีชา ประเทพา. 2543. **เทคโนโลยีชีวภาพ : การปรับแต่งพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม.** มหาสารคาม: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

จุฑามาศ วงศ์ภูมิ และบุญมี กวินเสกสรร. มปป. การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมกุ้งเคยโดยเทคนิค RAPD. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://sci.bsru.ac.th/dept/micro/picnew/mut.doc (10 กันยายน 2559).

จอมสุดา ตวงวงษา. 2546. **ความแปรผันทางพันธุกรรมกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium osenbergii* de Man) จากประเทศไทยและพม่าโดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ฉวีวรรณ หนูนุ่น. 2554. "**กุ้งก้ามบนดอย.**" [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://job.numsai.com/ (3 กันยายน 2559).

พึ่งบุญ ง้วนสูงเนิน. 2552. **การเลี้ยงกุ้งเครย์ฟิชโดยใช้ดินเป็นวัสดุรองพื้น.** ปัญหาพิเศษ สาขาวิชาการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ วิทยาเขตชุมพร.

ปรีชา ประเทพา. 2543. **เทคโนโลยีชีวภาพ : การปรับแต่งพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม.** มหาสารคาม: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ศุภมิตร เมฆฉาย. 2555. การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์. **แก่นเกษตร 40** ฉบับพิเศษ 2 : 51-54.

อัญชลี ทัศนาขจร. 2546. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างประชากรกุ้งกุลาดำในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซเทลไลต์. **วารสารวิธีวิทยาการวิจัย** ปีที่ 16 ฉบับที่ 3: 359-373.

โอปอล์ สิวะสุธรรม, สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี, สถาพร ดิเรกบุษราคม และ ปิยะพงค์ โชติพันธุ์. 2556. การประเมินสมรรถภาพการเจริญเติบโตในกุ้งกุลาดาที่ผสมตามธรรมชาติจากข้อมูลความสัมพันธ์ทางโมเลกุล. **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์: พันธุศาสตร์ก้าวหน้า**

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM RAJABHAT UNIVERSITY

สู่อาเซียน (Genetics towards ASEAN) 17-19 กรกฎาคม 2556 ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ สุขุมวิท กรุงเทพมหานคร.

Filipová, L. Grandjean, F. Chucholl, C. Soes, D. M. and Petrusek A. 2011. Identification of exotic North American crayfish in Europe by DNA barcoding. **Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems** (11): 1-14.

Frezal, L. and Leblois, R. 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. Infection. **Genetics and Evolution** 8: 727-736.

Herbert, P.D.N., Ratnasingham, S. And deWaard, J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome coxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B 270**: S96-S99.

Marzano, F. N., Scalici, M., Chiesa, S., Gherardi, F., Piccinini, A. and Gibertini, G. 2009. The first record of the marbled crayfish adds further threats to fresh waters in Italy. **Aquatic Invasions** 4(2): 401-404.

Wong, L. L., Peatman, E., Lu, J., Kucuktas, H., He, S., Zhou, C., Na-nakorn, U. and Liu, Z. 2011. DNA Barcoding of Catfish: Species Authentication and Phylogenetic Assessment. **Open Access Freely Available Online** 6(3):1-7.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Gustavo, L. S. and Molina, F. W. 2005. Karyotype diversification in fishes of the Balistidae, Diodontidae and Tetraodontidae (Tetraodontiformes). **Caryologia** 58(3): 229-237.

Hadrys, H., Balick, M. and B. Schierwater. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Mol. Ecol.** 1: 55-63.

Hardie, D. C. and Hebert, P. D. N. 2003. The nucleotypic effects of cellular DNA content in cartilaginous and ray-finned fishes. **Genome** 46: 683-706.

Herbert, P.D.N., Ratnasingham, S. And deWaard, J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome coxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B 270**: S96-S99.

Hinegardner, R. and Rosen, D. E. 1972. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. **The American Naturalist** 106: 621-644.

Hirata, J. and Urushido, T. 2000. Karyotypes and DNA contents in Osteoglossiformes fishes. **Science Report of the Reseach Institute of Evolutionary Biology** 9: 83-90.

Howell, W .M. and Black, D. A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36(8): 1014-1015.

Kaewsri, S. 2014. **Cytogenetics of Some Species of the Families Scaridae and Labridae**. Ph.D. Thesis. Graduate School, Khon Kaen University.

King, M. 1993. **Species evolution: The role of Chromosomes Change**. Cambridge: Cambridge University Press.

Lakra, W. S. and Rishi, K. K. 1991. Chromosomes of Indian fishes: an annotated list. **The Indian Journal of Animal Sciences** 61: 342-349.

Mabuchi, K., Arai, R. and Nishida, M. 2002. Karyotypes and nuclear DNA contents of two *Pseudolabrus* species from the southern coast of Japan. **Japanese Journal of Zoology** 49:87-95.

Maloyjo. J, Bhattacharjee, B. A., Laskar, B. D. and Sankar K. G. 2012. Identification and Re-Evaluation of Freshwater Catfishes through DNA Barcoding. **Open Access Freely Available Online 7(11)**: 1-7.

Malakar, A. K., Lakra, W. S., Goswami, M. and Mishra, R.M. 2013. Genetic differentiation of Ompok bimaculatus (Teleostei: Siluridae) population based on mtDNA cytochrome b gene. **Mitochondrial DNA 24 (2):** 145-150.

Mani, I., Kumar, R., Singh, M., Kushwaha, B., Nagpure, N.S., Srivastava, P.K. and Lakra, W.S. 2013. Chromosomal distribution of constitutive heterochromatin in eight species of mahseers (Family: Cyprinidae) from India. **Indian Journal Biotechnology** (12):178-186.

Martinez, A. P., Araujo, C. W. and Molina, F. W. 2010. Derived cytogenetic traits, multiple NORs and B chromosomes in the compact karyotype of *Canthigaster figueiredoi* (Tetraodontiformes). **Marine Genomics** 3: 85-89.

Miyaki, K., Tabeta, O. and Kayano, H. 1995. Karyotypes in six species of

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

pufferfishes genus *Takifugu* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes). **Fisheries Science** 61: 594-598.

Nanda, I., Schartl, M., Feichtinger, W., Schlupp, I., Parzefall, J. and Schmid, M. 1995. Chromosomal evidence for laboratory synthesis of a triploid hybrid between the gynogenetic teleost Poecilia Formosa and its host species. **Journal of Fish Biology** 47(4):619-623.

Nelson, J. S. 1994. **Fishes of the World**. 3rd ed. John Wiley & Sons., New York.

Nelson, J.S. 2006. **Fishes of the world**. 4th ed. John Wiley and Sons., New York.

Ojima, Y. and Yamamoto, K. 1990. Cellular DNA contents of fishes determined by flow cytometry. **La Kromosomo II** 57: 1871-1888.

Olivara, C. C. and Galetti, M. P. 1995. cytogenetic studies of Two puffer species (*Sphoeroides*, Tetraodontidae) from Rio de Janeiro Coast, Brazil. **Cytologia** 60:369-374.

Painter, T. S. 1923. Studies in mammalian spermatogenesis II. **Journal of Experimental Zoology** 37(3): 291-336.

Rainboth, W. J. 1996. **Fishes of the Cambodian Mekong.** FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. Mekong River Commission. FAO and DANIDA.

Rooney, D. E. 2001. **Human Cytogenetics: Constutitional Analysis: a Practical Approach**. Oxford University Press, London.

Rooney, D. E. and Czepulkowski, B. H. 1986. **Human Cytogenetics.** IRL Press, Oxford.

Sá-Gabriel, L. G. and Molina, W. F. 2005. Karyotype diversification in fishes of the Balistidae, Diodontidae and Tetraodontidae (Tetraodontiformes). **Caryologia** 58: 229-237.

Sahoo, P. K., Baral, A. and Ponniah, A. G. 1997. Replication banding in *Channa punctata* (Channidae, Pisces). **Chromosome Science** 1: 123-125.

Sharma, O. P., Tripathi, N. K. and Sharma, K. K. 2002. A review of chromosome banding in fishes. In: **Some Aspects of Chromosome Structure and Functions.** Sobti, R.C. (Ed.).Narosa Publishing House, New Delhi.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Shipp, R. L. 2003. **Tetraodontidae, Puffers**. University of South Alabama, USA.

Tamrongnawasawad, T., Saisaeng, A., Temboonkiet, B. and Sumanatemeya, N. 2004. **Marine Fish of Thailand**. 2nd ed. Banpra-Artith Press, Bangkok.

Smith, H. M. 1945. **The Freshwater Fishes of Siam or Thailand.** United States Government. office, Washington.

Turpin, R. and Lejeune, J. 1965**. Les Chromosomes Humains**. Gauthier-Villars, Paris.

Veeruraj, A., Arumugam, M., Ajithkumar, T. and Balasubramanian, T. 2011. Distribution of tetraodontiformes (Family: Tetraodontidae) along the Parangipettai Coast, Southeast coast of India. **Zootaxa** 3015: 1-12.

Vidthayanon, C., Karnasuta, J. and Nabhitabhata, J. 1997. **Diversity of freshwater fishes in Thailand**. Integrated promotion technology Company, Bangkok.

Vidthayanon, C. 2008. **Marine Fish Guide**. Sarakhadee Press, Bangkok.

Vinogradov, A. E. 1998. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship**. Cytometry** 31: 100-109.

Wang, J. X. and Zhao, X. F. 1993. Chromosome study of three species of tetraodontiform fishes. **Zoological Research** 14: 345-346.

Wike, W. S. 1989. **Therapy in Rheumatic Disease.** Maccel Dekker, New York.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. and Hebert, P. D. N.. 2005. DNA barcoding Australia' s fish species. **Philosophical Transactions of The Royal Society**. 360: 1847-1857.

Wong, L. L., Peatman, E., Lu, J., Kucuktas, H., He, S., Zhou, C., Na-nakorn, U. and Liu, Z. 2011. DNA Barcoding of Catfish: Species Authentication and Phylogenetic Assessment. **Open Access Freely Available Online** 6(3):1-7.

Yuksel, E. and Gaffaroglu, M. 2008. The analysis of nucleolar organizer regions in *Chalcalburnus mossulensis* (Pisces: Cyprinidae). **Journal of Fisheries Science** 2(3): 587-591.

Yunis, J. J. 1976. High resolution of human chromosome. **Science** 191: 1268-1270.

Zhao, X. F., Wang, J. X., Yang, Q. and Zhang, J. L. 1994. Karyotype analysis of five species of marine fishes. **Zoological Research** 15: 103-106.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

1. (ชื่อ - สกุล ไทย) นางสาวพันธิวา แก้วมาตย์

   (ชื่อ – สกุล อังกฤษ) Mis.Puntivar Kaewmad

2. ตำแหน่งวิชาการปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. สถานที่ทำงาน

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000 โทรศัพท์: 043-742620 โทรสาร: 043-742620

e-mail: juujunk@hotmail.com โทรศัพท์มือถือ: 086-9546466

4. ประวัติการศึกษา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) ชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.) ชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปร.ด.) ชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

5. ประสบการณ์ด้านการวิจัย

งานวิจัยทางด้านชีววิทยา , พันธุศาสตร์เซลล์

6. ประสบการณ์ด้านการเผยแพร่งานวิจัยทั้งภายในและนอกประเทศ

6.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

พันธิวา แก้วมาตย์. 2553. พันธุศาสตร์เซลล์ของเสือบางชนิดในประเทศไทย. **สัมมนาสัตว์ป่าเมืองไทย ครั้งที 31** (32) ณ คณะวณศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พันธิวา แก้วมาตย์. 2554. การวิเคราะห์คาริโอไทป์และระบบโครโมโซมเพศของอ้นกลาง. **สัมมนาสัตว์ป่าเมืองไทย ครั้งที 32** (58) ณ คณะวณศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พันธิวา แก้วมาตย์ และพรณรงค์ สิริปิยะสิงห์. 2555. การสำรวจและขยายพันธุ์พืชสมุนไพรวงศ์ขิงข่า (Zingiberaceae) ในจังหวัดมหาสารคามด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์ของชาวบ้าน; กรณีศึกษาในเขตอำเภอเมือง. **การประชุมวิชาการความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่น: บูรณาการองค์ความรู้สู่การพัฒนาท้องถิ่นอย่างยั่งยืน ครั้งที่ 1** ณ อาคารสถาบันภาษาและคอมพิวเตอร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย.

บทความวิจัย/บทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสารฐาน TCI และฐานข้อมูลอื่นๆ

สมาน ศรีสะอาด พันธิวา แก้วมาตย์ ทองสุก พละมา นุกูล กุดแถลง และพรณรงค์ สิริปิยะสิงห์. 2555.การศึกษาเปรียบเทียบปุ๋ยพืชสด 3 ชนิดเพื่อปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดินและเพิ่มผลผลิตข้าวหอมมะลิ 105 ในพื้นที่ปลูกหนองบ่อ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร 2(1). 1-6.

Kaewmad, P., Tanomtong, A and Khunsook, S. 2007. A Study on Karyotype of the Asian Leopard Cat, *Prionailurus bengalensis* (Carnivora, Felidae) by Conventional Staning, G-banding and High-resolution Technique. **Cytologia** 72(1) : 101-110.

Tanomtong, A., Khunsook, S., Kaewmad, P. and Siripiyasing, P. 2008. Karyological Study of the Jungle Cat, *Felis Chaus* (Carnivora, Felidae) by Conventional Staning, G-banding and High-resolution Technique. **Cytologia** 73: 61-70.

Tanomtong, A., Khunsook, S., Kaewmad, P. and Bunjonrat, R. 2008. Standardized Karyotype and idiogram of the Clouded Leopard, *Neofelis nebolosa* (Carnivora, Felidae) by Conventional Staning, G-banding and High-resolution Technique. **Cytologia** 73: 71-80.

Tanomtong, A., Khunsook, S., Kaewmad, P. and Pintong, K. 2008. Cytogenetic Study of the Leopard, *Panthera pardus* (Carnivora, Felidae) by Conventional Staning, G-banding and High-resolution Technique. **Cytologia** 73: 81-90.

Tanomtong, A., Kaewmad, P., Khunsook, S., and Kaewsri, S. 2009. Cytogenetic Studies of Fishing Cat, *Prionailurus viverrinus* (Bennett 1833) and Asiatic Golden Cat, *Catopuma temminckii* (Vigors and Horsfield 1827) by Conventional Staining, G-banding and High-resolution Techniques. **Cytologia** 74: 3-15.

Supiwong, W., Tanomtong, A., Jumrusthanasna, S., Kaewmad, P., Siripiyasing, P. and Sanoamuang, L. 2013. First report of NORs polymorphism and

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

chromosome analysis of John's snapper, Lutjanus johnii (Perciformes, Lutjanidae) in Thailand. 78(4): Accepted. (ISI impact factor 0.43, 2011)

Watee Kongbuntad, Puntivar Kaewmad and Alongklod Tanomtong. 2013. Semen Quality and Artificial Insemination of Eastern Sarus Crane Grus antigone shapii Linn. In Captive Condition in the Nakhon Ratchasima Zoo, Thailand. **World Applied Sciences Journal** 28 (1): 145-152.

Keawmad, P., Tanomtong, A., Kaewboribut, T., Wonkaonoi, W.,Khunsook, S. and Sianoamuang, L. 2013. First karyological analysis of black crowned crane (*Balearica pavonina*) and scaly breasted munia (*Lonchura punctulata*). **Cytologia** 78 (3): 205-211.

Alongklod Tanomtong, Sumpars Khunsook, Pawarisa Boonhan, Puntivar Kaewmad, Anan Kenthao and La-Orsri Sanoamuang. 2013. The First Karyological Analysis, Natural NOR Polymorphism, and Delineation of the X1Y,X2Y/X1X2 Multiple Sex Cromosome System of the Hoary Bamboo Rat (Rhizomys pruinosus) **Cytologia** 78(4) 1-15.

Kaewmad, P. Monthatong, M. Supiwong, W. Saowakoon, S. and Tanomtong, A. 2014. Natural Autotetraploid and Chromosomal Characteristics in the Subfamily Botiinae (Cypriniformes, Cobitinae) from Northeast Thailand. **Cytologia** 79(3): 299–313.

Supiwong, W., Tanomtong, A., Pinthong, K., Kaewmad, P., Poungnak, P. and Jangsuwan, N. 2015. The First Chromosomal Characteristics of Nucleolar Organizer Regions and Karyological Analysis of Pink Anemonefish, *Amphiprion perideraion* (Perciformes, Amphiprioninae). **Cytologia** 80 (3): 271-278.

Isara Patawang, A. Tanomtong, P. Kaewmad, Y. Chuaynkern and P. Duengkae. 2016. New record on karyological analysis and first study of NOR localization of parthenogenetic brahminy blind snake, Ramphotyphlops braminus (Squamata, Typhlopidae) in Thailand**. Nucleus** 59 (1)**:** 61-66.

Sreeputhorn, K., Mangumphan, K., Muanphet, B., Tanomtong, A., Supiwong,W. and Kaewmad, P. 2017. The first report on chromosome analysis of F1 hybrid

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

catfish: Mekong giant catfish (Pangasianodon gigas) ? striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) and spot pangasius (*Pangasius larnaudii*) x *Pangasianodon hypophthalmus* (Siluriformes, Pangasiidae). **Cytologia** 82(4): 457-463.

Supiwong, A., Phimphan, S., Kaewmad, P., Saenjundaeng, P., Jantarat, S., and Tanomtong A. 2017. First cytogenetic study of the whitecheek monocle bream, *Scolopsis vosmeri* (Perciformes, Nemipteridae) from Thailand. **Cytologia** 82(5): 481-484.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ก.
การเตรียมสารเคมี

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

รายการวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และการเตรียมสารต่างๆ

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีในการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์

1.1 วัสดุอุปกรณ์

- บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ
- Hot plate และ magnetic stirrer
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 15 มล.
- กระบอกฉีดยา (syring) และเข็มฉีดยาขนาดต่าง ๆ
- Automicropipette, micropipette tips และ pipette ขนาดต่าง ๆ
- โถสำหรับย้อมสี (staining jar)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องกรองสาร และ Millipore membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครลิตร
- เครื่องชั่งแบบละเอียด (balance)
- โถดูดความชื้น
- ตู้เย็น
- เครื่อง suction
- อ่างน้ำอุ่น (water bath)
- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- เครื่อง vortex mixture
- ตู้เพาะเลี้ยง (incubator)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow carbinet)
- กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.2 สารเคมี

- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- โคลชิซิน (colchicine)
- กรดอะเซติกเข้มข้น (glacial acetic acid)
- เมทานอล (methanal)
- เอทานอล 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์ (ethanol 95% และ 70%)
- สีย้อมจิมซ่า (Giemsa's stain)
- โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaHPO_4$)

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

2. การเตรียมอาหารและสารเคมี

การเตรียม hypotonic solution

การเตรียมสาร Hypotonic solution 0.075 M HCl

น้ำยาที่ใช้เตรียม

1. KCl crystal
2. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม

ชั่งผลึก KCl 0.5588 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. เขย่าจนผลึกละลายหมด เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ : น้ำยานี้มีอายุการใช้งาน 1-2 สัปดาห์ ก่อนใช้ต้องนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การเตรียม colchicine

- สูตรที่ 1 ชั่ง Colchicine 0.002 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มล. ได้ความเข้มข้น 0.2 มก./มล.
- สูตรที่ 2 ชั่ง Colchicine 0.001 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มล. ได้ความเข้มข้น 0.1 มก./มล.

Colchicine powder เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การเตรียม fixaive

สารที่ใช้เตรียม

1. Glacial acetic acid
2. Absolute methanol

วิธีเตรียม

ใช้ glacial acetic acid 1 ส่วน ผสมกับ absolute methanol 3 ส่วน เก็บใสขวดแช่ในตู้เย็น ควรทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การเตรียม Sorensen buffer

สารที่ใช้เตรียมการเตรียม

1. Stock solution A : ใช้ KH_2PO_4 9.1 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มล.

2. Stock solution B : ใช้ $NaHPO_4$ 9.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มล.

วิธีเตรียม

ใช้ stock solution A ปริมาณ 50.8 มล. ผสมกับ stock solution B ปริมาณ 49.2 มล. จะได้ Sorensen buffer (pH 6.8) 100 มล.

การเตรียมสีย้อม Giemsa's

การเตรียมสีจิมซ่า 10% (10% Giemsa's solution)

สีจิมซ่า 10% เตรียมจาก Giemsa's stain ใช้ชนิด stock Giemsa's solution โดยดูดสีจิมซ่าจาก stock Giemsa's solution มา 5 มล. ละลายใน Sorensen buffer 45 มล.

สารละลาย 1 N NaOH

น้ำยาที่ใช้เตรียม

1. NaOH crytal
2. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 500 มล.)

2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

1.1 วัสดุอุปกรณ์

(1) Auto-Pipette ขนาด 0.5-10 µl

(2) Auto-Pipette ขนาด 2-20 µl

(3) Auto-Pipette ขนาด 10-100 µl

(4) Auto-Pipette ขนาด 100-1,000 µl

(5) dNTP set

(6) Micro Pipette Tip 0.1-10 µl

(7) Micro Pipette Tip 10-200 µl

(8) Micro Pipette Tip 200-1,000 µl

(9) Micro Tube ขนาด 200 µ

(10) Micro Tube ขนาด 1.5 ml

(11) เครื่องถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

(12) เครื่องกลั่นน้ำ

(13) เครื่อง gel electrophoresis

(14) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

(15) เครื่องทำ PCR (PCR machine:CR cobett Research)

(16) เครื่องปั่นเหวี่ยง

(17) ตู้ควบคุมความเย็นเก็บตัวอย่าง -20° C

(18) ตู้เย็น

(19) ตู้อบฆ่าเชื้อ

(20) หม้อนึ่งความดันไอ

(21) ถุงมือยาง เบอร์ M

(22) หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 20 ml

(23) อลูมิเนียมฟอยด์ ขนาด 24/18 นิ้ว

(24) อ่างน้ำอุ่น (water bath)

1.2 สารเคมี

(1) Bromophenol blue ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)

(2) ß-mercaptoethanol ($HSCH_2CH_2OH$)

(3) Chlrofrom ($CHCl_3$)

(4) Enzyme Taq DNA polymerase

(5) Ethanol (CH_3CH_2OH)

(6) Ethidium bromide (EtBr: $C_{21}H_{20}BrN_3$)

(7) Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA: $C_{10}H_{16}N_2O_8$)

(8) GenePure Agarose

(9) Isopropanol (C_3H_8O)

(10) Phenol (C_6H_5OH)

(11) Primers

(12) Protienase K

(13) RNase A

(14) Silica gel

(15) Sodium chloride (NaCl)

(16) Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

(17) TAE buffer

(18) TE buffer

(19) Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)

การเตรียมสารต่างๆเพื่อใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมเจล อะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

ส่วนผสม

1. agarose	0.6	กรัม
2. 1X TAE buffer	30	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม ชั่งสาร agarose ให้ได้ปริมาณ 0.6 กรัม ใส่ในขวดทดลอง เติม1X TAE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม นำไปอุ่นในเตาอบไมโครเวฟ หรือในอ่างน้ำอุ่น เมื่อเดือดให้เอาขวดทดลองออกมา แกว่งเพื่อให้ agarose ละลายได้ดียิ่งขึ้น อุ่นจนกว่าพบว่าได้สารละลายที่ใสไม่มีผง agarose เหลือในสารละลาย ทิ้งให้อุณหภูมิลดลงจนรู้สึกว่าสารละลายอุ่น ระหว่างนี้ให้แกว่งขวดทดลองเป็นระยะ เทสารละลายลงในถาดเตรียมเจล ที่จัดวางหวีเพื่อให้เกิดหลุมสำหรับหยอดดีเอ็นเอไว้แล้ว ทิ้งไว้ประมาณ 30-45 นาทีเพื่อให้เจลแข็งตัวก่อนนำไปใช้ให้ยกหวีออกอย่างระมัดระวัง

2. การเตรียมเจล อะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

ส่วนผสม

1. agarose	0.32	กรัม
2. 1X TAE buffer	40	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม มีขั้นตอนการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมเจล อะกาโรส ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซนต์

3. 1X TAE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ส่วนผสม

1. Tris-base	10.8	กรัม
2. glacial acetic acid	5.5	กรัม
3. 5 M EDTA	4	มิลลิลิตร
4. น้ำกลั่น	996	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

วิธีเตรียม ละลาย Tris-base, glacial acetic acid และ 5 M EDTA ในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อในเครื่องอบฆ่าเชื้อควบคุมความดัน ทิ้งให้เย็น แล้วเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. TE buffer ปริมาตร มิลลิลิตร

ส่วนผสม

1. Tris-base	0.303	กรัม
2. EDTA	0.093	กรัม

วิธีเตรียม ละลาย Tris-base และ EDTA ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ pH8.4 และปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร นำไปอบฆ่าเชื้อในเครื่องอบฆ่าเชื้อควบคุมความดัน ทิ้งให้เย็น แล้วเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. Loading buffer

ส่วนผสม

1. sucrose	40	กรัม
2. bromophenol blue	0.25	กรัม
3. น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม ละลาย sucrose และ bromophenol blue ในน้ำกลั่นจากนั้นเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ข.

ลำดับนิวคลีโอไทด์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

>Crayfish SK1_COI-CO1 695
CCAGTGAAGCTAGGATCGGAGCTAGATCAGAGTATAGTAGGCACTTCCCT
AAGACTGATTCTTCGGGCACCCCGAGAGTAACCCGGAAGATCAATCGGAG
ACGATCGCATTTATCATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCATAATGATT
TTCTTCATAGTTATGCCAATCATAATTGGGGGTTTTGGGAAATATGAAGT
TCCCCATAAACCTGGAGCCCCAGAAATAACCTTCCCTCCAAAAAATAATA
TAAGAATCTGAACTTTACCATTTTCTCTCTCCCCTCGTCTTACCAAGGGA
AATGTAAAGAGAGGGGTCCGGATCGGCTGGACCTTTTATCCTCCTCTAAC
AACATCCATCGCCCCGGGAAGGGCGACAGTCGACCTCTGCATCTTCCACC
TTCCTTTGGTCGGAGTCACCATGGTTCTCAGAGACGTGAATTTTATAATC
ACCACAATTCATATTCCAAACATAAGGATGATCATAGATGCGAATATTCT
TATGCACATGATCCGATCATCGCTACTGCAATAATTCCGGTTTATATCCC
TCCCCGCTTCTAACAGGAGAAATGACTATACATCTTATGAACGAAAACTT
AATCTTTACTCTTCTTTCGACCCTGCTGGCGGGGGGGGAGCTATTCACTA
CAACACTGATTCTGAGTCTTTCTGTAAGACTCAAAAGTAAAAAAA

>Crayfish SK2_COI-CO1 686
CAATTAAAATCTTGAGATTCTGAGAATGTAAGGTATAATAGGCACTTCCC
TAAGACTGATTCTTCGAGGCCGAACTTGGTAAACCAGGAAGATTAATCGG
AGACGATCAAATTTATAATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCGTAATGA
TTTTCTTCATAGTTATGCCAATCATAATTGGGGGTTTTGGGAATTTATTA
GTTCCCCTTATAATTGGAACCCCTGATATAACCTTTCCTCCAAAAAATAA
TAAAAAATTCTGAATTTTACCCTTTTTTCTCTCCCCTTCCCTTACCAGGG
GAATAATAAAAAGAGGTGTCGGGGCAAGGTGGACAATTTATCCTCCTCTA
ACAACATCCATCGCCCATGGAAGAAGAACAAACCACCCCATCGTCTTCCC
CCTTCCATTGGGCGGAGTGCCCCCGATTCCTGGAACCGTGAATTTTATAA
ACCCAACCATTCATTTACGAAAAAAAGGAATTCCCATATCCGAATTACCT
TAATTTTATGAATCATCCTCGTTTCTGGAAGAATTTTGCTTTTATCCCTC
CCCCCTCCACCCAGAGCAATAATTTACATCCTTCCGACCCAAAAATAAAC
CTACTTTTTTTTGCCCCCCCGGGGGGGGGGGGAGCCAATCCCCACCCAAA
ATTATTTTGGTTTTTTGGAAAGACAAAAAAAAAAAA

>Crayfish CR1_COI-CO1 689
TGGGTGAAAACCTAGGGATAGTAGGTACTGAGGTATAGTAGCACTTCCCT
AAGACTGATTCTTCGAGGCCCCCGAGGTAACCCGAAGATCAATCGGAGAC
GATCAAATTTATATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCGTAATGATTTTC
TTCATAGTTATACCAATCATAATTGGGGGTTTTGGGAATTGATTAGTTCC
CCTTATACTTGGAGCCCCTGATATAGCCTTCCCTCGAATAAATAATATAA
GATTCTGAATTTTACCATTTTCTCTCACCCTTCTCCTTACAAAGGGAATA
GTAAAAAGAGGTGTCAGGACCCGGTGGACACCTTATCCTCCTCTAACAAC
ATCAATCGGCCAGGGAAGAGCGTCAGTCGACCTAGGCATCTTCTCCCTTC
ATTTGGCCGGAGTCTCCTCGATTCTCGGAAGTGTGAATTTTATTACTACA
GCCATTCATATACCAACCACAAGGATATCCATAGACCCAATACCCTTAAT

CGTATGATCCGGCGCCGGTACTGCGGGTAATTCTGCTTTTATCCCTCCCC
CCTCCCACCAGGAGCCAATACTATACATCTTACAGACCGAAAAATTAAAC
ACTACTTTCTTTGACCCTGCGTGGGGGGGGGGATCCTATTCTCTACCAAC
ACTTATTCTGAGTTTTTTGGGAAGCCAAGAAGAAAAAAA

>Crayfish CR2_COI-CO1 686
ACAAATGGATCATAGGATCTGGGGTAATCAAGTATAGTAGCACTTCCCTA
AGACTGATTCTCGGGCACCCCGAGGTAACCAGGAAGATTAATCGGAGACG
ATCAAATTTATAATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCGTAATGATTTTC
TTCATAGTTATACCAATCATAATTGGGGGTTTTGGGAATTGATTAGTTCC
CCTTATACTTGGAGCCCCTGATATAGCCTTCCCTCGAATAAATAATATAA
GATTCTGACTTTTACCATTTTCTCTCACCCTTCTCCTTACAAGGGGAATA
GTAGAAAGAGGGGTCGGGACAGGGTGGACAGTTTATCCTCCTCTAACAAC
ATCAATCGCCCATGGAGGAGCGTCAGTCGACCTAGGCATCTTCTCCCTTC
ATTTGGCCGGAGTCTCCTCAATTCTCGGAGGTGTAAATTTTATAACGACA
GCAATCCATATACGAACCAGAGGGATATCCATAGACCGAATACCCTTATT
CGTATGATCCGTCTTCCTTACTGCAGTAATTCTGCTTTTATCCCTCCCCG
TTCCAACAAGAGCCATTACTATACCTCTTACAGACCGAAATCTAAACACT
ACTTTCTTGACCCTGCTGGCGGGGGAGATGCTATTCTCTACCAACACGTT
ATTCTGATTTTTTTGGTATGACTGGGGTGAAAAAAA

>Crayfish ROI1_COI-CO1 689
CCAGTATAAGCCAGAAACTCAGAGGTGCTCAGGTATAGTAGGCACTTCCC
TAAGACTGATTCTTCGAGCCACCCCGAGGTCACCAGGAAGATTAATCGGA
GACGATCAAATTTATAATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCGTAATGAT
TTTCTTCATAGTTATGCCAATCATAATTGGGGGTTTTGGGAAATGATTAA
TTCCCCTTATACTTGGAACCCCTGAAATAACCCTCCCCCCAAAAAATAAA
ATAAAAATCTGAATTTTTCCATTTTTTCTCTCCCCTTTCCTTTAAAAGGG
AAAAATAAAAAAAGGGGGCCGGGCCGGGGGGAAAATTTATCCCCCCCTAA
CAACAACCATCGCCCCTGGAAGGGCCACAATCCACCTAAGGATCTTCCCC
CTTTCTTTGGGCGGAGTCTCCCCGATTTTCCGAAGTGTGAATTTTTTTAA
CCCAGCCATCCATATTCCAAACAGAAGGGTATTCATTAACCCAATACCCT
TATTTCTATGAACCCTCTTCCTTTCTGGCATAATTTTGGTTTTATTCCTC
CCCGGTCCAACAAGAGCCATTTCTTTAACTCTTTCCGGACGAAAACTTAA
CACTACTTTTTTTTGCCCTGCTGGGGGGGGAGAACCCAATCTCTACCCAA
AATTATTTTGATTTTTTTGGACACCCCAGAAAAAAAAAA

>Crayfish ROI2_COI-CO1 691
CCAATTTATACTTAGTGTCTAAACTGATCTAGTATAGTAGGCACTTCCCT
AAGACTGATTCTTCGGCCACCCCGAGGTTACCTGGAAGATTAATCGGAGA
CGATCAAATTTATAATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCGTAATGATTT
TCTTCATAGTTATGCCAATCATAATTGGGGGGTTTGGGAAATGATTAATT
CCCCCTAAACCTGGAACCCCCGGAAAAAGCCTTCCCCCAAATAATAATAT

AAAAATTTGAATTTTACCCTTTTTTCTCTCCCCTTTCCTTTACAAGGGAA
AAATAAAAAAAGGGGTCCGGACCGGGGGGAAAATTTATCCCCCTCTTACC
ACATCCATCGCCCATGGAAGGGCCACCATCCACCCAAGCATCTTCCCCCT
TTCATTGGGCGGAATCCCCCTAATTCCCGGAGCCGTGAAATTTTTTAACC
CAAGCATTCATTATCCAAACCAAAGGGAATTCAATGACCCGAAAACCCTA
ATTCTATGAACCCGCCTTCTTTCTGGAGTAATTTCGCTTTTAATCCTCCC
CCGTCCAAGAGGGGACCAATTCCAAACATTCTTAAGAACCAAAACTAAAA
CCTACCTTTTTTTTGCCCCGGCGGGGGGGGGGATCCCAATCTCTACCCAA
CACTTATTCTAATTTTTCGGAAGGCCCAAAGGAAAAAAAAG

>Crayfish MSK1_COI-CO1 735
GGCATGATAAGGTTCGAACATCTGAGCATGATAAAGGTATAGTAGGCACT
TCCCTAAGACTAATTATTCGAGCCGAACTTGGTCAACCAGGAAGATTAAT
CGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCGTAA
TGATTTTCTTCATAGTTATGCCAATCATAATTGGGGGGTTTGGGAATTGA
TTAATTCCCCTTATACTTGGAACCCCTGATATAACCTTCCCTCCAATAAA
TAATATAAGAATCTGAATTTTACCATTTTCTCCCCCCCCCTCTCCTTACCA
GGGGAATAGTAGAAAGAAGGGGCCGGACCGGGGGGAAAGTTTAACCTCCT
CTCAACAGACATCCATTCGCCCATGGAAGGAGGATCAAGTCGACCTAGGG
ATCCTCCTCCCCTCCTTTGGGCGGAGTCTCCTCCATTCTTCGAGGTGGTA
CCTTGATCAGCTCGATCATGGGTGCGATCAACGTGATCTTTACCATCCTC
AACCTGCGCGCCCCGGGCATGAGGCTGATGAAGATGCCGCTGTTCGTCTG
GACCTGGCTGATCACCGCGTTCCTGTTGATCCCGGTGATGTCGGTGCTGG
CCGGCGTGGTGACCATGATGCTGATGGACATCCACTTCAGCACCAACTTC
TTTTTCTTTGCCCGCGGCGGCGACGGGGGTGCTGTTCCACCACGTGTTCT
GATTCTTCTTTTTCTCCGAGGTAACGGGAAAAAAA

>Crayfish MSK2_COI-CO1 740
GGCATGATAAGGTTCGAACATCTGAGCATGATAAAGGTATAGTAGGCACT
TCCCTAAGACTAATTATTCGAGCCGAACTTGGTCAACCAGGAAGATTAAT
CGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCGTAA
TGATTTTCTTCATAGTTATGCCAATCATAATTGGGGGGTTTGGGAATTGA
TTAATTCCCCTTATACTTGGAACCCCTGATATAACCTTCCCTCCAATAAA
TAATATAAGAATCTGAATTTTACCATTTTCTCCCCCCCCCTCTCCTTACCA
GGGGAATAGTAGAAAGAAGGGGCCGGACCGGGGGGAAAGTTTAACCTCCT
CTCAACAGACATCCATTCGCCCATGGAAGGAGGATCAAGTCGACCTAGGG
ATCCTCCTCCCCTCCTTTGGGCGGAGTCTCCTCCATTCTTCGAGGTGGTA
ATTTTATTACCACGGCAATCAATATATCAACCAAACCGGAGGGTTCATTG
AACGAATAACCCTAATTAATATGAATCAATCCTCCTTACTGCCGGAATTC
TTCTTTTATTCCTCCCCCCTCCAACAAAGAAAGAAATAATAGACTTCTTT
CTTGACCGAAAAAAAAAAAACAAACACTTTCTTTTGTTTCCTGCCTGGGG
GGGGGGGGGGGGCGTATTCCTCTTCCCAACACATAATTTTTGATTTTGTT
TTTTGAGGCTCCCCCTGAAAAAAAAAAAAAATCATTTTTT

RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

>Crayfish KK1_COI-CO1 685

ACAATAAAGCTAGTTTCTGAAGTGTAAGGTATATAGGCACTTCCCTAAGA
CTGATTCTTCGGCCACCCCGAGGTAAACCCCTGCCTGCATCGGAGACGAT
CGCATTCTTCATGTAAACGACACCATGTAGCCTTCGATCATGATTTTCTT
CAGCGTTGTTGCCGGCCTAATTGGGGGTGGTGGGAATTATGAACCCGCCC
ATGAACGTGGCGCCCCAGAGGCTCTGCCCCGGAAAAAAATAATATAATAT
TGTGACTTTTACGATTTTCTCTCCCCGTTGGCCTTACCCCGGGACTAGCC
CAGCGAGGTGTCGGGACAGGGTGGACCTTCTATCCTCCTCTAGCAACATC
AATCGCCCATGCAAGAGCGTCCTTCGACCTATGCATCTTCCCCCTGGATT
TGATCAGATTCTCCTCGGTTCTCGGAACTGTGAATTTTATAACCCTCACC
CTGAATATACCCGACCATAGGGCTGATGAAGAACCCAATGTTCTTATGGA
TATGATCTGATCTTCGCTACTGCAGTACTTCTGCTTTTATCCCTGCTGTT
CGGCGTGGAGACCATACTGTACATCTTATGACCGAAATCAAAAGCCTACT
TTCTTTGACCCTGCTGGCGGGGGAGATCCTGTTCTCTACCCAGATCTGAT
TCTGATTCTACCGCCAAGCTAAAGGTAAAAAAAAC

>Crayfish KK2_COI-CO1 797

CAGTTAATGTTCTTGGGTGATCAGAGAGTGATCAGGTATAGTAGGCACTT
CCCTAAGACTAATTATTCGAGCCGAACTTGGTCAACCAGGAAGATTAATC
GGAGACGATCAAATTTATAATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCGTAAT
GATTTTCTTCATAGTTATGCCAATCATAATTGGGGGTTTTGGGAATTGAT
TAGATCCCCTTATACTTGGAGCCCCTGATATAGCCTTCCCTCCAATAAAT
AATATAAGATTCTGACTTTTACCATTTTCTCTCTCCCTTCTCCTTACAAG
GGGAATAGTAGAAAGAGGTGGTCGGGACAGGGTGGACAGTTTATCCTCCC
TCCAGCAGCATCAATCGGCCCATGGCAGGAGGCATCATGTCGACCCTTGG
AGATGCTTCTACCCTCTCATTTTGGTCCGGCAGTGCGCCTGCAATTGCTT
CGGAGCGTGGGTGATTATTTTTAACCACCGGCAAGTCAATCATATTTAAC
CCAACACGGGAGGGTTCCATCAGATCCGGAATGACCTCTCTATTTAATAT
GGAATGCACCCCGTCATTCACTGGCAGGGGACTTACTGTCTTGTTATTAC
CACCCCCCGCCTCCTAGTCAAGGAGACAAATTCACTGAGGACTATACTTA
TCTTGACGCGAAAAATAAAAAATCAACCACCTTTTCTTTTGTTCCCTCGC
CTGGGCGGGGGGGAGAGGCGTATCTCGTCTCACCCAACGTCATAGATGTT
GACGGATGATCTTTTGTGGCTCACGCCTGGAAAAGAATAAAAAATAA

>Crayfish UD1_COI-CO1 693

CCAAAATTCATTGGGTTTCGGAGCTGATCCGGTATAGTAGGCACTTCCCT
AAGACTGATTCTTCTGGGCACTACCTTGAGTCACCTGGAAGATTAATCGG
AGACGATCAAATTTATAATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCGTAATGA
TTTTCTTCATAGTTATGCCAATCATAATTGGGGGTTTTGGGAAATGATTA
ATTCCCCTTATACTTGGAGCCCCTGATATAGCCTTCCCTCCAAAAAATAA
TATAAAAATCTGAATTTTACCATTTTCTCTCTCCCCTCTCCTTACAAAGG
GAAAAATAAAAAAAAGGGGCGGGACAGGGGGGAAAATTTATCCTCCCCCA

ACAACATCCATCGCCCATGGAGGAGGAACAAACGACCTTGGCATCTTCTC
CCTTCCTTTGGGCGGGGGCTCCTCAATTCTCGGAACTGTGAATTTTATAA
CCCCCGCAATCCATATACCAACCCGAAGGGTATCCCTTGGCCGAAAAACC
TTATTTCTATGAATCCGCGTTCTTACTGGCGGAAATTTTGTTTTAATCCT
CCCCCCTCTCACAAGAGCCATTACTTTACTTCTTTCAGAACGAAAAAATA
AACCCTACCTTTCTTTGACCCTGCTGGGGGGGGGGGACCCATTCTCTACC
CAAACATAATCTGAGGAGACTTTGGAGTAAAAAAAAAAGAAAA

>Crayfish UD2_COI-CO1 739
CCGATTGAACCTTGAACTCTGATGTGATCAGGTATAGTAGGCACTTCCCT
AAGACTAATTATTCGAGCCGAACTTGGTCAACCAGGAAGATTAATCGGAG
ACGATCAAATTTATAATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCGTAATGATT
TTCTTCATAGTTATGCCAATCATAATTGGGGGTTTTGGGAATTGATTAGT
TCCCCTTATACTTGGAGCCCCTGATATAGCCTTCCCTCGAATAAATAATA
TAAGATTCTGACTTTTACCATTTTCTCTCTCCCTTCTCCTTACAAGGGGA
ATAGTAGAGAGAGGTGGCGGGACAGGGGGGACAGTTTATCCTCCTCTAGC
AAGCATCAATCGTCCCATGGGAGGAGGCATCAGTACGACCTTGGGCATCT
TTCTCCCTTCATTTGGTCCGGAGTCTCCCTCAATTCTTCGGAGGTGGGTA
ATTTTATTACCAGCGGCAATCAATATTTCGAACCAACAGGGATATATCAT
TAGACCGGAATACCTCTTATTTAATATGATCCAGTCTTCGTTACTGCCGG
TAATTCTGCTTTTATCCCTCCCCGCCTCTAACAAAGAGCGATTACTGTAC
TTCTTACTGACCGAAAATAATAAACAACTACTTTGCTTTGGACCCTGCTG
GGCGGGGGGAGAGGCCTATCTCTCTACCAACACATAATTTTTGATTTTTT
TTTTTAGGGCCCCAGGAAGAAAAAAAAAAATGGAAAAAA

>Crayfish UD3_COI-CO1 884
TAGGTATTAGATTTGGGAATTAGAGAAACATGATCAGGTATAGTAGGCAC
TTCCCTAAGACTAATTATTCGAGCCGAACTTGGTCAACCAGGAAGATTAA
TCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCGTA
ATGATTTTCTTCATAGTTATGCCAATCACAATTGGGGGTTTTGGGAAATG
ATTAGCTCCCCTTATACTTGGGAACCCCTGGATATACGCCTTCCCTCCCA
ATTAATAATATAAAGATTCCTGACTTTTACCAATGTTCTCCCGCCCCTTC
CCCTTACCAGGGGGAATAGTATCAAAGAGGGGGTCGGGACCGGGTGGAAT
GTTTAACCTCCCCCAACAGGATCAATCGTCCCGGGAAGAGCATCAATCCA
CCTAGGAAACCTCTCCCCTCTTTTGGTCGGAGGCGCCGCAACTCTTGGAG
GGGGGGATTTTTTTACCACCGCAATCAATATATTTAAGAACAGGGATGTG
CATAGACCGAAAACCCCTCTTCACATGATCCGCCCTCCTTAATGGGGGAC
CTCTGCTTTTTTCCCCCCCCCCCCCTTCAGGAGCCATTACTGTACTTCCT
TCTGACCGGAAAAAAAAAACACTCCTTAGCTTTGTTTCCTGCCTGGGGGG
GGGGGGGAGCTCTCTCTCTTCCAACGACAAAATTGTTGTTTTTTTTTTTT
GAGGTTCGTCCGAAAAAAAATTCTAAAAAGAATTTGCCCGTCTCTCCGCG
TCTCCTCCCGCATAGGGGTACAAGAGCGGAGGTGGTAGACGACTTATTTT
CGAATTAGATAAGACAACACTCTTCCTGCTTCAAACCCGTGTGTTGACTG

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

TAACTACCTCCATTTTCCATGTAGATTGGAAGTG

>Crayfish KR1_COI-CO1 833

CAAGGATTTGGCTTGTTACTCTGAGCTGCTCAGGTATAGTAGGCACTTCC
CTAAGACTAATTATTCGAGCCGAACTTGGTCAACCAGGAAGATTAATCGG
AGACGATCAAATTTATAATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCGTAATGA
TTTTCTTCATAGTTATGCCAATCATAATTGGGGGTTTTGGGAATTGATTA
GTTCCCCTTATACTTGGAGCCCCTGATATAGCCTTCCCTCGAATAAATAA
TATAAGATTCTGACTTTTACCATTTTCTCTCTCCCTTCTTCCTTACAAGG
GGGAATAGTAGAAGAGAGGTGTCGGGGACAGGGGTGGACAGTTTATCCTT
CCTCTAGCAGCATCAATCGCCCATGGAGGAGCATCAGTCGACCTAGGCAT
CTTCTCCCTTCATTTGGCCGGAGTCTCCTCAATTCTCGGAGCTGTAAATT
TTATAACCACAGCAATCAATATACGAACCAAAGGGATATCCATAGACCGA
ATACCCTTATTCGTATGATCCGTCTTCATTACTGCAGGACTTCTGCTTTT
ATCCCTCCCCGCTCTAGCAAGAGCAATTACTATACTTCTTACAGACCGAA
ATCTAAACACTACTTTCTTTGACCCTGCCTGGCGGGGGAGATCCTATTCT
CTACCAAACACTTATTTCTGATTTTTTTTTTGAGGCCCGGGCCGGAAAAA
AAAAAAGGAAACCTCTGATTCGCTGTGGCCTGTGTTCCTCTTCTCCCTCC
GGGGTGGGGCCCCGTGGGCGGTGAGGCTGTTGCTCTGTGTGCGCGTGTTT
GGTGTTTTTTCCCCCCTGCTCTCGGGGCGGGGG

>Crayfish YT1_COI-CO1 734

CAAATGGAACCTTGAGATCTGGGGTGCTCAGGTATAGTAGGCACTTCCCT
AAGACTAATTATTCGAGCCGAACTTGGTCAACCAGGAAGATTAATCGGAG
ACGATCAAATTTATAATGTAATCGTCACAGCCCACGCCTTCGTAATGATT
TTCTTCATAGTTATGCCAATCATAATTGGGGGTTTTGGGAAATGATTAGT
TCCCCTTATACTTGGAACCCCTGATATAGCCTTCCCTCACAATAAATAAT
ATAAAAATCGTGAATTTTACCATTTTCTCTCTCCCCTCTCCTTACCAAGG
GGAATAGTAAAAAGAAGTGTCGGGACAGGGTGGACAGTTTATCCTCCTCT
TACAACATCCATCGGCCATGGAAGGGGAACAATCGACCTAGGAATCTTCT
CCCTTCCTTTTTGTCGGAGTCTCCTCAATTCTCCGAGGTGGGAATTTTTT
TACCACGGCAATCCATATTCCAAACACCACGGATTTTCATAGGACCGAAT
AACCTTATTTAATATGATCCGGCGTCCTTGCTGGGGGGAATACTGCCTTT
TTCCCTCCCCCCCTCCAACAAGAACAACTACTATAACTTCTTTTTTGACC
GAAAAAAAAAAACCACTACCTTTCTTTTGACCCCTCCTGGGCGGGGGGAG
GATCCTATTTCTCTACCAAACACTTATTTTTGATTTTTTTTTTTAGGGCC
TCGGAAAAAAAAAAAAAAAAACATCTTTAATAAA

FACULTY OF AGRICULTURE CHIANG MAI UNIVERSITY
RAJAPHAT MAHACHAKRAKHAM UNIVERSITY

>Crayfish SK1_Chmr4 1199
GGCCTGGGGCATTGGCCCCCACGTTCTCCGCCAACAGGGGTCAAAGAAGT
AGTGTTTAGATTTCGGTCTGTAAGAAGTATAGTAATTGCTCCTGCTAGAA
CGGGGAGGGATAAAAGCAGAAGTACTGCAGTAATGAAGACGGATCATACG
AATAAGGGTATTCGGTCTATGGATATCCCTCTGGTTCGTATATTGATTGC
TGTGGTTATAAAATTTACAGCTCCGAGAATTGAGGAGACTCCGGCCAAAT
GAAGGGAGAAGATGCCTAGGTCGACTGATGCTCCTGCATGGGCGATTGAT
GCTGCTAGAGGAGGATAAACTGTCCACCCTGTCCCGACACCTCTCTCTAC
TATTCCCCTTGTAAGGAGAAGGGAGAGAGAAAATGGTAAAAGTCAGAATC
TTATATTATTTATTCGAGGGAAGGCTATATCAGGGGCTCCAAGTATAAGG
GGAACTAATCAATTCCCAAAACCCCCAATTATGATTGGCATAACTATGAA
GAAAATCATTACGAAGGCGTGGGCTGTGACGATTACATTATAAATTTGAT
CGTCTCCGATTAATCTTCCTGGTTGACCAAGTTCGGCTCGAATAATTAGT
CTTAAGGAAGTGCCTACTATACCGGATCAGGCTCCGAACACAAAGTATAG
AGTACCAATGTCTTTGTGGTTTGTAGAAAATAGAAAACTGTACGCCCTGA
TAACTCTGAAGGTGAGTCTACATCTAGAAGTAAGAGATTCTTGTAATCTG
CAAAGCGTATTTGTGCCCGTCTCTAGATGCGTTACAGGGGATTATACCGT
TGTAAGGGATTCATGAGTCTCTAATAGTTGCAGAGGAACTTCTCTATGTG
TATCCTACCTGGTGTGAGTGGATAGTGACGTGCGATCTGTCGAGATCGGC
TTCATTTTAACCTCAGTCAAGTGTTGTATTTCATTATCTACTGAGCAAGT
ATTTGATAGGAGATCTGAATGTGTATTTTCTCTGGTATTTAAAAGTGGTC
ATGACTGAGAGTGAGGTGATTCGGCTTGTTCATTAGTCTATTGATTGTCA
GTAATATATTTAGGATGTAGGGAGGAGAGGTCGGGATGTTAGGTTGATTG
TTGTCTTTGTTTCTCTTTAGAATGTGTTCTTGTAGGCATGATGGATCGAT
TATTACTAGATTATGTGAATGCTGGGATTCTAGACATGTGATGCTGCAT

>Crayfish CR1_Chmr4 1648
AATTGGCAGATACCCCAGGTTGTCGCGAATGGGTCAAAAATGTGCTTAAT
TTCGGCTGTAGATGATTTAATTGCTCCTGCTGAACGGGGAGGGAAAAAGC
AGAAGTACTGCAGTAATGAAGACGGATCATACGAATAAGGGTATTCGGTC
TATGGATATCCCTCTGGTTCGTATATTGATTGCTGTAGTTATAAAATTTA
CAGCTCCGAGAATTGAGGAGACTCCGGCCAAATGAAGGGAGAAGATGCCT
AGGTCGACTGATGCTCCTGCATGGGCGATTGATGCTGCTAGAGGAGGATA
AACTGTCCACCCTGTCCCGACACCTCTCTCTACTATTCCCCTTGTAAGGA
GAAGGGTGAGAAAAAATGGTAAAAGTCAGAATCTTATATTATTTTATTCG
AGGGAAGGCTATATCAGGGGCTCCAAGTATAAGGGGAACTAATCAATTCC
CAAAACCCCCAATTATGATTGGTATAACTATGAAGAAAATCATTACCAAG
GGGGGGGGCTGGGGACAATTACTTTATAAATTTTGATCGCCTCCCAATTA
AACTTTCCTGGTTTGACCAAAGTTTCGGCCCCGAAAAAATAAGCCTTAGG
GAAGTGGCCTCCCTTTTCCGGGAGAAAGGGGCCGAAAAAAAAAAAAAAAA
AGGATCCCCACATGTTTTTTAGGGGTTTTTGAAAAAGAAAAAATTAAATG
CACAGAGACGCCATCTAGTTTTTAGTGGGTGGTGGGCGGCCAGTTTAATA

RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

TCGTAACAAAATAGCAAGGAGATAGGAAAGCCAACTGATCGTTTGAGTTC
GGCTAAAGCAAGGTTGTTGGTGCATGAAGTTAATGCGAGATAACGATGAT
ATTTACGAGGCTAATTGAGTTGATTCAACCTCTAGATAGGCCTATTTGAG
CTTTTAATGAGGGAGATCTATGGGGAGCTTCTCGTAATGTGATCATGACG
CTGGTTGACCGTTGGTATTATGACTTCTTGAAGTTGTATCCCAAAGGGGG
TTCACAATATCCATGGAGATCACGTTTTGTGCAGTTGAGCGCTATGTCAT
TAGCCCTAGAGGAGTTGGAGCTGTTACGAAGAGAACTGGTTGGATGATTG
TGAGATGGTGGTGTCAGCGATGGTGACTCGAAGATTAAATAGTAGAGCTG
CGATATCAACCAACGCGTTGCTCTCGTACGTCCGTTTACTGGACTTATTG
GCAATACATTACGGTGCGATAGGTGTAGGTTAATACCTGTGTGGGCTGCT
AGATGTACTGTTGCACCGGTGTATTTACGTGTGTGTTGGTAAATGAGGAG
ATGCTTGCGCGCATATGTAGTGATAGATGATAGTGCTGGGTGTGACTTGA
TTACTAACGGCAGATTAGGGTAGGAATATTGCGTATTGCGTTTGCGCTAT
CGTAGATGCATTGGCAGCAATGCATGGTGAGTTGCAGATGGGTGCGCAAA
TGATGCCGTAATTGTCCTATCGTGTGTGGCCATATGATATTTGATGGATA
ACTAAACTATTATATGGTGGCGTTATTGCATTGATGTACGGTGTATATAT
GCTGTGTAGAGTGCGGAGATGAATAGGCGTGTGTTCAATACTGAGCAATA
TTAATGAGAGTAACTAGGATTGGGAGGGAGTATATAGGATTGTGTGGT

>Crayfish UD1_Chmr4 1554
GCACTCAACAGCGTCATCCGTCCGGGTCAAAAGAAGTGTGTTTAGATTTC
GGTCTGTAAGAAGGTCAGTACTTGCTCCTGCTAGAACGGGGAGGGATTAA
AGCAGAAGTACTGCAGTAATGAAGACGGATCATATGAATAAGGGTATTCG
GTCTATGGATATCCCTCTGGTTCGTATATTGATTGCTGTGGTTATAAAAT
TTACAGCTCCGAGAATTGAGGAGACTCCGGCCAAATGAAGGGAGAAGATG
CCTAGGTCGACTGATGCTCCTGCATGGGCGATTGATGCTGCTAGAGGAGG
ATAAACTGTCCACCCTGTCCCGACACCTCTCTCTACTATTCCCCTTGTAA
GGAGAAGGGAGAGAGAAAATGGTAAAAGTCAGAATCTTATATTATTTATT
CGAGGGAAGGCTATATCAGGGGCTCCAAGTATAAGGGGAACTAATCAATT
CCCAAAACCCCCAATTATGATTGGCATAACTATGAAGAAAATCATTACGA
AGGCGTGGGCTGTGACGATTACATTATAAATTTGATCGTCTCCGAAATAA
TCTTCCTGGTTGACCAAGTTCGGCTCGAAAAATTAATCTTAAGGAAGTGC
CTACTATACCGGGATCAGGCTCCGAACACAAAGTATAGAGTACCAATGTC
TTTTTTGGTTTTGTTTAAAAAAAAAAAAAAAATTTTTGTGTCATTTCGCG
TCGTTACTTTTTCTCTTTTTAATTCAGATTTTCTTCTATTGTTGCGATCC
GGCTTAGAAATCGTTCTTAAAGTTCTATTAAGTCCGAGGAATGTTTATAT
TGTTAGGTTGTATCTTGATTTAGCAAAAAACAACACTCGTGTGATAGTGT
AAAACGTATCTTCTGTTAACCTTTATATAGGTTGCTTCTACACGTTGGCA
TATTCACAAGCAGTATCATTATTAACTATCCTATAGCTTTACATAATTTA
TAAGGGGGGACAGGTTTATAAGTGATACTAATAAACGCTGACCTATAATT
GGTGGGTCAGCTTAAGTGGCTATCGATGTTTTAGTCGATACATTCTTTTT
CCACATCGTACGTAATAAAACAATTAATATCCTATCCCAGCTGCACACGA
TGTCTCGGCATGTATCCCTTACACAATTACTTTTCGCTATAATAGTATTG

ATACATAGTTAGCCTTATTCGCCGCGTTTGGAAATCGCCGTGCTTGCGAT
CTATGGGCGTAATCATATCATAATAGTTGGCTTGAACGATATTTGATAAT
AAACAGATATCATATAACTAACCCACCTGCTGTGTACTCCTTTGCTCTGC
AACATTGCGGACGTTAGTTATGGCGCATTAATGACGTGTCGTTTATATAC
GGACGGAAGGAACATGAATCGGATATATAATTTGATATATAATATCTCTA
ATGCGCGCGTTGTTGATCATTCTGAACGATTGGTGATAAAAACCATTTAG
CGGATATTACGTTGGCTCGCGTTAAAATGACTACATTATGGAGGTTTTGG
GCACTATGTATTGAAATAAAAGTAAATTGTGCTCCCGAACTTCTAGTCTC
ACAA

>Crayfish MSK1_Chmr4   1355
CGTGGGAAAACACCAAAAAAAAAAACGCCCCACCGCAGACTGCAGCCTGC
TTCTTGTGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTC
ATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACA
TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCCGGGGTGCCTAATGAGTGAGC
TAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAA
CCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCG
GTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGC
TCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAT
ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAA
AAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTT
TTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAG
TCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCC
CTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGA
TACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTCCTTTATACCCTCAAAAA
AAAGGCTCTATTATTTTATAATTTATTTAAAAAAAATTTTATTATTTATA
ATTAATTAAAAATTATAATAAAATTTATATAATATAATAAATATAATTTA
TAATAAAATATAAAATATATTATAATTATATATATTAATTAAATTTTATA
TTCTTAATTATAATTATAAATATTAAAAATATAATAATTTTATTATTAAA
ATATTTAAAAAATATAAATATTTATAATTAAATAATAATTTATTATAATT
AATATATATTAATTTAAAATAAATTATATTAATATAATTGATATATAATT
GAATATATTAAAATGAAAATATATATTAAGTAATTATTAATAATTTTATA
GATGGTATAATTGATTATGAAATGATAGATATATAGTATTAGAATGATGG
ATACAAAACTAAAATAAATTATATTAGTGTATAATTTATATTTATATAAA
TTTTAATAATATTATATGAGGAAGCAAGGATAACTTTGATCATAAAAAAT
ACTTTTGTTATTATATCGACTATTATATTTAATAAAAATAAACAATATTA
AATACGTATATGAAAATGGGACATTTTTAACTAAGTATGTGGATGTAGTG
TAAACAAATTTTATAATATCACGAAATCTACTATTAAGATAAATTGTAAC
TTATT

>Crayfish ROI1_Chmr4   1337
ACGCTGGGATTGCCCAACAGGTCTCCCGCCAGCAGGGGTCAAGAAGTAGT
GTTTAGATTTCGGTCTGTAAGAAGTATAGTAATTGCTCCTGCTAGAACGG

GGAGGGATAAAAGCAGAAGTACTGCAGTAATGAAGACGGATCATACGAAT
AAAGGTATTCGGTCTATGGATATCCCTCTGGTTCGTATATTGATTGCTGT
GGTTATAAAATTTACAGCTCCGAGAATTGAGGAGACTCCGGCCAAATGAA
GGGAGAAGATGCCTAGGTCGACTGATGCTCCTGCATGGGCGATTGATGCT
GCTAGAGGAGGATAAACTGTCCACCCTGTCCCGACACCTCTCTCTACTAT
TCCCCTTGTAAGGAGAAGGGAGAGAGAAAATGGTAAAAGTCAGAATCTTA
TATTATTTATTCGAGGGAAGGCTATATCAGGGGCTCCAAGTATAAGGGGA
ACTAATCAATTCCCAAAACCCCCAATTATGATTGGCATAACTATGAAGAA
AATCATTACCAAAGCGTGGGCTGTGACGATTACCTTATTAATTTGATCGT
CTCCGATTAATCTTCCTGGTTGAACAAGTTCGGCTCCAATAATTAATCCT
AAGGAAGTGCCTACTATACCGGAACAGGGTCCGAACACCAAGTATAGAGT
TCCAATGTCTTTGTGGTGAGGTCGAAAAACAGAATATAACTATAAAAAAA
ATGTATCTTCTTCGGAAATATCAAGAAGGACTAATATTGTTTATTATTGT
ATTATTTTATAGAAACGTTAGTTTAAGGCAGTAGTTCGGCGCCATAATTG
AGAACCTTACGAATTACGAACTGCTTAATTGTACTGAGTGAGAGATAGGT
AATAGTTATTATCGTGTTTTGATTAATTATATTTTTGAAGATTTGTTTAT
TTTTAGATATACTCATCATTTACGGTCTTAGATCATATTTTATTTTTCCT
TTATGCTCAGTATTTATATATGTTTTATCAGTACTATGATTGGCTATTAT
TTTTGTTTTAGGGATATTCTAGATATTTAATCCCCGAGAGTGGAGTCTAG
TTTACTGAGCATTCCGATAATCAGCGAATCTAATCAAGTCATGGATAGAT
GTCGCGTTTATAAATAGAATGTCAATATATGACTCGTTTTGATGAATTAT
CTTGCTATGTGGGGTGTATCTAGAATTACAATATCATTAGTAAAGTTTTC
ATAGTGTACTACACGTTGCTACCCATGTGATGAGAGATATATTATGTATG
TTGATATCTTTATATTTTGATTTATGGTTTGAGATCTGTAGGACCAGATT
ATCTGTATGTGTGAGTTGATATGGTAAGAATGTATTT

>Crayfish KK1_Chmr4 1259
AGTGGATTGCAATCACTCGTCTCTCGCAGACAGTCAAGAAGTAGTGTTTA
GATTTCGGTCTGTAAGAAGTATAGTAATTGCTCCTGCTAGAACGGGGAGG
GATAAAAGCAGAAGTACTGCAGTAATGAAGACGGATCATACGAATAAGGG
TATTCGGTCTATGGATATCCCTCTGGTTCGTATATTGATTGCTGTGGTTA
TAAAATTTACAGCTCCGAGAATTGAGGAGACTCCGGCCAAATGAAGGGAG
AAGATGCCTAGGTCGACTGATGCTCCTGCATGGGCGATTGATGCTGCTAG
AGGAGGATAAACTGTCCACCCTGTCCCGACACCTCTCTCTACTATTCCCC
TTGTAAGGAGAAGGGAGAGAGAAAATGGTAAAAGTCAGAATCTTATATTA
TTTATTCGAGGGAAGGCTATATCAGGGGCTCCAAGTATAAGGGGAACTAA
TCAATTCCCAAAACCCCCAATTATGATTGGCATAACTATGAAGAAAATCA
TTACGAAGGCGTGGGCTGTGACGATTACATTATAAATTTGATCGTCTCCG
ATTAATCTTCCTGGTTGACCAAGTTCGGCTCGAATAATTAGTCTTAGGGA
AGTGCCTACTATACCGGATCAGGCTCCGAACACAAAGTATAGAGTACCAA
TGTCTTTGTGATTAGATTGAAAAGAGAAATATGTTTTTATTTAAGATTTC
TTTAATCGTCTGGTCGTTTAAGTATAAACATATTATTTTTTATTTAGTTT
CGATTTAGTGAGACTAGTATATATTGTGGGGAATAACGCATTAAGTGTTT

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

GACTATCGCCGTTAATTTTGTACTTACTATTAAAAAATGTTAATCTATGA
TTTTCAGGATTGGAGTGTGGTGAATGGTTTTTGTGTCTGTAAGTTTACTC
ATGCTCGGGTCGGTCTTTAACATCGGCAAGTTATCAAGGTTATATAGATA
TGTAGTTATATATATTATTTCTATGTTGTATGTATATAATTAGGAATGCT
GCAGAGTGTACTTTTTTGCTATAGAGGTGAAGATCATAGATTTGAAATTT
GTTTGTTTTGGGTATATGAAAATATATATAATATCCTTTGATCGTAATCC
ATAGTAGATTCTGAGATATATTATAGAGTTGTTGAGTGTTAATGCAGCAC
ATTATAGAACATTACAGCTAGCAGTGAACTACAGATGTTTTTGTTTGTTA
TTTATGTTTTGTTTGTATATTAATATGTTATCTGATGGCGATGATTTTGC
TTGATGGAT

>Crayfish KR1_Chmr4 1205
AGATGGGCACTGAACACGCTCTCCGCCAAGCAGGTCAAGTAAGTAGTGTT
TAGATTTCGGTCTGTAGAAGTATAGTAATTGCTCCTGCTAGAACGGGGAG
GGATAAAAGCAGAAGTACTGCAGTAATGAAGACGGATCATACGAATAAAG
GTATTCGGTCTATGGATATCCCTCTGGTTCGTATATTGATTGCTGTGGTT
ATAAAATTTACAGCTCCGAGAATTGAGGAGACTCCGGCCAAATGAAGGGA
GAAGATGCCTAGGTCGACTGATGCTCCTGCATGGGCGATTGATGCTGCTA
GAGGAGGATAAACTGTCCACCCTGTCCCGACACCTCTCTCTACTATTCCC
CTTGTAAGGAGAAGGGAGAGAGAAAATGGTAAAAGTCAGAATCTTATATT
ATTTATTCGAGGGAAGGCTATATCAGGGGCTCCAAGTATAAGGGGAACTA
ATCAATTCCCAAAACCCCCAATTATGATTGGCATAACTATGAAGAAAATC
ATTACGAAGGCGTGGGCTGTGACGATTACATTATAAATTTGATCGTCTCC
GATTAATCTTCCTGGTTGACCAAGTTCGGCTCGAATAATTAGTCTTAGGG
AAGTGCCTACTATACCGGATCAGGCTCCGAACACAAAGTATAGAGTACCA
ATGTCTTTGTGATTTGTACGAACAAGAAAAGGTAAGAAATATAAGAAATT
TGTCTTCCTGCAAATACGGGTGAAAAGTGTTCTTTAATATATTTATATTT
ATTCATTTATATAGATGAGATTGTTTTTTCGGTCTTTCTTACATATCCCT
TTTTACAACTTTTGTCGTAATCTTGTCTAAAATGTATGGTTATTATCGTG
GATTTTACAAAAACTCATGATAGTTATAGTGTTTTAATGTCATAATTAGT
ACCTAGGCAATATGATTTATTAGTAGACGTAGTATAATTCTCTTTTGTAT
TTACTGACGCAGCTTATCGATTGGAGTTTGATGTAAGAATATCCCGCGAT
GCTTAACGGGTAATCGCAATTGTATATGATTGTTGATAGGTATGGTCATA
ATATTTTTTAATATTGCTTGAGGGGAGCATATTATGTACTGTTTTTTATG
TATAGTTGTGTATTTAGAAGAAAATAAGTTTGTTTATTGTTTTTGTTCTT
TTTTGTGTTTTTTTATTGTCATGTGTCTTAGGCTCATTTTGAATGATTAT
ACTCA

>Crayfish YT1_Chmr4 737
GAAAATGTAATCCTCGGGGAAGTAGGAATACCAGGGTACACAAGCCCATT
CTACTCGCTATTCTCAAGCTGCTCATAGGTAGAGGGGTGGTCCAAGAACA
CAGTCAGATACTTCCCTTTCCGTAGCGTGGCTCCCCCTCTGCAGCCTCTG
TCCAAACAACTCCTAAGTCAACTTCTGCCGTCCTGGAAATCCCATAGTCT

CTCTAGGGAAATAGACCCTACCTGGCCTCCCTACAAACAAACAAACTTTC
ATTATTAATACCTGAGGACAGGGACAAAATGGGTTCAGCTACCAGAGTCA
TGCACACCCACTTACTGATTGGTTCACGATTGCCGACTAATCCTGGTGGG
GAGCGTCGGCTACATTCAGTGGTGTCAGCTCATCCAGAAGTTTTCATCCT
GTTCTCCGCCGAAGCAGGGGATACCGCGGGAGCGAACAAGGGACCCATAC
GCCACCTCAACGCCAGGAACCGGTAAAAGGACGCGGTACGTTTACCTCAC
CTAAGCTCCGCCCTCCTGACGACGCTCGCGCAAATTTATTCTCACTGCCT
ATGCGCAGAAAGCTTGCAGGACTCTCTAGATGTCACGCGTTTCCCCCTGA
ATTCTTCATCATGCGCTCTGCAGTACCGACCCTGCCGCTCACAGAATACC
TGTCCTCCTTTCTCCCATCTGGAGCTCATCTCATACCCTGAAAAGGTTCC
ACATCTCCCTCTGGAAAGGACCCATGAGCTCAGAGGA

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญ

หัวเรื่อง		หน้า
กิตติกรรมประกาศ	.....	ก
บทคัดย่อ	.....	ข
ABSTRACT	.....	ค
สารบัญ	.....	ง
สารบัญตาราง	.....	ซ
สารบัญภาพ	.....	ฎ
บทที่ 1	**บทนำ**	1
	1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	3
	1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
	1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
	1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ	4
บทที่ 2	**ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	2.1 อนุกรมวิธานและลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามแดง.....	5
	2.2 เครื่องหมายทางพันธุกรรม	13
	2.3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
บทที่ 3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	21
	3.1 ข้อมูลและแหล่งที่มาของข้อมูล	21
	3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	21
	3.3 เครื่องมือในการวิจัย	21
	3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย	21

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญ (ต่อ)

หัวเรื่อง		หน้า
บทที่ 4	**ผลการศึกษา**	27
	4.1 ข้อมูลการเลี้ยงกุ้งก้ามแดง	27
	4.2 การศึกษาลักษณะภายนอกของกุ้งก้ามแดง.....	32
	4.3 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โคด	37
	4.4 การส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากพันธุ์กุ้งเครย์ฟิชในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในกลุ่มร้อยแก่นสารสินธุ์ (4 จังหวัด คือ ร้อยเอ็ด ขอนแก่น มหาสารคาม และกาฬสินธุ์)	62
บทที่ 5	**สรุป และวิจารณ์ผลการวิจัย**	69
	5.1 สรุปผลการวิจัย	69
	5.2 วิจารณ์ผลการวิจัย	73
	5.3 ข้อเสนอแนะในงานวิจัยครั้งต่อไป.....	73
บรรณานุกรม	.....	75
ภาคผนวก ก.	**การเตรียมสารเคมี**	80
ภาคผนวก ข.	**ลำดับนิวคลีโอไทด์**	87
ประวัตินักวิจัย	.....	100

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 4.1	การวิเคราะห์โปรตีนในเนื้อกุ้งก้ามแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง ตามวิธีการของ Kjeldahl method	36
ตารางที่ 4.2	แสดงการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของตัวอย่าง บนฐานข้อมูล Genebank	40
ตารางที่ 4.3	แสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจาก 8 จังหวัดจากบริเวณ COI สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 6.0	54
ตารางที่ 4.4	แสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งก้ามแดงที่เก็บตัวอย่างจาก 8 จังหวัดจากบริเวณ COI สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 6.0	61

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 2.1	เขตการกระจายตัวของกุ้งก้ามแดง	**36**
ภาพที่ 2.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกุ้งก้ามแดง	7
ภาพที่ 2.3	การจำแนกเพศของกุ้งก้ามแดง	8
ภาพที่ 2.4	การจำลองขณะตัวผู้ทำการส่งถ่ายถุงน้ำเชื้อ	9
ภาพที่ 2.5	การจำลองพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของกุ้งก้ามแดง	10
ภาพที่ 2.6	วงชีวิตกุ้งก้ามแดง	11
ภาพที่ 2.7	การลอกคราบของกุ้งก้ามแดง	13
ภาพที่ 2.8	เดนโดรแกรมของประชากรกุ้งเครย์ฟิช ในการจำแนกประชากรของกุ้งใน อเมริกาเหนือ และกุ้งในยุโรป	19
ภาพที่ 4.1	สถานที่เลี้ยงกุ้งก้ามแดงของสหกรณ์การเกษตรเขื่อนพระปรง จังหวัดสระแก้ว	28
ภาพที่ 4.2	สถานที่เลี้ยงกุ้งก้ามแดงของชายณรงค์เครย์ฟิชฟาร์ม จ.มหาสารคาม	29
ภาพที่ 4.3	สถานที่เลี้ยงกุ้งก้ามแดงของตู่เครย์ฟิชฟาร์ม จังหวัดอุดรธานี	30
ภาพที่ 4.4	สถานที่เลี้ยงกุ้งก้ามแดงของเต๋าเครย์ฟิชฟาร์ม จังหวัดขอนแก่น	31
ภาพที่ 4.5	สถานที่เลี้ยงกุ้งก้ามแดงของคุณพรชัยฟาร์มกุ้งก้ามแดงร้อยเอ็ด จังหวัดร้อยเอ็ด	32
ภาพที่ 4.6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกุ้งก้ามแดง	33
ภาพที่ 4.7	การจำแนกเพศของกุ้งก้ามแดง	33
ภาพที่ 4.8	ก. กุ้งก้ามแดงของตู่เครย์ฟิชฟาร์ม จังหวัดอุดรธานี ข. กุ้งก้ามแดงของชายณรงค์เครย์ฟิชฟาร์ม จ.มหาสารคาม ค. กุ้งก้ามแดงของเต๋าเครย์ฟิชฟาร์ม จังหวัดขอนแก่น ง. กุ้งก้ามแดงของพรชัยฟาร์มกุ้งก้ามแดงร้อยเอ็ด	34
ภาพที่ 4.9	ก. เนื้อกุ้งก้ามแดงของตู่เครย์ฟิชฟาร์ม จังหวัดอุดรธานี ข. เนื้อกุ้งก้ามแดงของชายณรงค์เครย์ฟิชฟาร์ม จ.มหาสารคาม ค. เนื้อกุ้งก้ามแดงของเต๋าเครย์ฟิชฟาร์ม จังหวัดขอนแก่น ง. เนื้อกุ้งก้ามแดงของพรชัยฟาร์มกุ้งก้ามแดงร้อยเอ็ด	35

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 4.10	แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอกุ้ง Crayfish 15 ตัวอย่าง	37
ภาพที่ 4.11	แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกุ้ง Crayfish 15 ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ของยีนบริเวณ COI (COI-C03 ,COI-C01)	38
ภาพที่ 4.12	แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกุ้ง Crayfish 8 ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ของยีนบริเวณ COI (Chmr4, Chmf4)	39
ภาพที่ 4.13	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน COI ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0	45
ภาพที่ 4.14	Phylogenetic tree of COI sequences of crayfish was constructed using Neighbor joining method by MEGA version 6.0. The number on the branches are bootstrap confidence levels.	52
ภาพที่ 4.15	Phylogenetic tree of COI sequences of crayfish was constructed using Maximum Likelihood method by MEGA version 6.0. The number on the branches are bootstrap confidence levels.	53
ภาพที่ 4.16	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน COI ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0	55
ภาพที่ 4.17	The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model . The tree with the highest log likelihood (-3238.9445) is shown. There were a total of 622 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.	59

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 4.18	The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The optimal tree with the sum of branch length = 1.01889068 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The analysis involved 8 nucleotide sequences. There were a total of 622 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.	60
ภาพที่ 4.19	การประชุมเครือข่ายผู้เลี้ยงกุ้งก้ามแดง	65
ภาพที่ 4.20	การประชุมเครือข่ายเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งก้ามแดง	65
ภาพที่ 4.21	การนำนักศึกษาลงพื้นที่ให้ความรู้ในเรื่องการเลี้ยงกุ้งก้ามแดง และการสังเกตอาการของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส	66
ภาพที่ 4.22	ถอดบดเรียนที่ได้จากการจัดกิจกรรมการสำรวจและติดตามเฝ้าระวังโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot disease) ในกุ้งเดสทรัคเตอร์ (*Cherax destructor*) กุ้งก้ามแดง *Cherax quadricarinatus*	66
ภาพที่ 5.1	Phylogenetic tree of COI sequences of crayfish was constructed using Neighbor joining method by MEGA version 6.0. The number on the branches are bootstrap confidence levels.	70
ภาพที่ 5.2	The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model . The tree with the highest log likelihood (-3238.9445) is shown. There were a total of 622 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.	72

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY