



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การจำแนกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP เพื่อสร้าง  
แผนที่โครโมโซมในปลาดุกอุย

โดย สุภาวดี พุ่มพวง และคณะ

มิถุนายน 2544

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การจำแนกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP เพื่อสร้างแผนที่  
โครโมโซมในปลาตุ๊กต๋อ

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร.สุภาวดี พุ่มพวง

คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ศ.ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร

คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Scanned with

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร ที่ช่วยให้คำแนะนำระหว่างการดำเนินการทดลองและตรวจแก้ไขรายงาน ขอขอบคุณ คุณพลชาติ ผิวเณร คุณจงกล บุญงาม คุณสุดาวลัย ศรีไพโรจน์ และคุณ ศรีจรรยา สุขมนมอนด์ จากภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง ที่ช่วยเก็บตัวอย่างปลาและผลิตปลา แอพพลอยด์ ขอขอบคุณ คุณสุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวิ และคุณขันติพร พังนภาแก้ว จากห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ช่วยวิเคราะห์ตัวอย่างและสร้างแผนที่โครโมโซม และสุดท้ายผู้วิจัย ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายวิชาการ ที่ได้สนับสนุนเงินทุนสำหรับงานวิจัยหลังปริญญาเอกชิ้นนี้

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF/25/2542  
ชื่อโครงการ : การจำแนกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP เพื่อสร้างแผนที่โครโมโซม  
ในปลาดุกอุย  
ชื่อนักวิจัย : ดร. สุภาวดี พุ่มพวง  
ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900  
E-mail Address : FFISDPP@KU.AC.TH  
ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2542 – 30 มิถุนายน 2544

ปลาดุก (*Clarias spp.*) เป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศ ความสำคัญของปลาดุกก่อให้เกิดการศึกษาและวิจัยด้านพันธุกรรมอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์ปลาดุกแบบดั้งเดิมเพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตไม่ได้ผลเท่าที่ควร การคัดพันธุ์ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม (Marker-assisted selection) เป็นแนวทางการปรับปรุงพันธุ์แบบใหม่ที่ได้รับความนิยมสูงในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ผู้วิจัยได้เลือกปลาดุกอุยเป็น model สำหรับโครงการคัดพันธุ์ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมที่จะดำเนินการในอนาคต วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาค้างนี้เพื่อประเมินความเหมาะสมของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP สำหรับวิเคราะห์จีโนมปลาดุกสกุล *Clarias* และสร้างแผนที่โครโมโซมเบื้องต้นของปลาดุกอุย เทคนิค AFLP มีข้อดีหลายประการคือ สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างและตรวจพบ AFLP ที่ใช้เป็นเครื่องหมายได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น มีความน่าเชื่อถือในการทำซ้ำสูงและเสียค่าใช้จ่ายในระดับปานกลาง ในการศึกษาความหลากหลายของ AFLP ในปลาดุกอุยและปลาดุกยักษ์โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ สามารถสร้างแถบ AFLP ที่ชัดเจน 376 แถบ ในจำนวนนี้เป็น AFLP ที่พบเฉพาะปลาดุกอุย 57 แถบ และพบเฉพาะปลาดุกยักษ์ 38 แถบ ซึ่ง AFLP เหล่านี้มีประโยชน์สำหรับการแยกชนิดปลาดุก รวมทั้งการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ในการสร้างแผนที่โครโมโซมเบื้องต้นโดยใช้ปลาดุกอุยแฮพลอยด์ พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 32 คู่ สามารถสร้าง AFLP ที่เป็น polymorphic bands ทั้งหมด 162 แถบ แผนที่โครโมโซมเบื้องต้น ประกอบด้วย AFLP จำนวน 79 ตำแหน่งที่จัดเข้ากลุ่ม (linkage groups) ได้ 22 กลุ่มมีระยะทางแผนที่รวมเท่ากับ 1243.3 cM ส่วน AFLP อีกจำนวน 28 ตำแหน่งยังไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ จำนวนของ AFLP ในแต่ละกลุ่มมีค่าตั้งแต่ 2 ถึง 19 และระยะห่างระหว่าง AFLP แต่ละตำแหน่งมีค่าเฉลี่ย 15.74 cM แผนที่โครโมโซมนี้เป็นจุดเริ่มต้นสำหรับโครงการ QTL mapping ในอนาคต

คำหลัก : AFLP, linkage mapping, *Clarias spp.*

## ABSTRACT

---

**Project Code:** PDF/25/2542  
**Project Title:** Identification of AFLP markers for linkage mapping of catfish  
**Investigator:** Supawadee Poompuang  
Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries  
Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, 10900.  
**E-mail Address:** [FFISSDPP@KU.AC.TH](mailto:FFISSDPP@KU.AC.TH)  
**Project Period:** July 1, 1999 – June 30, 2001

Walking catfishes (*Clarias spp.*) are among the most important food fishes in Thailand. The aquacultural importance of catfish has given rise to research on its genetics including mapping its genome. From the practical viewpoint, the genetic map would provide the basis for detection of genes affecting economically important traits such as growth rate and disease resistance, and subsequent marker-assisted selection (MAS). Catfish has been chosen as a model system for future application of MAS. The aim of this work was to investigate the application of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers for genome analysis in *Clarias spp.* AFLP analysis is a rapid, reliable and cost-effective technique for DNA fingerprinting and genetic mapping. AFLP produces a large number of markers per assay. Ten primer combinations were used to amplify DNA samples of *C. macrocephalus* and *C. gariepinus*. A total of 376 AFLP fragments were scored. Fifty-seven markers were found to be specific to *C. macrocephalus* and 38 markers were observed only in *C. gariepinus*. Developed AFLP markers will be useful for species identification, population studies and genomic mapping. The segregation of 107 AFLP markers was studied in 79 *C. macrocephalus* haploid embryo generated from a single female. The AFLP map consists of 79 loci placed into 22 linkage groups, with 28 loci remain unlinked. The number of markers per linkage group varies from 2 to 19. The map spans 1243.3 cM with an average spacing of 15.74 cM. This map can serve as the starting point for detection of quantitative trait loci (QTLs) in walking catfish.

**Keywords :** AFLP, linkage mapping, *Clarias spp.*

## บทนำ (INTRODUCTION)

ปลาดุก (*Clarias spp.*) เป็นปลาพื้นเมืองที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศและมีการเพาะเลี้ยงมานานกว่า 20 ปี โดยเฉพาะปลาดุกอูย (*C. macrocephalus*) ซึ่งมีคุณภาพเนื้อดีที่สุดแต่เจริญเติบโตช้าและมีความต้านทานโรคต่ำ การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ต่อมาได้มีผู้นำปลาดุกยักษ์ (*C. gariepinus*) ซึ่งมีถิ่นกำเนิดที่ทวีปแอฟริกามาผสมกับแม่ปลาดุกอูยได้ลูกผสมที่เรียกว่าปลาดุกบิ๊กอูย (สุจินต์ และ คณะ 2533) ปลาดุกลูกผสมโตเร็วและต้านทานโรคดีกว่าปลาดุกอูยทำให้ได้รับความนิยมเลี้ยงในกลุ่มเกษตรกร ปัจจุบันการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมได้แทนที่ปลาดุกอูยถึง 90% อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลาดุกบิ๊กอูยก่อให้เกิดภัยคุกคามต่อพันธุกรรมของปลาดุกอูยในธรรมชาติ เนื่องจากมีรายงานว่าปลาดุกลูกผสมซึ่งหลุดรอดจากบ่อเลี้ยงระหว่างน้ำท่วมสามารถผสมพันธุ์กับปลาดุกอูยในแหล่งน้ำธรรมชาติได้ ผลที่เกิดขึ้นคือพันธุกรรมของปลาดุกอูยอาจถูกทำลายถึงขั้นสูญพันธุ์ได้ แนวทางหนึ่งที่จะช่วยรักษาพันธุกรรมปลาดุกอูยคือการปรับปรุงพันธุกรรมปลาดุกอูยและชักชวนให้เกษตรกรกลับมาเพาะเลี้ยงปลาดุกอูยอนุรักษ์ปลาพื้นเมืองของไทยให้มากขึ้น

โดยหลักการของการปรับปรุงพันธุ์โดยการคัดพันธุ์ (Selection) สามารถแบ่งได้ 2 แนวทางคือ 1) Trait-based selection คือการคัดพันธุ์แบบดั้งเดิมที่ใช้ลักษณะภายนอก (phenotypes) เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งการแสดงออกของลักษณะภายนอกได้รับอิทธิพลอย่างสูงจากสิ่งแวดล้อม และ 2) Marker-based selection คือการคัดพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม (genetic markers) ค้นหาีนควบคุมลักษณะปริมาณโดยตรงในพ่อแม่พันธุ์ ตามทฤษฎีการคัดพันธุ์วิธีนี้มีความถูกต้องกว่าวิธีแรกเนื่องจากสิ่งแวดล้อมไม่มีผลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายพันธุกรรม การคัดพันธุ์วิธีนี้เรียกว่า marker-assisted selection (MAS) ซึ่งจะมีประโยชน์มากสำหรับการคัดเลือกลักษณะเศรษฐกิจที่ถูกจำกัดโดยเพศหรือแสดงออกล่าช้าในวัยเจริญพันธุ์ กล่าวโดยย่อการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมประกอบด้วย 3 ขั้นตอนใหญ่ๆคือ 1) การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม 2) การสร้างแผนที่โครโมโซม และ 3) การหาตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะปริมาณ (Quantitative trait loci) หรือ QTLs

ผู้วิจัยได้เลือกปลาดุกอูยเป็น model ในการประยุกต์ใช้การคัดพันธุ์แบบ MAS ที่จะดำเนินการในอนาคตเนื่องจากความสำคัญทางเศรษฐกิจของปลาชนิดนี้และข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของปลาดุกอูยมีมากพอสมควร เป้าหมายหลักของการศึกษานี้เพื่อจำแนกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP สำหรับใช้สร้างแผนที่โครโมโซมของปลาดุก และวัตถุประสงค์ย่อยมีดังนี้ 1) ประเมินระดับความหลากหลาย ของ AFLP ในปลาดุกอูยและปลาดุกยักษ์ และ 2) สร้างแผนที่โครโมโซมเบื้องต้นของปลาดุกอูยโดยใช้ปลาแฮพลอยด์

### **เครื่องหมายพันธุกรรมชนิด AFLP (Amplified fragment length polymorphism)**

เทคนิค AFLP (Amplified fragment length polymorphism) ได้พัฒนาขึ้นโดย Vos และคณะ (1995) หลักการสำคัญของเทคนิค AFLP คือการเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) และเพิ่มปริมาณโดยขบวนการ polymerase chain reaction (PCR) วิธีปฏิบัติเริ่มด้วยการตัดตัวอย่างดีเอ็นเอ (genomic DNA) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ rare cutter enzyme (เช่น *EcoRI*) และ frequent cutter enzyme (เช่น *MseI*) เหตุผลในการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดมีดังนี้ ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย frequent cutter enzyme จะมีขนาดเล็กเหมาะแก่การเพิ่มจำนวนด้วย PCR ส่วนการใช้ rare cutter enzyme เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอต้นแบบ (templates) เนื่องจากเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่ปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วย frequent cutter enzyme และอีกด้านหนึ่งถูกตัดด้วย rare cutter enzyme เท่านั้นที่จะได้รับการเพิ่มปริมาณ ปลายด้านหนึ่งของ templates จะถูกต่อกับ *EcoRI* adapter และอีกด้านหนึ่งจะถูกต่อกับ *MseI* adapter คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเข้าคู่กับ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter จำนวนชิ้นดีเอ็นเอหรือ AFLP ที่จะได้รับการเพิ่มจำนวนจะขึ้นกับเบส 3 ตัว (selective bases) ที่สามารถเปลี่ยนแปลงลำดับหรือลดจำนวนได้ทางด้าน 3' ของคู่ไพรเมอร์ และแยกขนาด AFLP โดยวิธี electrophoresis เพื่อวิเคราะห์ผลต่อไป ข้อดีของเทคนิค AFLP คือในปฏิกิริยาหนึ่งสามารถผลิตชิ้นดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายสูงและใช้เป็นเครื่องหมายได้จำนวนมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น เช่น ไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellites) การศึกษา AFLP ทำได้เร็วเพราะไม่ต้องวิเคราะห์ลำดับและสังเคราะห์ไพรเมอร์ และมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เทคนิค AFLP จะมีค่าความน่าเชื่อถือในการทำซ้ำ (reproducibility) สูงกว่า

ในงานวิจัยพันธุกรรมของสัตว์น้ำ AFLP ได้ถูกนำมาใช้สร้างแผนที่โครโมโซมสำหรับปลาเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ปลานิล (*Tilapia*) (Kocher

โดยทั่วไปการผลิตทรัพยากร สำหรับใช้สร้างแผนที่ยีน (mapping materials) ในสัตว์น้ำ เช่น ปลา ทำได้ 2 วิธีคือ 1) การสร้างครอบครัว (mapping family) และ 2) การผลิตปลาแฮพลอยด์ (haploid genetics) ในการสร้างครอบครัวเป็นการผสมระหว่างปลา 2 สายพันธุ์ (strains) หรือชนิด (species) ที่มีความแตกต่างของอัลลีลของยีนหรือเครื่องหมายพันธุกรรมระหว่างปลาสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ ( $P_1$ ) เมื่อปลารุ่นลูก ( $F_1$ ) เจริญพันธุ์สามารถทำการผสมพันธุ์ได้ 2 แบบคือ (1) ผสมพันธุ์ระหว่าง  $F_1$  หรือ (2) ผสม backcross ระหว่าง  $F_1$  กับพ่อหรือแม่ ( $P_1$ ) แผนที่โครโมโซมสร้างจากการวิเคราะห์ข้อมูลการกระจายตัว (segregation) ของอัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมในปลา  $F_2$  หรือปลา backcross (Beckmann and Soller 1989) ส่วนปลาแฮพลอยด์ผลิตโดย นำไข่แม่ปลาที่มีสภาพ heterozygous หรือแม่ปลาลูกผสม (hybrids) ผสมกับน้ำเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเพื่อทำลายสารพันธุกรรม ลูกปลาจึงได้รับเฉพาะสารพันธุกรรมจากแม่และมีโครโมโซมเพียง 1 ชุด การกระจายตัวของยีนหรือเครื่องหมายพันธุกรรม ระหว่างการสร้างไข่ของแม่ปลาตรวจสอบได้โดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอลูกปลาแฮพลอยด์ ข้อดีของการใช้ปลาแฮพลอยด์ คือ สามารถสร้างแผนที่ยีนได้ในเวลาที่สั้นกว่าการสร้างครอบครัว (Lie และคณะ 1994) ตัวอย่าง เช่น แผนที่โครโมโซมปลา zebrafish (Postlethwait และคณะ 1994) แผนที่โครโมโซมปลา Atlantic salmon (Slettan และคณะ 1997) และ แผนที่โครโมโซมปลานิล (Kocher และคณะ 1998) การผลิตปลาแฮพลอยด์สำหรับปลาดุกอยู่ทำได้ค่อนข้างสะดวก เนื่องจากมีความดกไข่ที่เหมาะสม เช่น ในปลาดุกอยู่ขนาด 200 กรัมจะมีไข่ประมาณ 20,000 ฟอง และลูกปลาแฮพลอยด์สามารถมีชีวิตได้นานถึง 3 วัน (Na-Nakorn และคณะ 1993) เนื่องจากการจำแนกเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด AFLP ในปลาดุกและการสร้างแผนที่โครโมโซมปลาดุกอยู่ ยังมีได้มีศึกษามาก่อน และการใช้ปลาแฮพลอยด์ครั้งนี้ ทำให้การสร้างแผนที่โครโมโซมเบื้องต้นของปลาดุกเป็นไปได้ด้วยความรวดเร็ว

ระยะระหว่างหลอดและน้ำเชื้อ 30 เซนติเมตร รีดไข่แม่ปลาหลังจากฉีดฮอร์โมน 14 ชั่วโมง แม่ปลาแต่ละตัวมีไข่ประมาณ 5,000 ฟอง แบ่งไข่เป็นชุดๆ ละ 300-400 ฟองและผสมกับน้ำเชื้อที่ผ่านการฉายรังสี ฟักไข่ในน้ำที่มีอุณหภูมิ  $28 \pm 2$  °C ลูกปลาส่วนใหญ่ฟักเป็นตัวในเวลา 27-30 ชั่วโมง ไข่ปากคืบดึงเอาถุงไข่แดงออกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ 2 ตาและเก็บตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 10% เพื่อสกัดดีเอ็นเอต่อไป

## 2. การสกัดดีเอ็นเอ

### 2.1 ปลาแฮพลอยด์

สกัดดีเอ็นเอจากปลาแฮพลอยด์ตามวิธีการของ Kocher และคณะ (1998) บดลูกปลาทั้งตัวในหลอดขนาด 1.5 ml ใส่สารละลาย TEN buffer (100 mM tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 250 mM NaCl) ปริมาณ 150  $\mu$ l, 20% SDS 10  $\mu$ l และ proteinase K 5  $\mu$ l บ่มตัวอย่างใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการมาตรฐาน (Sambrook และคณะ 1989) โดยใช้ phenol และ chloroform/isoamyl alcohol (24:1) แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอใน isopropanol ล้างดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ทำให้แห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอในน้ำกลั่นเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °C

### 2.2 ปลาตกอูย ปลาตกยักษ์ และปลาคูกผสม

เก็บตัวอย่างเลือดปลาโดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 ml ดูดเลือดจากเส้นเลือดใหญ่ใต้แนวกระดูกสันหลังบริเวณครีบท

### 3. การจำแนกผลจากดีเอ็นเอชนิด AFLP

#### 3.1 การเตรียม DNA templates

3.1.1 *Digestion*: ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *EcoRI* และ *Tru9I* ชนิดละ 10 units ย่อยดีเอ็นเอปริมาณ 0.5-1.0  $\mu\text{g}$  ในหลอด microfuge ขนาด 200  $\mu\text{l}$  ควบคุมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงใน Buffer A (Boehringer Mannheim) ซึ่งประกอบด้วย 33 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM KCl 0.5 mM DTT และปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 40  $\mu\text{l}$

3.1.2 *Ligation*: เชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ถูกย่อยจากข้อ 3.1.1 ด้วย *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter โดยเติมสารละลาย 10  $\mu\text{l}$  ซึ่งประกอบด้วย 5 pmol *EcoRI* adapter, 50 pmol *MseI* adapter, 1.2 mM ATP, Buffer A และ *T<sub>4</sub>* DNA ligase 1.2 units ควบคุมปฏิกิริยาที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เจือจางปฏิกิริยา 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น Ultrapure เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 °C

#### 3.2 การเพิ่มจำนวน (Amplification)

##### 3.1.1 *PCR I (pre-amplification)*

นำดีเอ็นเอจากข้อ 3.1.2 ปริมาณ 5  $\mu\text{l}$  ผ่านขบวนการ PCR ขั้นแรกโดยใช้ primers ซึ่งเข้าคู่กับ adapter แต่ละตัว

ปริมาณ 10  $\mu$ l ซึ่งประกอบด้วย 95% formamide, 10 mM NaOH, 0.05% Bromophenol blue และ 0.05% xylene cyanol

### 3.3 การตรวจผล

ตรวจผลปฏิกิริยาปริมาณ 10  $\mu$ l จากข้อ 3.2.2 บน 1 % agarose gel ใน 0.5 X TBE แถบดีเอ็นเอจะปรากฏให้เห็นที่ Bromophenol blue แยกชั้นดีเอ็นเอปริมาณ 5  $\mu$ l จากข้อ 3.2.2 ใช้อุณหภูมิ 95 °C นาน 3 นาทีทำดีเอ็นเอเป็นเส้นเดี่ยว และลดอุณหภูมิเป็น 0 °C อย่างรวดเร็วบนน้ำแข็ง นำดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวดังกล่าวผ่าน electrophoresis บน denatured polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6% โดยใช้ sequencing gel apparatus (BioRad) ขนาด 30 X 40 ซม. ผ่านกระแสไฟฟ้า 70 W เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วย้อม gel โดยวิธี silver staining โดยนำ gel มา fix ด้วย 10% acetic acid เป็นเวลา 20 นาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำ 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที เติมสารละลายที่ประกอบด้วย silver nitrate ความเข้มข้น 0.1% และ 37% formaldehyde ปริมาณ 1.5 ml เป็นเวลา 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำ 1 ครั้ง เติม developer solution ที่แช่เย็นจัดซึ่งประกอบด้วย  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  จำนวน 30 g formaldehyde ความเข้มข้น 37% และ  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ปริมาณ 2 mg เขย่า gel จนปรากฏแถบสีชัดเจนและหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 10% acetic acid ทันที ล้างออกอีกครั้งด้วยน้ำเป็นเวลา 2 นาที

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapters และไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้าง AFLPs

| Enzyme</ |
|----------|
|----------|

#### 4.1.1 ความหลากหลายระหว่างชนิด (Interspecific polymorphism)

$$\% \text{ polymorphism} = \{(\sum(N_{cm} + N_{cg} - N_{shared}) \times 100)/N$$

$N_{cm}$  = จำนวน polymorphic bands ที่ปรากฏในปลาตุ๊กตูกอย

$N_{cg}$  = จำนวน polymorphic bands ที่ปรากฏในปลาตุ๊กตูกัยักษ์

$N_{shared}$  = จำนวน polymorphic bands ที่ปรากฏในปลาทั้งสองชนิด

$N$  = จำนวน AFLP ทั้งหมดจากไพรเมอร์ 10 คู่

#### 4.1.2 ความหลากหลายภายในชนิด (Intraspecific polymorphism)

$$\% \text{ polymorphism} = \{(\sum(N_c - N_{shared}) \times 100)/N$$

$N_c$  = จำนวน polymorphic bands ที่ปรากฏในปลาตุ๊กตูกอยหรือปลาตุ๊กตูกัยักษ์

$N_{shared}$  = จำนวน polymorphic bands ที่ปรากฏในปลาทั้งสองชนิด

$N$  = จำนวน AFLP ทั้งหมดจากไพรเมอร์ 10 คู่

### 4.2 การกระจายตัวของ AFLP ในปลาตุ๊กตูกอยแอฟพลอยด์ และการสร้างแผนที่โครโมโซม

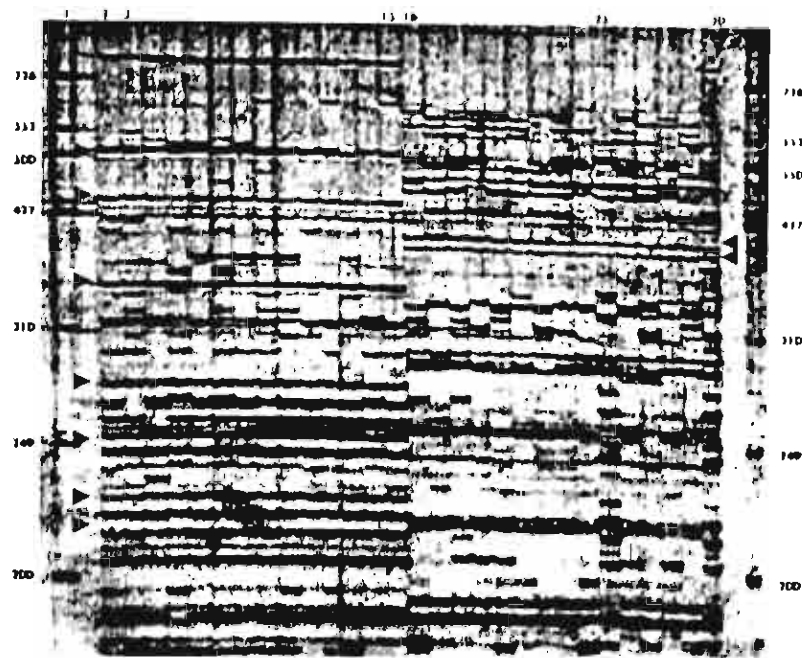
## ผลการทดลอง (RESULTS)

### ความหลากหลายของ AFLP (AFLP polymorphisms)

จากการสุ่มใช้ไพรเมอร์ 10 คู่ วิเคราะห์ AFLP ในปลาดุกอายุ 14 ตัว และปลาดุกยักษ์ 13 ตัว แถบ AFLP ที่ปรากฏมีขนาดตั้งแต่ 100-726 คู่เบส แต่บันทึกเฉพาะ AFLP ขนาด 150-700 คู่เบสที่ชัดเจนซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 376 แถบ (ตารางที่ 2 รูปที่ 1 และรูปที่ 2) ไพรเมอร์แต่ละคู่สร้าง AFLP โดยเฉลี่ย 19 แถบทั้งในปลาดุกอายุและปลาดุกยักษ์

ตารางที่ 2 ระดับความหลากหลายและจำนวนแถบ AFLP ที่ตรวจพบในปลาดุกอายุ (Cm) และปลาดุกยักษ์ (Cg) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่

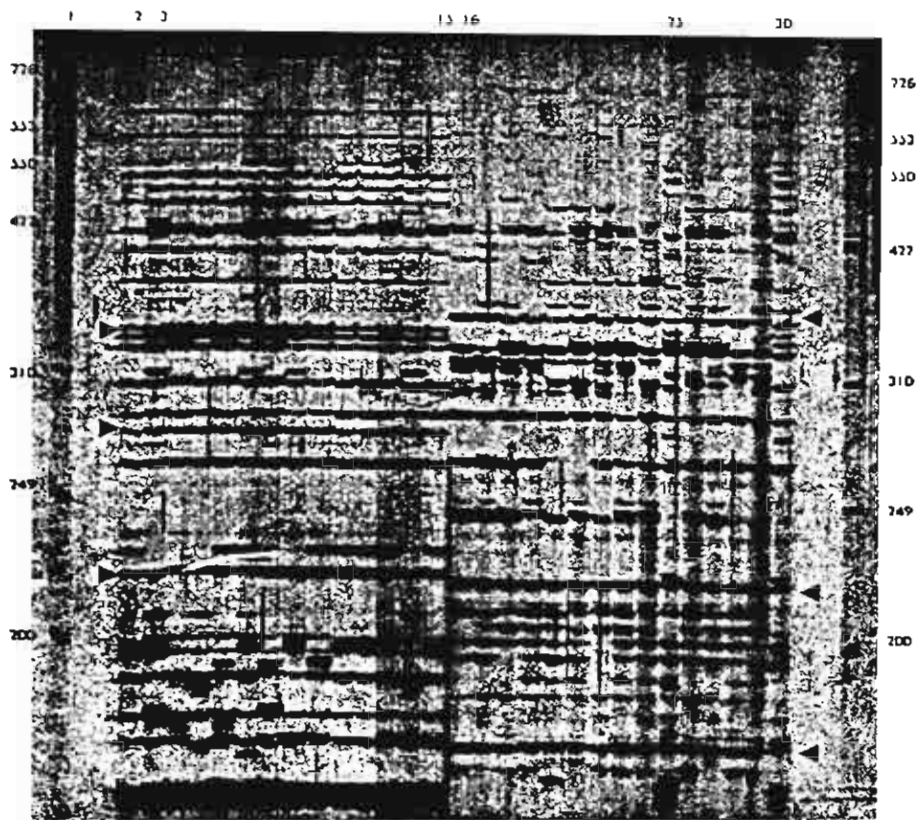
| คู่ไพรเมอร์ | จำนวนแถบทั้งหมด | จำนวน polymorphic bands |    |        |       | % Polymorphic bands |
|-------------|-----------------|-------------------------|----|--------|-------|---------------------|
|             |                 | Cm                      | Cg | Shared | Total |                     |
| AAC-CAA     | 36              | 22                      | 14 | 10     | 26    | 72.2                |
| AAC-CAC     | 24              | 13                      | 11 | 10     | 14    | 58.3                |
| AAC-CAG     | 52              | 29                      | 23 | 10     | 42    | 80.7                |
| AAC-CAT     | 44              | 19                      | 25 | 22     | 22    | 50.0                |



รูปที่ 1 ความหลากหลายของ AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ AAC CAG  
เลน 2-15 ปลาตุ๊กอูย เลน 16-24 และ 26-29 ปลาตุ๊กยักษ์  
เลน 25 และ 30 ปลาตุ๊กลูกผสม  
▶ AFLP ที่พบเฉพาะปลาตุ๊กอูย ◀ AFLP ที่พบเฉพาะปลาตุ๊กยักษ์

ตารางที่ 3 จำนวนแถบ AFLP ที่ตรวจพบเฉพาะ (species-specific bands)  
ในปลาตุ๊กอูยและปลาตุ๊กยักษ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 10 คู่

| คู่ไพรเมอร์ | ปลาตุ๊กอูย | ปลาตุ๊กยักษ์ |
|-------------|------------|--------------|
| AAC-CAA     | 9          | 1            |
| AAC-CAC     | 5          | 3            |
| AAC-CAG     | 10         | 3            |
| AAC-CAT     | 3          | 7            |
| AAC-CTC     | 5          | 2            |
| ACC-CAA     | 6          | 6            |
| ACC-CAC     | 5          | 4            |
| ACC-CAG     | 3          | 5            |
| ACC-CAT     | 5          | 2            |
| ACC-CTC     | 6          | 5            |



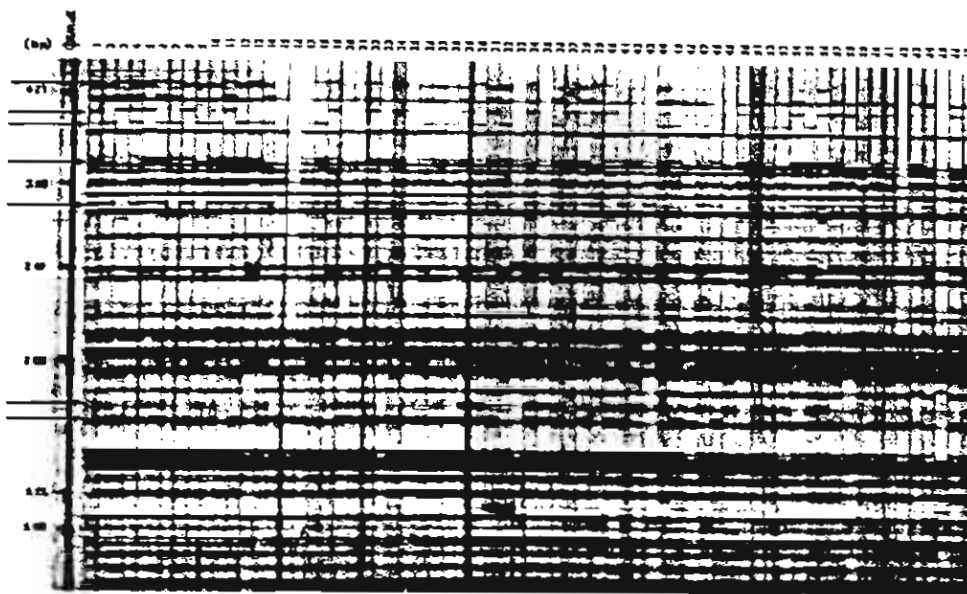
รูปที่ 2 ความหลากหลายของ AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ ACC-CAT  
เลน 2-15 ปลาดุกอุย เลน 16-24 และ 26-29 ปลาดุกยักษ์  
เลน 25 และ 30 ปลาดุกผสม  
▶ แสดงแถบ AFLP ที่พบเฉพาะปลาดุกอุย  
◀ แสดงแถบ AFLP ที่พบเฉพาะปลาดุกยักษ์

#### การกระจายตัวของ AFLP ในปลาดุกอุยแฮพลอยด์ และการสร้างแผนที่โครโมโซม

จากการใช้ไพรเมอร์ 32 คู่ สามารถสร้าง AFLP ที่เป็น polymorphic bands (รูปที่ 3) และเกิดการกระจายตัวในปลาแฮพลอยด์ทั้งหมด 162 ตำแหน่ง (loci) โดยจำนวน polymorphic bands มีค่าตั้งแต่ 1 ถึง 12 แถบ (ตารางที่ 4) และเมื่อทดสอบ Segregation distortion พบว่า AFLP จำนวน 107 ตำแหน่งมีสัดส่วนของแถบ AFLP ที่ปรากฏ (presence): ไม่ปรากฏ (absence) เท่ากับ 1:1 เมื่อวิเคราะห์ linkage สามารถจัดกลุ่ม AFLP ได้ 22 กลุ่ม (linkage groups) ซึ่งประกอบด้วย AFLP จำนวน 79 ตำแหน่ง (ภาพที่ 4) ส่วน AFLP อีกจำนวน 28 ตำแหน่งยังไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ จำนวนของ AFLP ในแต่ละกลุ่มมีค่าตั้งแต่ 2 ถึง 19 และระยะห่างระหว่าง AFLP แต่ละตำแหน่งมีค่าเฉลี่ย 15.74 cM ระยะทางรวมของแผนที่เท่ากับ 1243.3 cM

ตารางที่ 4 แสดงคู่ไพรเมอร์และจำนวน polymorphic bands ที่เกิดการกระจายตัวในปลาแฮพลอยด์

| Selective extension |            | Polymorphic bands |
|---------------------|------------|-------------------|
| <i>Eco</i>          | <i>Mse</i> |                   |
| AA                  | CTA        | 3                 |
| AA                  | CTC        | 7                 |
| AAC                 | AGG        | 1                 |
| AAC                 | ATG        | 3                 |
| AAC                 | CAA        | 4                 |
| AAC                 | CAC        | 4                 |
| AAC                 | CAG        | 8                 |
| AAC                 | CAT        | 12                |
| AC                  | CTC        | 6                 |
| ACC                 | AGG        | 5                 |
| ACC                 | ATG        | 4                 |
| ACC                 | CAA        | 5                 |
| ACC                 | CAC        | 3                 |
| ACC                 | CAG        | 10                |
| ACC                 | CTA        | 3                 |
| ACC                 | CTG        | 3                 |
| CT                  | ATG        | 3                 |
| CAG                 | ACC        | 8                 |
| CAG                 | ACT        | 5                 |
| CGT                 | ACC        | 6                 |
| CGT                 | ACT        | 6                 |
| CGT                 | AGG        | 1                 |
| CGT                 | ATG        | 6                 |
| GA                  | AGG        | 7                 |
| GA                  | ATG        | 5                 |
| GCA                 | AGG        | 3                 |
| GCA                 | ATG        | 2                 |
| GCA                 | CAA        | 7                 |
| GCA                 | CAT        | 7                 |
| GTA                 | CAC        | 4                 |
| GTA                 | CAG        | 6                 |
| GTA                 | CTA        | 5                 |



รูปที่ 3 การกระจายตัวของ AFLP ในปลาดุกอุยแอพพลอยด์เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย  
ไพรเมอร์ AAC-CAT ลูกศรแสดงแถบ AFLPs ที่เป็น polymorphic bands

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

### ความหลากหลายของ AFLP (AFLP polymorphisms)

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาความหลากหลายของไอโซไซม์ 7 ตำแหน่งในปลาดุกอุยธรรมชาติ 4 ประชากร โดย Na-Nakorn และคณะ (1998) ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายของ AFLP ในปลาดุกอุย (50.3%) มีค่าสูงกว่าความหลากหลายของไอโซไซม์ (10.5-26.3%) และความหลากหลายของ AFLP ระหว่างปลาดุกอุยกับปลาดุกยักษ์ (interspecific polymorphism) มีค่าในระดับสูง (68.6%) และพบว่าความหลากหลายภายในชนิดของปลาดุกยักษ์ (intraspecific polymorphism) มีค่าสูงเช่นกัน (49.7%) ปลาดุกอุยและปลาดุกยักษ์จากโรงเพาะฟักใช้ในการทดลองครั้งนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ตัวอย่างเช่นเมื่อใช้ไพรเมอร์ AAC-CAG ตรวจดีเอ็นเอของปลาดุกอุยพบว่า แถบ AFLP ขนาด 310-427 คู่เบส มีความหลากหลายสูง และเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันตรวจดีเอ็นเอปลาดุกยักษ์พบว่า แถบ AFLP ขนาด 7

เฉพาะปลาดุกอูย (57 แถบ) ซึ่งมีจำนวนมากกว่า AFLP ที่พบเฉพาะปลาดุกยักษ์ (38 แถบ) แถบ AFLP ที่เป็น species-specific bands ที่จำแนกได้ในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากมีประโยชน์สำหรับการสร้างแผนที่โครโมโซมแล้ว ยังสามารถนำไปใช้ศึกษาอนุกรมวิธานปลาดุกสกุล *Clarias* โดยทั่วไปการแยกชนิดปลาที่ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) เป็นเกณฑ์จะต้องสังเกตในปลาที่มีขนาดโตเต็มวัย แต่การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยให้นักอนุกรมวิธานสามารถแยกชนิดปลาได้ตั้งแต่วัยอ่อน เนื่องด้วยธรรมชาติของเครื่องหมายพันธุกรรมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตามอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเหมือนลักษณะทางสัณฐานวิทยา และในกรณีที่ปลาบางตัวมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาปรากฏไม่ชัดเจนสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือตัดสินได้ ประโยชน์อีกประการหนึ่งของ AFLP ที่เป็น species-specific bands คือสามารถนำไปใช้ตรวจสอบการปะปนของปลาดุกลูกผสมที่หลุดรอดลงในแหล่งน้ำธรรมชาติ หรือการผสม backcross ระหว่างปลาดุกลูกผสมกับปลาดุกอูย

#### การสร้างแผนที่โครโมโซมโดยใช้ปลาดุกอูยแฮพลอยด์

การสร้างแผนที่โครโมโซมโดยใช้ปลาแฮพลอยด์ทำได้รวดเร็วและมีประโยชน์มากสำหรับปลาดุกอูยเนื่องจากในการสร้างครอบครัวต้องใช้เวลาประมาณ 3 ปีในการผลิตลูกรุ่น  $F_1$  รุ่น  $F_2$  หรือ backcross เพราะปลาดุกอูยที่จะเป็นพ่อแม่พันธุ์ต้องมีอายุประมาณ 8 เดือนถึง 1 ปี แต่การผลิตปลาแฮพลอยด์สามารถทำได้ทันทีที่เมื่อแม่ปลาถึงวัยเจริญพันธุ์ อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ลูกปลาแฮพลอยด์มีอัตราการตายสูง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิด Segregation distortion ของ AFLP เนื่องจาก AFLP จำนวน 55 ตำแหน่ง (34%) ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อสร้างแผนที่ได้

แผนที่โครโมโซมที่ดีต้องประกอบด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมจำนวนมากที่มีความหลากหลายของอัลลีลสูง (highly polymorphic markers) แผนที่โครโมโซมปลาส่วนใหญ่ในระยะแรกประกอบด้วยไอโซไซม์ (isozymes) เช่น ปลาตระกูล salmon



ทำแผนที่ยีนที่ใช้การสร้างครอบครัวแบบผสมข้ามระหว่างปลาดุกอุยและปลาดุกยักษ์ แม้ว่าโดยธรรมชาติ AFLP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น dominant markers จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าไมโครแซทเทลไลต์ที่เป็น codominant markers และได้รับการยอมรับโดยนักวิจัยพันธุศาสตร์ว่าเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ดีที่สุด แต่การพัฒนาและออกแบบไพรเมอร์สำหรับไมโครแซทเทลไลต์นั้นใช้เวลาและเสียค่าใช้จ่ายที่สูงมาก และเทคนิคที่ใช้มีความซับซ้อน ในงานวิจัยเพื่อพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมที่งบประมาณและเวลามีจำกัด การพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์จำนวนมากสำหรับใช้สร้างแผนที่โครโมโซม จึงค่อนข้างยากที่จะประสบความสำเร็จ เนื่องจากข้อดีหลายประการของ AFLP ทำให้แนวโน้มของงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดนี้มีมากขึ้น แผนที่โครโมโซมที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับโครงการ QTL mapping ในอนาคต และนักวิจัยสามารถจัดตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรมอื่นๆลงบนแผนที่นี้เพื่อเพิ่มรายละเอียด

### ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

#### 1. การสร้างแผนที่โครโมโซมโดยใช้ปลาแฮพลอยด์

แม้ว่าประโยชน์ของการใช้ปลาแฮพลอยด์ในการสร้างแผนที่โครโมโซมคือ ความง่ายในการอ่านผล และทำได้รวดเร็ว แต่ข้อเสียของปลาแฮพลอยด์ คือ ความจำกัดของข้อมูล เนื่องจากสามารถตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้เฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย PCR เท่านั้น ข้อมูลลักษณะอื่นๆ เช่น ไอโซไซม์ ไม่สามารถสังเกตได้ในปลาแฮพลอยด์ ซึ่ง Kocher และคณะ (1998) ได้แนะนำว่าควรจะทำ doubled haploids โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมในระยะก่อนการแบ่งเซลล์ไมโทซิสครั้งที่ 1 (Suppression of the first mitotic division) เพื่อให้ปลาสามารถมีโอการรอดและเจริญเติบโตมีขนาดใหญ่ขึ้น

#### 2. การเพิ่มรายละเอียดของแผนที่

การเพิ่มรายละเอียดของ

## เอกสารอ้างอิง (REFERENCES)

- ชวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2532. การศึกษาโครโมโซมของปลาดุกด้าน และปลาดุกอุยที่พบในประเทศไทย. หน้า 421-428 ในรายงานผลการวิจัยสาขาสัตว สัตวแพทย์และประมง การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 27. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
- สุจินต์ หนูขวัญ กำชัย ลาวัณยวุฒิ มานพ ตั้งตรงไพโรจน์ และ ปรัชชัย วีรสิทธิ์. 2533. การเพาะพันธุ์ปลาดุกผสมกับปลาดุกอุยและดุกเทศ. หน้า 529-544 ใน รายงานผลการวิจัยสาขาสัตว สัตวแพทย์และประมง การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 28. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
- Agresti, J.J., S. Seki, A. Cnaani, S. Poompuang, E.M. Hallerman, N. Umiel, G. Hulata, G.A.E. Gall, and B. May. 2000. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. *Aquaculture* 185:43-56.
- Beckman, J.S., and M. Soller. 1989. Backcross and inbred lines for mapping and cloning of loci of interest. In: *Development and application of molecular markers to problems in plant genetics*, pp. 117-122. (B. Burr and T. Helentjar, eds.). Brookhaven National Laboratory, New York.
- Kocher, T.D., W-J. Lee, H. Sobolewska, D. Penman and B. McAndrew. 1998. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* 148: 1225-1232.
- Lie, O., A. Slettan, F. Lingaas, I. Olsaker, I. Hordvik, and T. Refstie. 1994. Haploid gynogenesis: a powerful strategy for linkage analysis in fish. *Ani. Biotech.* 5(1): 33-45.
- Liu, Z., and R. Dunham. 1998. Progress report on the status of catfish mapping. Abstract: International plant and animal genome conference, San Diego, CA, January 18-22, 1998.

- Maughan, P.J., M.A. Saghai-Maroofo, G.R. Buss, and G.M. Huestis. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93: 392-401.
- May, B., and K. Johnson. 1993. Composite linkage map of salmonid fishes (*Salvelinus*, *Salmo*, *Oncorhynchus*). In *Genetic maps* (S. O'Brien, ed). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Morizot, D.C., J. Harless, R.S. Nairn, K.D. Kallmand and R.B. Walter. 1993. Linkage maps of non-salmonid fishes. In: *Genetic Maps of non-salmonid fishes*. In: *Genetic Maps: Locus Maps of Complex Genomes*. O'Brien, S.J. (ed.) Cold Spring Harbor. 4 : 318-325.
- Na-Nakorn, U., W. Rangsin, and S. Witchasunkul. 1993. Suitable conditions for induction of gynogenesis in the catfish, *Clarias macrocephalus*, using sperm of *Pangasius sutchi*. *Aquaculture* 118:53-62.
- Na-Nakorn, U., M. Hara, N. Taniguchi and S. Seki. 1998. Isozyme variation of *Clarias macrocephalus* from four locations in Thailand. *Fisheries Science* 64(4): 526-530.
- Postlethwait, J., S.L. Johnson, C.N. Midson, W.S. Talbot, M. Gates, E.W. Ballinger, D. Africa, R. Andrews, T. Carl, J.S. Eisen, S. Horne, C.B. Kimmel, M. Hutchinson, M. Johnson, and A. Rodriguez. 1994. A genetic linkage map for the zebrafish. *Science* 264:699-703.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A lab manual*, 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Slettan, I., Olsaker, and O. Lie. 1997. Segregation studies and linkage analysis of Atlantic salmon microsatellites using haploid genetics. *Heredity* 78: 620-627.
- Taggart, J. B., R.A. H

- Tiersh, T.R., and C.A. Goudie. 1993. Inheritance and variation of genome size in half-sib families of hybrid ictalurid catfishes. *J. Heredity* 84: 122-125.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21): 4407-4414.

## Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

### 1. ผลงานวิจัยที่จะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1.1 เรื่อง : Diversity and inheritance of AFLP markers in walking catfish (*Clarias macrocephalus*), African catfish (*C. gariepinus*), and their hybrids

วารสาร : Journal of Applied Aquaculture

1.2 เรื่อง : A preliminary genetic map of walking catfish (*Clarias macrocephalus*)

วารสาร : Aquaculture

### 2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

2.1 เป็นข้อมูลประกอบการเรียนการสอนวิชา 251541 (Genetic improvement of aquatic animals)

2.2 เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับโครงการวิจัยอื่นๆที่กำลังดำเนินการสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ปลาดุกอุย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

### 3. กิจกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

3.1 เสนอผลงานในการประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 39 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ระหว่างวันที่ 5-7 กุมภาพันธ์ 2544

3.2 เสนอผลงานในการประชุมของสมาคมพันธุศาสตร์ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2544