



การค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปที่สัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานโรคตายด่วน (EMS-AHPND) ในกุ้งขาว

อนงค์ นิมละมัย^{*1}, พนม กระจำวงศ์ สอดสุข[†], จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ² และ อัมรา ลินประเสริฐพร²

¹กองวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา

[†]ข้าราชการบำนาญ

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปที่สัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานโรคตายด่วนในกุ้งขาว ตัวอย่างกุ้งขาวที่ใช้ในการศึกษาได้จากการดำเนินงานใน “โครงการสร้างประชากรพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวปลอดโรคและโตดี เพื่อการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน” จากการศึกษาพบสนิปจำนวน 13 ตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานโรคตายด่วน แบ่งเป็นสนิปในยีน peroxinectin (LV-PX), lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) และ 5-hydroxytryptamine receptor 1 (5-HT1R) จำนวน 2, 4 และ 7 ตำแหน่ง ตามลำดับ สนิป 13 ตำแหน่งสามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) ในครั้งนี้ได้ 4 ตำแหน่ง คือ 5-HT1R156A>G, 5-HT1R228C/G, LGBP65T>C และ LGBP160T>G ซึ่งผ่านการทดสอบยืนยันกับตัวอย่างกุ้งขาวที่ผ่านการคัดเลือกในสายต้านโรคตายด่วนแล้ว พบว่า กุ้งที่มีความต้านทานต่อโรคตายด่วนควรมีรูปแบบจีโนไทป์/อัลลีล ของ 4 ตำแหน่งดังกล่าว เป็น GG/G, CC/C, CC/C และ TT/T ตามลำดับ ($P<0.05$) ดังนั้นจึงสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปทั้ง 4 ตำแหน่ง ช่วยในการตรวจสอบและยืนยันผลการคัดเลือกลักษณะการต้านทานโรคตายด่วนในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์กุ้งขาวได้

คำสำคัญ: กุ้งขาว โรคตายด่วน สนิป เครื่องหมายดีเอ็นเอ ทดสอบยืนยัน

ผู้รับผิดชอบ: 39 หมู่ 1 ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120 E-mail: anongni@gmail.com

E-mail: panomks@yahoo.com



Identification and development of SNP markers related to EMS-AHPND resistance in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)

Anong Nimlamai^{*1}, Panom K. Sodsuk[†], Jumroensri Thawonsuwan² and Ammara Sinprasertporn²

¹Aquatic Animal Genetics Research and Development Division

²Songkhla Aquatic Animal Health Research and Development Center

[†]Retired government official

Abstract

This study aimed to identify and develop SNP markers related to EMS-AHPND resistance in Pacific white shrimp. The samples used in the study were obtained from the project “Founding of the SPF and High Growth Performance Broodstock of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, for Thailand Aquaculture and Sustainable Utilization”. From the study, 13 SNPs which were the 2, 4 and 7 SNPs respectively in the peroxinectin (LV-PX), lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) and 5-hydroxytryptamine receptor 1 (5-HT1R) genes were found to be associated with EMS-AHPND resistance. By the 13 SNPs found, 4 of them could have been developed as DNA markers (5-HT1R156A>G, 5-HT1R228C/G, LGBP65T>C and LGBP160T>G) using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP). Confirmation of the 4 markers were tested with the shrimps selectively bred for EMS-AHPND resistance and the resulting genotype/allele variations of the 5-HT1R156A>G, 5-HT1R228C/G, LGBP65T>C and LGBP160T>G markers should be GG/G, CC/C, CC/C, and TT/T, respectively ($P<0.05$). These DNA markers can be used to verify and confirm the EMS-AHPND resistance in the Pacific white shrimp selective breeding programs.

Keywords: Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, EMS-AHPND, SNP, DNA markers, confirmation test

Corresponding author: 39 Moo 1, Khlong Ha, Khlong Luang, Pathumthani 12120 E-mail: anongni@gmail.com

E-mail: panomks@yahoo.com



คำนำ

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงมากกว่า 2 แสนตัน สามารถส่งออกสร้างรายได้เข้าประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท (พัชรินทร์, 2566) โดยตั้งแต่ปี 2555 เป็นต้นมา เกิดวิกฤตการระบาดของโรคตายด่วน (Early Mortality Syndrome, EMS) ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียที่ทำให้ตับและตับอ่อนเสื่อมสภาพอย่างฉับพลัน (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND) ทำให้กุ้งตายระหว่างการเลี้ยงเป็นจำนวนมาก (Tran *et al.*, 2013) ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจในท้องถิ่นจนถึงระดับประเทศเป็นวงกว้าง จากปัญหาการระบาดของโรคตายด่วน ทำให้ผลผลิตกุ้งไทยลดลงไปกว่าครึ่ง โดยเมื่อเปรียบเทียบกับปี 2553 ก่อนที่จะมีการระบาดของโรคตายด่วน ประเทศไทยมีผลผลิตกุ้งมากกว่า 6 แสนตัน หลังจากเกิดโรคตายด่วนระบาดในกุ้งเป็นเวลานานกว่า 10 ปี ส่งผลให้ประเทศไทยสูญเสียโอกาสในการทำรายได้จากผลผลิตกุ้งคิดเป็นมูลค่าประมาณ 5 แสนล้านบาท (ประชาชาติธุรกิจ, 2566) ปัจจุบันยังไม่สามารถแก้ไขปัญหาการระบาดของโรคตายด่วนได้อย่างมีประสิทธิภาพมากพอ ส่วนใหญ่เป็นการแก้ปัญหาเฉพาะหน้าและบรรเทาความเดือดร้อนในระยะสั้น การปรับปรุงพันธุ์กุ้งขาวให้มีความต้านทานต่อโรคตายด่วนจะเป็นการแก้ไขปัญหาระยะยาวที่มีความยั่งยืน ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์กุ้งขาวให้มีความต้านทานโรคตายด่วน สามารถดำเนินการได้หลายวิธี ทั้งการคัดเลือกจากลักษณะปรากฏเพียงอย่างเดียว และการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยและยืนยันผลในการคัดเลือก ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ได้เนื่องจากมีความแม่นยำกว่าการสังเกตจากลักษณะที่ปรากฏออกมาเพียงอย่างเดียว (จิราพร และคณะ, 2563)

สแนป (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) เป็นตำแหน่งที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอเพียงตำแหน่งเดียว มีการกระจายอยู่ทั่วจีโนม มีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ ถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ และสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ง่าย (กนกวรรณ และวรัญญา, 2007) จึงเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งสแนปกับลักษณะที่สนใจในสัตว์น้ำเศรษฐกิจ เช่น ลักษณะต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล (อนงค์ และคณะ, 2557) ลักษณะทนความเค็มในปลานิล (อนงค์ และคณะ, 2560; 2562) และลักษณะการเจริญเติบโตของกุ้งขาว (Glenn *et al.*, 2005; Marti *et al.*, 2010; Lyu *et al.*, 2021) เป็นต้น ซึ่งการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอสแนปมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือกจำเป็นต้องพัฒนาดำแหน่งสแนปเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิคต่างๆ ที่มีความเหมาะสมต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสแนปที่สัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานโรคตายด่วนในกุ้งขาว

วิธีดำเนินการ

1. การค้นหาตำแหน่งสแนป

1.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

ตัวอย่างกุ้งขาวที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างจากการดำเนินงานใน “โครงการสร้างประชากรพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวปลอดโรคและโรค เพื่อการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน” โดยตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์หาสแนปในยีนที่มีความสัมพันธ์กับการต้านทานโรคตายด่วน ใช้ตัวอย่างกุ้งขาวรุ่น P_0 ที่รอดตายจากการทดลองหาค่า LC_{50} ที่ระดับความเข้มข้น 10^4 - 10^5 CFU/ml ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นเชื้อสูงสุดของการทดลอง จำนวน 36 ตัวอย่าง และกุ้งตายที่ผ่านการทดสอบความต้านทานเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ระดับ LC_{50} (8.61×10^4 CFU/ml) จากครอบครัวกุ้งที่มีอัตราการตายสูงที่สุดในช่วง 3-7 วันหลังจากได้รับเชื้อ จำนวน 30 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างที่ใช้สำหรับการทดสอบยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอสแนปเป็นตัวอย่างกุ้งขาวในรุ่นที่ 3 และ 4 (F_3 และ F_4) ซึ่งผ่านการทดสอบความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ระดับความเข้มข้น LC_{50} ของแต่ละรุ่น โดยแบ่งเป็นกุ้งขาวกลุ่มตายและรอดตาย นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร



1.2 การออกแบบไพรเมอร์และหาสภาวะที่เหมาะสม

ออกแบบไพรเมอร์จากยีนที่มีการแสดงออกเมื่อกุ้งขาวมีการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* จำนวน 27 คู่ไพรเมอร์ (พนม และคณะ, 2565) ดำเนินการหาสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์ด้วยเทคนิค PCR โดยนำดีเอ็นเอกุ้งขาวที่สกัดได้ ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์

1.3 การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างกุ้งขาวกลุ่มตายและรอดตาย จากข้อ 1.1 มาทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ของยีน ในระบบ ภูมิคุ้มกัน แล้วส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมระหว่างกุ้งขาว กลุ่มตายและรอดตาย เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต้านทานโรคตายด่วนกับจีโนไทป์/อัลลีลที่ปรากฏ โดยการทดสอบความเป็นอิสระด้วยไค-สแควร์ (Chi-square independence test) โดยวิธี Fisher's Exact Test (Fisher, 1992) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. การพัฒนาตำแหน่งสลับเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ก่อนการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสลับจะดำเนินการวิเคราะห์ Linkage disequilibrium (LD) ของสลับในแต่ละยีนด้วยโปรแกรม SNPStat (Sole et al., 2006) เพื่อพิจารณาว่าสลับตำแหน่งใดมีการถ่ายทอดไปด้วยกันบ้าง ช่วยให้ การตรวจ genotype ยากขึ้น เนื่องจากสามารถเลือกตรวจสลับเพียงบางตำแหน่งก็เพียงพอ หลังจากนั้นจึงทำการพัฒนา เครื่องหมายดีเอ็นเอสลับ โดยใช้เทคนิค Kompetitive Allele Specific PCR (KASP)

3. การทดสอบยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอสลับ

นำเครื่องหมายดีเอ็นเอสลับที่พัฒนาได้มาทำการทดสอบยืนยันกับตัวอย่างกุ้งขาวที่ผ่านการทดสอบความ ต้านทานเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 2 รุ่น ได้แก่ กุ้งขาวรุ่น F₃ (จำนวนทั้งหมด 1,183 ตัวอย่าง) ซึ่งเป็นตัวอย่างกลุ่มที่ได้รับการคัดเลือกทั้งหมด 19 ครอบครัว จำนวน 965 ตัวอย่าง และกลุ่มที่มีอัตราการรอดน้อยสุด 5 ครอบครัว จำนวน 218 ตัวอย่าง กุ้งขาว รุ่น F₄ (จำนวนทั้งหมด 1,004 ตัวอย่าง) ประกอบด้วยกุ้งที่ตายภายใน 3 วัน หลังผ่านการทดสอบความต้านทานเชื้อ จำนวน 105 ตัวอย่าง กุ้งที่รอดตายหลังการทดสอบความต้านทานเชื้อ จำนวน 105 ตัวอย่าง ตัวอย่างกุ้งกลุ่มที่ได้รับการคัดเลือกทั้งหมด 8 ครอบครัว จำนวน 545 ตัวอย่าง และกลุ่มที่มีอัตราการรอดน้อยที่สุด 5 ครอบครัว จำนวน 249 ตัวอย่าง หลังจากนั้นวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างกุ้งขาวที่ตายและรอดตายกับจีโนไทป์/อัลลีลที่ปรากฏ โดยการทดสอบความเป็นอิสระด้วย ไค-สแควร์ (Chi-square independence test) โดยวิธี Fisher's Exact Test (Fisher, 1992) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

ผลการทดลอง

1. การค้นหาตำแหน่งสลับ

1.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

เมื่อตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A260) และ 280 นาโนเมตร (A280) พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 1.5-2.1 โดยดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ควรมีอัตราส่วน A260/A280 อยู่ในช่วง 1.6-1.8 หากต่ำกว่า 1.6 แสดงว่ามีโปรตีนปะปนอยู่ ถ้ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามี RNA ปะปนอยู่ ซึ่งคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่สกัดได้สามารถนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปได้

1.2 การออกแบบไพรเมอร์และหาสภาวะที่เหมาะสม

จากการออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมด 27 คู่ไพรเมอร์ สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิต PCR ได้จำนวน 15 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ไพรเมอร์ TLR, LGBP, LV-PX, LV-proPO -I, LV-proPO- II, LV-cytMnSOD, LSZ, ALF2, ALF4, HcSC, LV- α 2M, LV-I β , LV-HSP 70, 5-HT1R และ LV-LGBP ไม่สามารถเพิ่มผลผลิต PCR (NA; no amplification product) จำนวน 5 คู่ และผลผลิต PCR ไม่มีความจำเพาะ (NS; non specific) จำนวน 7 คู่



1.3 การค้นหาชนิดพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

จากการค้นหาตำแหน่งชนิดพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบชนิดพันธุ์จำนวน 13 ตำแหน่ง ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานโรคตายด่วน แบ่งเป็นชนิดพันธุ์ในยีน peroxinectin (LV-PX), lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) และ 5-hydroxytryptamine receptor 1 (5-HT1R) จำนวน 2, 4 และ 7 ตำแหน่ง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ไค-สแควร์ ในตำแหน่งชนิดพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กับตัวอย่างกุ้งรอด/กุ้งตาย

No.	ยีน	ตำแหน่ง	จีโนไทป์/อัลลีล	จำนวนกุ้งรอด	จำนวนกุ้งตาย	รวม	P-value
1	LV-Px	141C>T	จีโนไทป์				
			CC	13	7		
			TT	0	3	32	0.024*
			CT	2	7		
			อัลลีล				
			C	28	21	64	0.003*
2	LV-Px	254A>G	จีโนไทป์				
			AA	6	14		
			GG	3	0	32	0.029*
			AG	6	3		
			อัลลีล				
			A	18	31	64	0.003*
3	LGBP	60T>C	จีโนไทป์				
			TT	5	5		
			CC	1	12	47	0.003*
			TC	16	8		
			อัลลีล				
			T	26	18	94	0.025*
4	LGBP	65T>C	จีโนไทป์				
			TT	0	9		
			CC	18	9	47	0.002*
			TC	4	7		
			อัลลีล				
			T	4	25	94	0.000*
			C	40	25		

หมายเหตุ: * หมายถึง จำนวนกุ้งรอดและตายมีความสัมพันธ์กับรูปแบบจีโนไทป์/อัลลีลที่ปรากฏอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ตารางที่ 1 (ต่อ)

No.	ยีน	ตำแหน่ง	จีโนไทป์/อัลลีล	จำนวนกุ้งรอด	จำนวนกุ้งตาย	รวม	P-value
5	LGBP	69A>G	จีโนไทป์				
			AA	6	4		
			GG	4	14	47	0.029*
			AG	12	7		
			อัลลีล				
			A	24	15	94	
G	20	35					
6	LGBP	160T>G	จีโนไทป์				
			TT	22	18		
			GG	0	0	47	0.008*
			TG	0	7		
			อัลลีล				
			T	44	43	94	
G	0	7					
7	5-HT1R	156A>G	จีโนไทป์				
			AA	0	0		
			GG	17	10	34	0.004*
			AG	0	7		
			อัลลีล				
			A	0	7	68	
G	34	27					
8	5-HT1R	213A>G	จีโนไทป์				
			AA	0	0		
			GG	17	12	34	0.022*
			AG	0	5		
			อัลลีล				
			A	0	5	68	
G	34	29					
9	5-HT1R	216T>C	จีโนไทป์				
			TT	0	0		
			CC	10	17	34	0.004*
			TC	7	0		
			อัลลีล				
			T	7	0	68	
C	27	34					



ตารางที่ 1 (ต่อ)

No.	ยีน	ตำแหน่ง	จีโนไทป์/อัลลีล	จำนวนกุ้งรอด	จำนวนกุ้งตาย	รวม	P-value
10	5-HT1R	228C>G	จีโนไทป์				
			CC	17	12		
			GG	0	0	34	0.022*
			CG	0	5		
			อัลลีล				
			C	34	29	68	0.053
11	5-HT1R	377A>G	จีโนไทป์				
			AA	0	0		
			GG	10	17	34	0.004*
			AG	7	0		
			อัลลีล				
			A	7	0	68	0.011*
12	5-HT1R	393C>G	จีโนไทป์				
			CC	17	8		
			GG	0	0	34	0.001*
			CG	0	9		
			อัลลีล				
			C	34	25	68	0.002*
13	5-HT1R	434A>C	จีโนไทป์				
			AA	0	0		
			CC	11	17	34	0.009*
			AC	6	0		
			อัลลีล				
			A	6	0	68	0.025*
			C	28	34		

หมายเหตุ: * หมายถึง จำนวนกุ้งรอดและตายมีความสัมพันธ์กับรูปแบบจีโนไทป์/อัลลีลที่ปรากฏอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2. การพัฒนาตำแหน่งสปีเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ

จากการวิเคราะห์ linkage disequilibrium ของตำแหน่งสปีในแต่ละยีนด้วยโปรแกรม SNPStat พบว่า ตำแหน่งสปีในยีน LV-PX จำนวน 1 คู่ ถ่ายทอดไปด้วยกัน (141-254) ตำแหน่งสปีในยีน LGBP จำนวน 5 คู่ ถ่ายทอดไปด้วยกัน (60-65, 60-69, 65-69, 65-160 และ 69-160) และตำแหน่งสปีในยีน 5-HT1R จำนวน 7 คู่ ถ่ายทอดไปด้วยกัน (156-216, 156-377, 156-434, 213-228, 216-377, 216-434 และ 377-434) และตำแหน่ง 393 ไม่มีการถ่ายทอดไปกับตำแหน่งใดๆ สำหรับเกณฑ์การพิจารณาเลือกพัฒนาตำแหน่งสปีเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอจะพิจารณาเลือกตำแหน่งสปีที่ไม่ถ่ายทอดไปกับตำแหน่งใดๆ ส่วนสปีในแต่ละยีนที่มีการถ่ายทอดไปด้วยกันจะเลือกมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพียง 1 ตำแหน่ง หลังจากนั้นพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำที่มากกว่า 80% นำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยในการพัฒนาตำแหน่งสปีเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอครั้งที่ 1 จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ 5-HT1R156A>G, 5-HT1R393C>G, LGBP65T>C และ LV-PX141C>T พบว่า มีความแม่นยำ 96.15, 79.17, 82.14 และ



71.43% ตามลำดับ ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอจำเป็นต้องมีความแม่นยำที่สูงมาก แต่พบว่าตำแหน่ง 5-HT1R393C>G, และ LV-PX141C>T มีความแม่นยำค่อนข้างต่ำ (ต่ำกว่า 80%) จึงไม่นำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในครั้งนี้ หลังจากนั้นพัฒนาตำแหน่งสลับเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพิ่มเติมเป็นครั้งที่ 2 คือตำแหน่ง LGBP160T>G และ 5-HT1R228C>G พบว่า มีความแม่นยำในการจีโนไทป์ 86.95 และ 95.65% ตามลำดับ ดังนั้น จึงพิจารณาเลือกตำแหน่งสลับที่มีความแม่นยำในการจีโนไทป์มากกว่า 80% จำนวน 4 ตำแหน่ง นำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ได้แก่สลับตำแหน่ง 5-HT1R156A>G, 5-HT1R228C>G, LGBP65T>C และ LGBP160T>G

3. การทดสอบยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิป

3.1 การทดสอบยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปกับกุ้งขาวรุ่น F_3

จากผลการทดสอบยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิป 4 ตำแหน่ง กับตัวอย่างกุ้งขาวรุ่น F_3 จำนวน 1,183 ตัวอย่าง พบว่า ทั้งจีโนไทป์และอัลลีลของเครื่องหมายสลับทั้ง 4 ตำแหน่ง มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคตายด่วน โดยกุ้งที่มีความต้านทานต่อโรคตายด่วนมีรูปแบบความสัมพันธ์ของจีโนไทป์/อัลลีล ในตำแหน่ง 5-HT1R156A>G, 5-HT1R228C>G, LGBP65T>C และ LGBP160T>G เป็น GG/G, CC/C, CC/C และ TT/T ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้ในขั้นตอนค้นหาตำแหน่งสลับ

ตารางที่ 2 สรุปการวิเคราะห์ทางสถิติของความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และอัลลีลกับความต้านทานโรคตายด่วน ในขั้นตอนการทดสอบยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิป โดยทดสอบกับตัวอย่างกุ้งขาวรุ่น F_3 ที่ผ่านการทดสอบความต้านทานเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกลุ่มที่ได้รับการคัดเลือก 19 ครอบครัว กลุ่มที่มีอัตราการตายน้อยที่สุด 5 ครอบครัว

ตำแหน่ง	จีโนไทป์ / อัลลีล	กุ้งรอด		กุ้งตาย		รวม		χ^2	P-value	
		จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%			
5-HT1R 156A>G	จีโนไทป์	GG	827	71.29	262	22.59				
		AA	7	0.60	9	0.78	1,160	100.00	9.899	0.007*
		AG	38	3.28	17	1.47				
	อัลลีล	G	1,692	72.93	541	23.32	2,320	100.00	11.489	0.001*
		A	52	2.24	35	1.51				
5-HT1R 228C>G	จีโนไทป์	CC	842	71.66	242	20.60				
		GG	13	1.11	20	1.70	1,175	100.00	28.415	0.000*
		CG	39	3.32	19	1.62				
	อัลลีล	C	1,723	73.32	503	21.40	2,350	100.00	40.294	0.000*
		G	65	2.77	59	2.51				
LGBP 65T>C	จีโนไทป์	CC	686	58.14	194	16.44				
		TT	49	4.15	30	2.54	1,180	100.00	13.024	0.001*
		TC	157	13.31	64	5.42				
	อัลลีล	C	1,529	64.79	452	19.15	2,360	100.00	16.903	0.000*
		T	255	10.81	124	5.25				
LGBP 160T>G	จีโนไทป์	TT	850	71.85	246	20.79				
		GG	35	2.96	16	1.35	1,183	100.00	48.319	0.000*
		TG	10	0.85	26	2.20				
	อัลลีล	T	1,710	72.27	518	21.89	2,366	100.00	24.883	0.000*
		G	80	3.38	58	2.45				

หมายเหตุ: * หมายถึง จำนวนกุ้งรอดและตายมีความสัมพันธ์กับรูปแบบจีโนไทป์/อัลลีลที่ปรากฏอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



3.2 การทดสอบยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปกับกุ้งขาวรุ่น F₄

ผลการทดสอบยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิป 4 ตำแหน่ง กับตัวอย่างกุ้งขาวรุ่น F₄ จำนวน 1,004 ตัวอย่าง พบว่า ทั้งจีโนไทป์และอัลลีลของเครื่องหมายสนิปทั้ง 4 ตำแหน่ง มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคตายด่วน โดยกุ้งที่มีความต้านทานต่อโรคตายด่วนมีรูปแบบความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และอัลลีลในตำแหน่ง 5-HT1R156A>G, 5HT1R228C>G, LGBP65T>C และ LGBP160T>G เป็น GG/G, CC/C, CC/C และ TT/T ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 สรุปการวิเคราะห์ทางสถิติของความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และอัลลีลกับความต้านทานโรคตายด่วน ในขั้นตอนการทดสอบยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิป โดยทดสอบกับตัวอย่างกุ้งขาวรุ่น F₄ ที่ผ่านการทดสอบความต้านทานเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกลุ่มที่ได้รับการคัดเลือก 8 ครอบครัว กลุ่มที่มีอัตราการรอดน้อยที่สุด 5 ครอบครัว

ตำแหน่ง	จีโนไทป์ / อัลลีล	กุ้งรอด		กุ้งตาย		รวม		χ^2	P-value	
		จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%			
5-HT1R 156A>G	จีโนไทป์	GG	462	51.22	308	34.15			7.247	0.027*
		AA	1	0.11	0.00	0.00	902	100.00		
		AG	63	6.98	68	7.54				
	อัลลีล	G	987	54.71	684	37.92	1,804	100.00	5.267	0.022*
		A	65	3.60	68	3.77				
5-HT1R 228C>G	จีโนไทป์	CC	619	61.65	337	33.57			30.928	0.000*
		GG	0	0.00	0.00	0.00	1,004	100.00		
		CG	12	1.20	36	3.58				
	อัลลีล	C	1,250	62.25	710	35.36	2,008	100.00	30.170	0.000*
		G	12	0.60	36	1.79				
LGBP 65T>C	จีโนไทป์	CC	471	48.26	324	33.20			12.403	0.002*
		TT	48	4.92	24	2.46	976	100.00		
		TC	83	8.50	26	2.66				
	อัลลีล	C	1,025	52.51	674	34.53	1,952	100.00	10.119	0.001*
		T	179	9.17	74	3.79				
LGBP 160T>G	จีโนไทป์	TT	596	59.48	368	36.73			9.947	0.007*
		GG	2	0.20	0.00	0.00	1,002	100.00		
		TG	31	3.09	5	0.50				
	อัลลีล	T	1,223	61.02	741	36.98	2,004	100.00	10.678	0.001*
		G	35	1.75	5	0.25				

หมายเหตุ: * หมายถึง จำนวนกุ้งรอดและตายมีความสัมพันธ์กับรูปแบบจีโนไทป์/อัลลีลที่ปรากฏอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

สรุปและวิจารณ์ผล

การศึกษาครั้งนี้พบตำแหน่งสนิปที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคตายด่วนในยีน peroxinectin, LGBP และ 5-HT1R ซึ่งทั้ง 3 ยีนมีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว โดยยีน peroxinectin ทำหน้าที่เป็นสาร opsonin เคลือบผนังเซลล์ของเชื้อโรคที่อยู่ในกระแสเลือด และกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (Liu *et al.*, 2004) ยีน LGBP ทำหน้าที่จดจำและจับจำเพาะกับลิโปโพลีแซคคาไรด์ และ เบตา-1,3-กลูแคน ซึ่งลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ ส่วนเบตา-1,3-กลูแคน เป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ของเชื้อรา โดยยีน LGBP ของกุ้งขาวสามารถจับและตกตะกอนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เร่งปฏิกิริยา prophenoloxidase (proPO) และเพิ่มการห่อหุ้ม (encapsulation) ของฮีโมไซด์ (Phupet *et al.*, 2018) นำไปสู่การกำจัดเชื้อก่อโรคบุกกรุกต่อไป และยีน



5-hydroxytryptamin (5-HT) หรือ Serotonin มีตัวรับ (5-hydroxytryptamine receptor) 7 ชนิด คือ 5-HT_{1R} - 5-HT_{7R} เป็นสารสื่อประสาทที่มีหน้าที่หลากหลาย เช่น การสืบพันธุ์ การนอนหลับ ความอยากอาหาร การรับรู้ความเจ็บปวดและจังหวะการเต้นของหัวใจ โดยในกุ้งจะกระตุ้นการหลั่งของฮอร์โมนหลายชนิด เช่น crustacean hyperglycemic hormone, red pigment-dispersing hormone, neurodepressing hormone และ molt-inhibiting hormone (Escamilla-Chimal *et al.*, 2002) นอกจากนี้ ยังมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต โดย Marti *et al.* (2010) พบสนิป 4 ตำแหน่งในยีน 5-HT_{1R} ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการเจริญเติบโตของกุ้งขาว ซึ่งการพัฒนาตำแหน่งสนิปในยีนเป็นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกแบบที่จำเพาะกับวิถีของระบบที่ควบคุมลักษณะที่สนใจได้โดยตรง หรือเรียกว่า direct MAS (dMAS) หรือ functional marker assisted selection (fMAS) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้จะมีความแม่นยำในการคัดเลือกมากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดที่อยู่ใกล้กับยีนเป้าหมาย (indirect MAS; iMAS) การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้เป็นเครื่องมือประกอบช่วยยืนยันผลในการคัดเลือก จะช่วยเพิ่มความแม่นยำของการคัดเลือก และลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ได้ (Collard *et al.*, 2005)

จากการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค KASP ทั้งหมด 6 ตำแหน่ง สามารถนำมาใช้ได้จำนวน 4 ตำแหน่ง การศึกษาของ Steele *et al.* (2021) ที่พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปสำหรับการตรวจสอบพันธุ์ข้าวบาสมัติ (basmati rice) ด้วยเทคนิค KASP จำนวน 364 ตำแหน่ง แต่ก็ไม่สามารถนำมาใช้งานได้ทั้งหมด โดยสามารถใช้ได้จำนวน 327 ตำแหน่ง และความแม่นยำของการใช้เทคนิค KASP สำหรับการ genotyping จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ มีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 82.14-96.15% โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อความแม่นยำของเทคนิค KASP คือ ปริมาณ G+C (GC content) ของไพรเมอร์ ควรีค่าอยู่ในช่วง 30-70% หากต่ำกว่า หรือสูงกว่า ค่าที่กำหนด จะส่งผลต่อการจำแนกจีโนไทป์ (LGC KASP troubleshooting guide, <https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/KASP-troubleshooting-guide.pdf>) ซึ่งจากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ พบว่า ตำแหน่งสนิปที่มีความแม่นยำน้อยกว่า 80% ล้วนมีค่า GC content ของไพรเมอร์ไม่อยู่ในช่วงที่กำหนด (ไม่แสดงข้อมูล)

จากการทดสอบยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิป พบรูปแบบความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และอัลลีลในกุ้งขาวปรับปรุงพันธุ์ รุ่นที่ 3 และ 4 (F₃ และ F₄) มีความสัมพันธ์กับการต้านทานโรคตายด่วน โดยกุ้งที่มีความต้านทานต่อโรคตายด่วนควรมีรูปแบบความสัมพันธ์กับจีโนไทป์/อัลลีล ในตำแหน่ง 5-HT_{1R}156A>G, 5HT_{1R}228C>G, LGBP65T>C และ LGBP160T>G เป็น GG/G, CC/C, CC/C และ TT/T ตามลำดับ โดยตัวอย่างกุ้งขาวที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านโรคตายด่วนได้ผลที่มีนัยสำคัญในระดับหนึ่งแล้ว อย่างไรก็ตามการทดสอบดังกล่าว เป็นการดำเนินการในตัวอย่างกุ้งขาวจากแหล่งประชากรเดียวกันกับตัวอย่างกุ้งขาวที่ใช้ในการค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายตั้งแต่เริ่มต้น จึงสมควรทำการวิจัยต่อยอดเพื่อทดสอบเพิ่มเติมกับตัวอย่างจากแหล่งประชากรอื่น ซึ่งนอกจากจะเป็นการทดสอบเพื่อยืนยันความชัดเจนจากผลที่ได้ดำเนินการกับตัวอย่างที่มาจากต่างประชากรกันแล้ว ยังจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถที่จะใช้เครื่องหมายดังกล่าวกับประชากรอื่น ๆ ได้ทั่วไป ไม่ว่าจะเป็นการประยุกต์ใช้เพื่อช่วยในการตรวจสอบและยืนยันผลการคัดเลือกลักษณะการต้านทานโรคตายด่วนในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์กุ้งขาว หรือการประยุกต์ใช้เพื่อตรวจประเมินศักยภาพด้านการต้านทานโรคตายด่วนในประชากรกุ้งขาวทั่วไป ซึ่งจะทำให้ขอบเขตการใช้ประโยชน์จากเครื่องหมายที่ได้พัฒนาขึ้นมานั้นขยายกว้างขึ้น และสามารถประยุกต์ใช้ประโยชน์จากเครื่องหมายได้คุ้มค่ายิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานใน “โครงการสร้างประชากรพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวปลอดโรคและโตดีเพื่อการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน” โดยได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) และการให้คำปรึกษาแนะนำของคณะผู้ทรงคุณวุฒิและที่ปรึกษาโครงการ โดยเฉพาะ ดร.ศรียรัตน์ สอดสุข ที่ได้ร่วมติดตามและผลักดันโครงการจนสำเร็จลุล่วง ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่งมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณผู้อำนวยการ รวมถึงเจ้าหน้าที่ ผู้ช่วยนักวิจัย เจ้าหน้าที่ที่ช่วยปฏิบัติงานด้านต่าง ๆ ตลอดจนบุคลากรผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านของกองวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำเพชรบุรี ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำนครศรีธรรมราช และศูนย์วิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา ซึ่งเป็นหน่วยงานร่วมวิจัยในโครงการสร้างประชากรพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวฯ และขอขอบคุณคณะกรรมการวิชาการของกองวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำที่ช่วยตรวจสอบกลั่นกรองความถูกต้องสมบูรณ์ของเนื้อหาารายงานนี้



เอกสารอ้างอิง

- กนกวรรณ จารุกัจฉา และ วรัญญา จตุพรประเสริฐ. 2007. SNP: ความรู้พื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้. วารสาร ไทยเกษตรศาสตร์ และวิทยาการสุขภาพ, 2 (2): 166-174.
- จิราพร แก่นทรัพย์, ประเสริฐ วงศ์พัฒนารัตน์ และ ขนิษฐา วงศ์พัฒนารัตน์. 2563. เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานโรค. วารสารวิชาการเกษตร, 38 (2), 207-222.
- ประชาชาติธุรกิจ, 2566. กุ้งไทยปี 2565 ไปไม่ถึงฝัน 3 แสนตัน ลุ้นรัฐบาลใหม่ฟื้นฟู. แหล่งที่มา; <https://www.prachachat.net/economy/news-1150433>
- พัชรินทร์ ลังกาปอน. 2566. สถานการณ์สินค้ากุ้งทะเลและผลิตภัณฑ์ ในช่วง 3 เดือนแรก ปี 2565. แหล่งที่มา; <https://www.fisheries.go.th/strategy/fisheconomic/Monthly%20report/Shrimp/1กุ้งทะเล%203%20เดือน%2065.pdf>
- พนม กระจำพจน์ สอดสุข, ทัศนุพันธ์ โกเมนไรรินทร์, จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ, อนงค์ นิมละมัย, สุวัณษา วงษ์โท, วิศรุต ชัยเลิศฤทธิ์, นิรุต แก่นเชื้อชัย, สาธิต คำผิง, วิทยา พันธกิจ, อธิกร เหมทานนท์, ขวัญนา งามอาจ, วีระ เจริญพักตร์, สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์, จุฬารัตน์ รุ่งกำเนิดวงศ์, ปิยาธิ เหมทานนท์, วราลี ศรีสว่าง, ธิดา สุวรรณาราม, เมตตา ทิพย์บรรพต, อัมรา สีนประเสริฐพร, มุกดามาศ เข้มคำ, จารุวรรณ เรืองทอง, พรรัตน์ สุขประเสริฐ และ จะนัย ศาสนกิจ. 2565. โครงการสร้างประชากรพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวปลอดโรคและโตดีเพื่อการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน).
- อนงค์ นิมละมัย, ปิยะพงศ์ โชติพันธุ์, สถาพร ตีระบุษราคัม, สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี, พนม กระจำพจน์ สอดสุข และ ศรีรัตน์ สอดสุข. 2557. การตรวจหาสปีชีของยีนระบบภูมิคุ้มกันที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล. ใน: รายงานการประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2557. วันที่ 18-19 มิถุนายน 2557. ณ กรมประมง กรุงเทพฯ. หน้า 23-35.
- อนงค์ นิมละมัย, พนม กระจำพจน์ สอดสุข, ศรีรัตน์ สอดสุข และ จริญญา สุวรรณาคะ. 2560. การค้นหาเครื่องหมายสปีชีที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทนเค็มในปลานิล. ใน: รายงานการประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2560. วันที่ 19-20 กันยายน 2560. ณ กรมประมง กรุงเทพฯ. หน้า 108-119.
- อนงค์ นิมละมัย, สุวัณษา วงษ์โท และ พนม กระจำพจน์ สอดสุข. 2562. พัฒนาและทดสอบยีนเครื่องหมายดีเอ็นเอสปีชีที่สัมพันธ์กับลักษณะทนเค็มในปลานิล. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2562. กรมประมง.
- Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., and Pang, E. C. K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142: 169–196.
- Escamilla-Chimal, E. G., Hiriart, M., Sánchez-Soto, M. C., and Fanjul-Moles, M. L. 2002. Serotonin Modulation of CHH Secretion by Isolated Cells of the Crayfish Retina and Optic Lobe. *General and Comparative Endocrinology*, 125(2): 283-290.
- Fisher, R. A. 1992. Statistical methods for research workers. In *Breakthroughs in statistics* (pp. 66-70): Springer.
- Glenn, K. L., Grapes, L., Suwanasopee, T., Harris, D. L., Li, Y., Wilson, K., and Rothschild, M. F. 2005. SNP analysis of AMY2 and CTSL genes in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* shrimp. *Animal Genetics*, 36: 235–236.
- Liu, C. H., Cheng, W., Kuo, C. M., and Chen, J. C. 2004. Molecular cloning and characterisation of a cell adhesion molecule, peroxinectin from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish shellfish immunology*, 17(1): 13-26.



- Lyu, D., Yu, Y., Wang, Q., Luo, Z., Zhang, Q., Zhang, X., Xiang, J. and Li, F. 2021. Identification of Growth Associated Genes by Genome-Wide Association Study and Their Potential Application in the Breeding of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Frontiers in Genetics*, 12(465).
- Marti, S., Onteru, S., Du, Z. Q. and Rothschild, M. 2010. Short communication. SNP analyses of the 5HT1R and STAT genes in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8.
- Phupet, B., Pitakpornpreecha, T., Baowubon, N., Runsaeng, P. and Utarabhand, P. 2018. Lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein from *Litopenaeus vannamei*: Purification, cloning and contribution in shrimp defense immunity via phenoloxidase activation. *Dev Comp Immunol*, 81, 167-179.
- Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iñiesta, R. and Moreno, V. 2006. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* (Oxford, England), 22(15): 1928-1929.
- Steele, K., Tulloch, M. Q., Burns, M. and Nader, W. 2021. Developing KASP Markers for Identification of Basmati Rice Varieties. *Food Analytical Methods*, 14(4): 663-673.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K. and Lightner, D.V. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105: 45-55.