การหาเครื่องหมายพันธุกรรมจำแนกเพศในปลาบึก *Pangasianodon gigas* และปลาสวาย *Pangasianodon hypophthalmus*

Identification of sex specific marker in *Pangasianodon gigas* and *Pangasianodon hypophthalmus*

เกตุนภัส ศรีไพโรจน์[1], อุทัยรัตน์ ณ นคร[1], Joseph P. Brunelli[2], Gary Thorgaard[2]

[1] **ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ** 10900

[2] School of Biological Sciences and Center for Reproductive Biology, Washington State University, Pullman, WA, USA

บทคัดย่อ

เครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความจำเพาะกับเพศจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจัดการพ่อแม่พันธุ์ จากการใช้เทคนิค AFLP ในการหาเครื่องหมายพันธุกรรมจำแนกเพศปลาบึกและปลาสวาย พบว่า จากการตรวจสอบคู่ไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 570 คู่ไพรเมอร์ ใน DNA pool ปลาบึกเพศผู้ 4 pools เพศเมีย 4 pools (10 ตัว/pool) ไม่พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับเพศอยู่เลย สำหรับปลาสวายตรวจสอบคู่ไพรเมอร์จำนวน 102 คู่ไพรเมอร์ ใน DNA pool ปลาสวายเพศผู้ 4 pools เพศเมีย 4 pools (7-8 ตัว/pool) พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับเพศจำนวน 31 ชิ้นส่วน นำชิ้นส่วนเหล่านี้ไปเพิ่มจำนวน (cloning) หาลำดับเบสและออกแบบไพรเมอร์ ทดสอบไพรเมอร์จำนวน 33 คู่ ใน ดีเอ็นเอปลาสวายทั้งสองเพศด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าสามารถใช้ไพรเมอร์ทั้งหมดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปลาสวายได้ทั้งสองเพศ มีไพรเมอร์เพียง 1 คู่ (*B*-ACG *M*-CTT F1R2) เท่านั้นที่ให้ผลว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปลาสวายเพศผู้ได้ดีกว่าเพศเมีย โดยผลจากการทดสอบดีเอ็นเอปลาสวายทั้งสองเพศจำนวนเพศละ 28 ตัว จะปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ที่ชัดเจนในเพศผู้จำนวนมากกว่าในเพศเมีย (22 ตัวในเพศผู้ 8 ตัวในเพศเมีย) อย่างไรก็ตามยังไม่ปรากฏผลที่ชัดเจนว่าจะสามารถใช้ไพรเมอร์คู่นี้แยกเพศปลาสวายหรือปลาบึกได้ ขั้นตอนต่อไปคือการตรวจสอบหาว่าลำดับเบสภายในและลำดับเบสที่ขนาบข้างผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ (*B*-ACG *M*-CTT F1R2) ของปลาทั้งสองเพศ มีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยการใช้เทคนิค SSCP และเทคนิค Inverse PCR

Abstract

Sex specific DNA markers are useful for hatchery management. A capability to identify sex at earlier age reduces cost for broodstock rearing. This study employed the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) approach for the identification of sex-linked markers in *Pangasianodon gigas* and *P. hypophthalmus*. Eight DNA pools (4 females, 4 males) of *P. gigas* and *P. hypophthalmus* were screened using a total of 570 and 102 different primer combinations, respectively. None of the 570 primer combinations gave sex-associated amplification for *P. gigas*

while thirty-one of the 102 primer combinations gave sex-associated amplification across the pooled DNA samples of *P. hypophthalmus*. Segregation analysis showed that 21 (68%) out of 102 primer combinations gave 23 male specific AFLP fragments and 8 female specific AFLP fragments. These fragments were converted into single locus markers (SCARs; Sequence Characterized Amplified Regions). Thirty-three SCARs markers were tested using DNA of individual *P. hypophthalmus* males and females. All of SCARs markers could amplify both males and females DNA. Only one out of 33 markers (*B*-ACG *M*-CTT F1R2) showed stronger amplification for males than females. The sequence divergence inside and flanking region of AFLP-PCR products of both sexes will be examined by SSCP and inverse PCR technique, respectively.

คำนำ

ปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) เป็นปลาน้ำจืดประเภทไม่มีเกล็ดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก มีความสำคัญในแง่ของการอนุรักษ์ เนื่องจากจัดเป็นสัตว์ที่อยู่ในสภาวะที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์สูง (IUCN, 2005) จากการประสบความสำเร็จในการเพาะพันธุ์ปลาบึกจากพ่อแม่พันธุ์ในบ่อเลี้ยง (ยงยุทธ, 2544) ทำให้ปัจจุบันปลาบึกจัดเป็นปลาที่มีความสำคัญในแง่ของการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้าด้วย เนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตสูงมาก ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งสำหรับการเพาะเลี้ยงปลาบึกก็คือ การที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศปลาบึกได้อย่างชัดเจนจากลักษณะภายนอก เพศปลาบึกจะทราบได้แน่นอนก็ต่อเมื่อปลามีอายุถึงวัยเจริญพันธุ์แล้วเท่านั้น ซึ่งจะตรวจสอบโดยการสอดแท่งแก้วเล็กๆเข้าไปในช่องเพศ (catherization) และตรวจสอบเพศจากการปรากฏของไข่หรือน้ำเชื้อ ข้อจำกัดนี้นับเป็นอุปสรรคต่อการจัดการพ่อแม่พันธุ์ปลาบึก เนื่องจากปลาบึกเป็นปลาที่มีขนาดใหญ่ ต้องการพื้นที่ในการเลี้ยงมาก บางครั้งมีความจำเป็นต้องเก็บปลาไว้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในจำนวนจำกัด ซึ่งปลาที่เก็บไว้อาจจะเป็นปลาเพศเดียวกันหมดได้ สำหรับปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) จัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง เป็นปลาที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันกับปลาบึก การจำแนกเพศในปลาสวายด้วยการดูจากลักษณะภายนอกนั้นหากไม่ใช่ฤดูการผสมพันธุ์แล้ว ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศได้อย่างชัดเจนเช่นกัน เครื่องหมายพันธุกรรมที่สามารถจำแนกเพศปลาได้อย่างชัดเจนตั้งแต่ปลายังอยู่ในระยะเล็กๆ จะช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าว ซึ่งจะช่วยให้เกษตรกรวางแผนจัดการพ่อแม่พันธุ์ได้ง่ายขึ้น อนึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมจำแนกเพศที่พบในปลาชนิดใดชนิดหนึ่งอาจจะนำมาใช้กับปลาอีกชนิดหนึ่งได้ เนื่องจากปลาบึกและปลาสวายเป็นปลาที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (Na-Nakorn et al., 2006) ตัวอย่างของการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมจำเพาะกับเพศในปลาต่างชนิด มีรายงานว่า เครื่องหมาย *OtY2-WSU* ที่พบในปลา chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) สามารถนำมาใช้จำแนกเพศในปลา chum salmon (*O. keta*) และปลา coho salmon (*O. kisutch*) ได้ (Brunelli and Thorgaard, 2004)

AFLP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาหาเครื่องหมายจำแนกเพศ เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลาไม่มาก มีโอกาสพบเครื่องหมายจำแนกเพศสูง (Griffiths et al., 2000; Brunelli and Thorgaard, 2004; Felip et al., 2005; Cui et al., 2006) และไม่มีปัญหาเรื่องความสม่ำเสมอของการทำซ้ำ ดังเช่นเครื่องหมาย RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Cui et al., 2006) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่สามารถจำแนกเพศปลาบึกและปลาสวายได้อย่างชัดเจน เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการจัดการพ่อแม่พันธุ์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมดีเอ็นเอปลาบึกและปลาสวาย

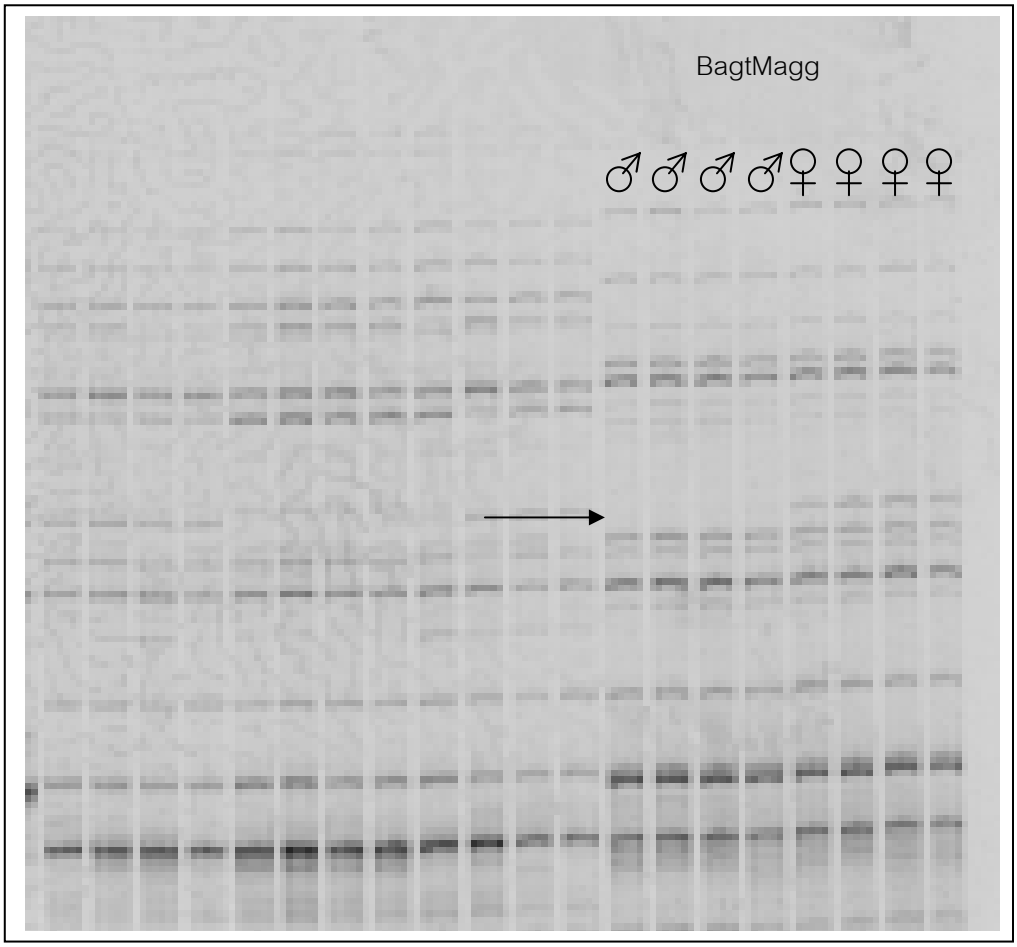
เก็บตัวอย่างครีบปลาบึกและปลาสวายที่ทราบเพศใน 90% Ethanol สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐาน phenol-chloroform (Taggard et al., 1992) จากนั้นตรวจสอบคุณและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยอะกาโรส เจล และเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) นำดีเอ็นเอของปลาบึก และปลาสวายเพศผู้และเพศเมียตัวละ 100 ng รวมไว้ในหลอดเดียวกัน เป็น DNA pool ของเพศผู้ และเพศเมีย เพศละจำนวน 4 pools ในปลาบึกใช้ปลาทั้งสองเพศจำนวน 10 ตัวต่อ 1 pool ส่วนปลาสวายใช้ปลาทั้งสองเพศจำนวน 7-8 ตัวต่อ 1 pool

การหาเครื่องหมายจำแนกเพศด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP)

นำ DNA pools ของปลาบึกและปลาสวายทั้งสองเพศ (ทั้งหมด 16 DNA pools) ปริมาณ 500 ng มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI/*Mse*I, *Bam*HI/*Mse*I *Bam*HI/*Msp*I และเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ถูกตัดแล้วกับ *Eco*RI, *Bam*HI, *Msp*I และ *Mse*I adapters คัดเลือกหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะกับเพศด้วยเทคนิค AFLP (Vos et al.,1995) โดยใช้ชุดไพรเมอร์ +1 ดังนี้ *BamH*I primer+A,C, *Eco*RI primer+A, *Mse*I primer+A,C, *Msp*I primer+A ในขั้นตอน selective amplification ไพรเมอร์ *BamH*I+3 และ *Eco*RI+3 ติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนส์ แยกขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากขั้นตอนนี้ด้วย 6% อะคริลาไมด์เจล และตรวจสอบด้วย Typhoon 9400 Scanner (Amersham Biosciences)

การคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างเพศ

คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง 2 เพศ (ภาพที่ 1) สกัดดีเอ็นเอแถบที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมียออกจากจากอะคริลาไมด์เจล ด้วยการตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ใน 50 µl TE buffer ทิ้งไว้ที่ 4 ºC 1 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่แยกได้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ selective primer คู่เดิมที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน และใช้วงจรปฏิกิริยาที่ 94 ºC นาน 30 วินาที 60 ºC นาน 50 วินาที และที่ 72 ºC นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วย 2% อะกาโรส เจล สกัดผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)



ภาพที่ 1 คู่ไพรเมอร์ *Bam*HI AGT+3 และ *Mse*I AGG+3 ซึ่งเกิดชิ้นส่วน AFLP ที่จำเพาะกับเพศผู้

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศและการหาลำดับเบส

โคลนชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อเพศที่ได้จากเทคนิค AFLP โดยการนำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วจากขั้นตอนที่ผ่านมา เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pGEM-T Easy (Promega) ใน ligation reaction 10 µl ประกอบด้วย pGEM-T Easy 25 ng, insert ประมาณ 100 ng, 2X Rapid ligation buffer 5 µl และเอนไซม์ T4 ligase 3 unit/µl นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน หลังจากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ JM109 (Promega) โดยการช็อคด้วยความร้อน (heat shock) จากนั้นนำมาเลี้ยงใน LB Broth ที่ 37ºC 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มียาแอมพิซิลิน X-gal และ IPTG คัดเลือกโคโลนีสีขาว จากนั้นสกัดพลาสมิดลูกผสมที่คัดเลือกไว้ด้วย Aurum™ Plasmid Mini Kit (BIO-RAD) และนำมาหาลำดับเบสด้วย ABI PRISM 377 DNA sequencer (PE biosystem)

การออกแบบและทดสอบไพรเมอร์

นำผลการวิเคราะห์ลำดับเบสมาออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 1998) สำหรับ annealing temperature นั้นสามารถคำนวณได้จากสูตร

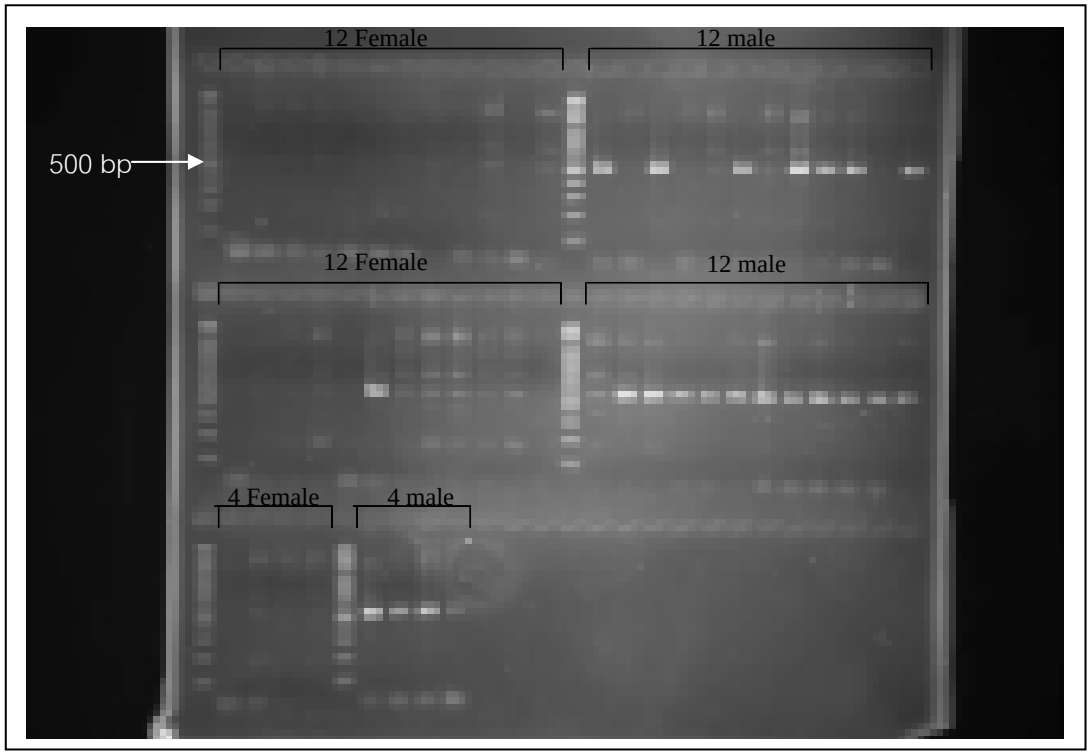
T_A (°C) = [4 (ผลรวมของเบส G และ C) + 2 (ผลรวมของเบส A และ T)] - 6

(Kamonrat, 1996)

นำไพรเมอร์ที่ได้ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอปลาบึก และปลาสวายที่ทราบเพศแต่ละตัวเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตรวจสอบผลด้วย 2% อะกาโรสเจล และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

ผลและวิจารณ์

การคัดเลือกหาเครื่องหมายพันธุกรรมจำแนกเพศด้วยเทคนิค AFLP ในปลาบึก พบว่าไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 507 คู่ไพรเมอร์ แสดงว่ามีชิ้นส่วน AFLP ที่จำเพาะกับเพศผู้ แต่หลังจากทดสอบคู่ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ด้วยเทคนิค AFLP อีกครั้งในปลาบึกแต่ละตัวจำนวน 40 ตัว (เพศผู้ 20 ตัว เพศเมีย 20) เพื่อให้แน่ใจว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะนั้นอยู่จริง ก่อนที่จะดำเนินการขั้นต่อไป ผลปรากฏว่าไม่พบชิ้นส่วนที่แสดงว่ามีความจำเพาะกับเพศอยู่เลย ส่วนในปลาสวายพบว่าไพรเมอร์จำนวน 31 คู่ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 102 คู่ไพรเมอร์ แสดงว่ามีชิ้นส่วน AFLP ที่จำเพาะกับเพศอยู่ หลังจากการทดสอบคู่ไพรเมอร์ทั้ง 31 คู่ ด้วยเทคนิค AFLP อีกครั้งในปลาสวายแต่ละตัวจำนวน 36 ตัว (เพศผู้ 18 ตัว เพศเมีย 18 ตัว) ปรากฏว่ามีเพียง 21 คู่ไพรเมอร์จาก 31 คู่ไพรเมอร์ที่ยังคงแสดงว่ามีชิ้นส่วนที่จำเพาะกับเพศอยู่โดยพบว่ามีชิ้นส่วน AFLP ที่แสดงความจำเพาะกับเพศผู้จำนวน 23 ชิ้นส่วน และชิ้นส่วนที่แสดงความจำเพาะกับเพศเมีย 8 ชิ้นส่วน เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะ (cloning) และหาลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับเพศจำนวน 26 ชิ้นส่วน ออกแบบไพรเมอร์ที่คาดว่ามีความจำเพาะกับเพศได้ทั้งหมดจำนวน 33 คู่ หลังจากนำไพรเมอร์ที่ได้ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปลาสวายเพศผู้ และเพศเมีย จำนวนเพศละ 5 ตัว พบว่ามีไพรเมอร์เพียง 1 คู่ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 526 bp ที่ชัดเจนในเพศผู้ทั้ง 5 ตัว แต่ไม่ปรากฏในเพศเมียเลย คือคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากชิ้นส่วน AFLP *Bam*HI+3 ACG และ *Mse*I+3 CTT จึงนำคู่ไพรเมอร์นี้ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพศผู้จำนวน 28 ตัว และเพศเมียจำนวน 28 ตัว ปรากฏว่าเพศผู้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ที่ชัดเจนจำนวน 22 ตัว เพศเมียจำนวน 8ตัว (ภาพที่ 2) แต่หลังจากทดลองนำไพรเมอร์คู่ดังกล่าวเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างปลาสวายจากแหล่งอื่น ซึ่งไม่ใช่เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP พบว่าการเกิดผลผลิตพีซีอาร์ไม่มีความแตกต่างกันในทั้งสองเพศ จึงคงยังไม่สามารถใช้ไพรเมอร์ *B*-ACG *M*-CTT F1R2 สำหรับจำแนกเพศปลาสวายได้ การทดลองนำไพรเมอร์ *B*-ACG *M*-CTT F1R2 ซึ่งแยกได้จากปลาสวายนี้ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาบึก พบว่ามีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นในปลาบึกทั้งสองเพศ



ภาพที่ 2 ผลจากการใช้ไพรเมอร์ *B*-ACG *M*-CTT F1R2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปลาสวายเพศผู้และเพศเมีย จำนวน 56 ตัว (เพศเมีย 28 ตัว เพศผู้ 28 ตัว)

จำนวนชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค AFLP สำหรับการศึกษาในปลาบึกครั้งนี้ (570 ชุดไพรเมอร์) มีจำนวนมากหากเปรียบเทียบกับการศึกษาหาเครื่องหมายจำแนกเพศด้วยเทคนิคเดียวกันนี้ในปลาชนิดอื่น เช่น ปลา three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) ซึ่งใช้เพียง 5 ชุดของไพรเมอร์ (Griffiths et al., 2000) ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ใช้ 486 ชุดไพรเมอร์ (Felip et al., 2005) ซึ่งการศึกษาเหล่านี้สามารถหาเครื่องหมายจำแนกเพศได้ ทั้งนี้การไม่พบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างเพศในปลาบึกนี้อาจเป็นไปได้ว่าในปลาบึกนั้นโครโมโซมเพศไม่มีความแตกต่างกัน อีกทั้งโดยทั่วไปปลามีกลไกการกำหนดเพศที่หลากหลายมาก ซึ่งนอกจากการกำหนดเพศโดยพันธุกรรมแล้ว ในปลาหลายๆชนิดปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมก็มีผลมากเช่นกัน (Devlin and Nagahama, 2002) และแม้ว่าพันธุกรรมจะเป็นปัจจัยที่ควบคุมการกำหนดเพศ แต่ก็มีปลาเพียงไม่กี่ชนิดที่มีโครโมโซมเพศที่แตกต่างกัน โดยโครโมโซมเพศในปลาส่วนใหญ่จะไม่มีความแตกต่างกันทั้งในด้านรูปร่าง และองค์ประกอบของยีน (gene content) (Arkhipchuk, 1995)

สำหรับปลาสวายถึงแม้จะพบชิ้นส่วน AFLP ที่มีความจำเพาะกับเพศอยู่ แต่เมื่อนำชิ้นส่วนเหล่านั้นมาหาลำดับเบส และออกแบบไพรเมอร์ ก็พบว่ายังไม่มีไพรเมอร์คู่ใดที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการแยกเพศปลาสวายได้ อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ *B*-ACG *M*-CTT F1R2 ซึ่งอาจจะมีความจำเพาะกับปลาสวายเพศผู้

นั้น ควรจะมีการศึกษาในลำดับต่อไปว่าลำดับเบสภายใน และลำดับเบสที่อยู่ถัดออกไปจาก AFLP-PCR ของปลาทั้งสองเพศมีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยใช้เทคนิค SSCP และ Inverse PCR ในการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ยงยุทธ อุนากรสวัสดิ์. 2544. การเพาะพันธุ์ปลาบึกจากพ่อแม่พันธุ์ในบ่อเลี้ยง, หน้า 13. *ใน* สมปอง วิชญวิเชียร ปลาบึก บันทึกเส้นทางอนุรักษ์ปลาบึกสู่ทรัพยากรธรรมชาติที่ยั่งยืน. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Arkhipchuk, V.V. 1995. Role of chromosomal and genome mutations in the evolution of bony fish. Hydrobiol J 31: 55-65.

Brunelli, J and G.H. Thorgaard. 2004. A new Y-chromosome-specific marker for Pacific salmon. Trans. Amer. Fish. Soc. 33: 1247-1253.

Cui, J., X. Shen, Q. Gong, G. Yang and Q. Gu. 2006. Identification of sex markers by cDNA-AFLP in *Takifugu rubripes*. Aquaculture 257: 30-36.

Devlin, R.H. and Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. Aquaculture 208:191-365.

Felip, A., W.P. Young, P.A. Wheeler and G.H. Thorgaard. 2005. An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 247: 35-43.

Griffiths, R., K.J. Orr., A. Adam and I. Barber. 2000. DNA sex identification in the three-spined stickleback. J. Fish. Biol. 57:1331-1334.

IUCN, 2005. 2005 IUCN Red List of Threatened Species. Available at: www.iucnredlist.org.

Kamonrat, W. 1996. Spatial Genetic Structure of Thai Silver Barb *Puntius gonionotus* (Bleeker) Population in Thailand. Ph.D. Thesis, Dalhousie University.

Rozen, S. and H.J. Skaletsky.1998. Primer 3 code Available Source: http://www.genome.wi.mit.edu/genome-software/other/primer 3.html, July 18, 2006

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.