



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวาย *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) จากโรงเพาะฟักในประเทศไทย

Genetic Diversity of Hatchery Stocks of Striped Catfish *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) in Thailand

นางผู้วิจัย นางสาวทักษิณา เหมยคำ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ณฤพล สุขุมาสวิน, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวาย *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878)
จากโรงฟักในประเทศไทย

Genetic Diversity of Hatchery Stocks of Striped Catfish *Pangasianodon hypophthalmus*
(Sauvage 1878) in Thailand

โดย

นางสาวทักษิณา เหมยคำ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
พ.ศ. 2552

ทักษิณา เหมยคำ 2552: ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวาย *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) จากโรงเพาะฟักในประเทศไทย ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ฦ นคร, Ph.D. 70 หน้า

ปลาสวาย *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) ที่เลี้ยงในประเทศไทยผ่านการเลี้ยงในโรงเพาะฟักมาหลายชั่วอายุโดยไม่มีการนำความรู้ทางพันธุศาสตร์ไปใช้ในการจัดการพ่อแม่พันธุ์ ทำให้เกิดความกังวลว่าประชากรเหล่านี้จะสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม การศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาสวายจากโรงเพาะฟัก 6 ประชากร และประชากรจากธรรมชาติ 3 ประชากร โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ดีเอ็นเอ จำนวน 5 ตำแหน่ง พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรโรงเพาะฟักมีค่าดังนี้ จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (A) = 3.6 - 11.0, จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งที่ไม่ขึ้นกับจำนวนตัวอย่าง (allelic richness, A_r) = 3.18 - 8.06, ค่าสังเกตเฮเตอโรไซโกซิตี (H_o) = 0.63 - 0.76, ค่าคาดหวังเฮเตอโรไซโกซิตี (H_e) = 0.59 - 0.83 ส่วนประชากรธรรมชาติมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร ดังนี้ A = 5.0 - 7.4, A_r = 4.89 - 5.98, H_o = 0.68 - 0.79, H_e = 0.72 - 0.76 ประชากรปลาสวายจากโรงเพาะฟักทุกประชากรเบี่ยงเบนไปจากสมดุลฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก ส่วนประชากรธรรมชาติมีเพียงประชากรจากจังหวัดอยุธยาเพียงประชากรเดียวที่เบี่ยงเบนไปจากสมดุลฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก ส่วนการเปรียบเทียบความแตกต่างของประชากร และค่า F_{ST} แสดงความแตกต่างของทุกประชากรอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อจัดความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาสวายด้วยแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมวิธี Neighbor-joining ระหว่างประชากรสามารถแบ่งแยกประชากรออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มจากโรงเพาะฟักในจังหวัดนครสวรรค์กับสุพรรณบุรี และกลุ่มจากธรรมชาติ กับโรงเพาะฟักในจังหวัดฉะเชิงเทรา ผลการศึกษาแสดงว่าประชากรปลาสวายในโรงเพาะฟักยังมีความหลากหลายในระดับปานกลาง และมีความแตกต่างระหว่างประชากรมากพอที่จะใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืน

Thakkina Moeikum 2009: Genetic Diversity of Hatchery Stocks of Striped Catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) in Thailand. Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Professor Uthairat Na - Nakorn, Ph.D. 70 pages.

The stocks of striped catfish cultured in Thailand have been domesticated for many generations without application of genetic theory. Therefore, there is a concern that the stocks could have lost the genetic diversity. The study was conducted to evaluate the genetic diversity of five hatchery stocks comparing to the natural stocks using five microsatellite loci. The results showed that genetic variation of the hatchery stocks was as follow, average number of alleles per locus (A) = 3.6 - 11.0, average number of alleles per locus independent of sample size (allelic richness, A_r) = 3.18 - 8.06, observed heterozygosity (H_o) = 0.63 - 0.76, expected heterozygosity (H_e) = 0.59 - 0.83 and those of the natural stocks was A = 5.0 - 7.4, A_r = 4.89 - 5.98, H_o = 0.68 - 0.79 and H_e = 0.72 - 0.76. All hatchery stocks and natural stocks (The Chaophraya River, Ayuthaya) deviated from Hardy - Weinberg Equilibrium. Pair - wise comparisons and the F_{ST} values revealed significant genetic differentiation across all populations. The Neighbor - joining dendrogram separated the populations into two groups. One group consisted of hatchery stocks from Nakornsawan and Suphanburi Provinces, the other consisted of the hatchery stocks in Chachoengsao Province and all natural stocks. The results also indicated that the hatchery stocks possessed sufficient genetic diversity, hence can facilitate sustainability of the stocks.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยประกอบวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ผ่านทางโครงการ “การประยุกต์ใช้พันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน-2” (โครงการเมธีวิจัยอาวุโส 2550) ที่มอบให้ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อุทัยรัตน์ ณ นคร ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้การสนับสนุน คำปรึกษา และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมทั้งขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล และอาจารย์ณฤพล สุขุมาสวิน กรรมการที่ปรึกษา ที่ให้คำแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.พนม กระจ่างพนัน สอดสุข และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี พุ่มพวง ที่ให้ความกรุณาแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ยังได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลอีกหลายท่าน คือ คุณจิตราภรณ์ ฟองอิสสระ คุณศรียรรยา สุขมนอนต์ และคุณวรางคณา พระคุณ ตลอดจนพี่ ๆ น้อง ๆ ที่ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ ซึ่งให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างปลาสาวย และเป็นกำลังใจในการทำงานตลอดมา รวมทั้งฟาร์มปลาสาวยทุกฟาร์มที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างปลาสาวย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณป้า และ ขอบคุณน้องชาย ที่เป็นกำลังใจให้เสมอจนกระทั่งวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี ประโยชน์อันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ และคุณป้า ผู้ซึ่งสนับสนุนการศึกษาอย่างดีที่สุดเสมอมา รวมทั้งท่านทั้งหลายที่ได้เอื้อนามข้างต้นด้วยเช่นกัน

ทักษิณา เหมยคำ

พฤษภาคม 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	12
ผลและวิจารณ์	25
ผล	25
วิจารณ์	45
สรุปและข้อเสนอแนะ	50
สรุป	50
ข้อเสนอแนะ	51
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	52
ภาคผนวก	61
ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมสารเคมี	62
ภาคผนวก ข ภาพแถบ microsatellite DNA จากการศึกษา	68
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	70

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชื่อย่อประชากร จำนวนตัวอย่าง สถานที่เก็บตัวอย่างปลาซวายที่ใช้ในการศึกษา	15
2	รายละเอียดของไมโครแซทเทลไลต์ไพรมอร์ หมายเลข GenBank Accession ลำดับเบสของไพรมอร์ อุณหภูมิ Annealing (°C) ทั้ง 5 ตำแหน่ง	17
3	จีโนไทป์ของพ่อ แม่ และสัดส่วนจีโนไทป์ของลูกปลาซวาย จำนวน 3 ครอบครัว และค่า χ^2 ในการทดสอบสัดส่วนลูกจีโนไทป์ต่างๆกับสัดส่วนตามทฤษฎี	30
4	ความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลต์ 5 ตำแหน่งในประชากรปลาซวาย	32
5	จำนวนตัวอย่างเฉลี่ยต่อประชากร จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง ค่าเฉลี่ย จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง ($\pm$ SE) effective number of alleles per locus (A_e) ($\pm$ SE) ค่าเฉลี่ย allelic richness (A_r) ($\pm$ SE) ค่าเฉลี่ยค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี และค่าคาดหวัง ($\pm$ SE) และค่า F_{IS} ในปลาซวาย 9 ประชากร	36
6	ผลการทดสอบสมมติฮาร์ดี - ไวน์เบิร์กของประชากรปลาซวาย 9 ประชากร	37
7	การทดสอบ Genotypic disequilibrium ในประชากรปลาซวาย 9 ประชากร	38
8	ความแตกต่างระหว่างประชากรจากการทดสอบ Population differentiation ของประชากรปลาซวาย 9 ประชากร	39
9	ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ของประชากรปลาซวาย 9 ประชากร	40
10	ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F -coefficient) ของไมโครแซทเทลไลต์ 5 ตำแหน่ง	41
11	ค่าความแปรปรวนโดยการวิเคราะห์ AMOVA ระหว่างกลุ่มประชากรโรงเพาะฟักและแหล่งน้ำธรรมชาติ	42
12	ผลการทดสอบแหล่งที่มาของประชากร (assignment test) ของประชากรปลาซวายจากโรงเพาะฟัก โดยใช้ประชากรปลาซวายจากธรรมชาติเป็นประชากรพื้นฐาน	43

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แหล่งเก็บตัวอย่างปลาสร้อยทั้ง 9 ประชากร	16
2	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาสร้อย 9 ประชากร	44
ภาพผนวกที่		
ข1	แสดงแถบ microsatellite DNA ที่ได้จากไพรเมอร์ <i>Pg-1</i> , <i>Pg-2</i> , <i>Pg-3</i> , <i>Pg-13</i> และ <i>Pg-14</i>	69

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	=	base pairs
°C	=	degree Celcius
dH ₂ O	=	deionized water
dNTPs	=	deoxynucleotide triphosphate
df	=	degree of freedom
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
HCl	=	hydrochloric acid
M	=	molar
μg	=	microgram (s) (10 ⁻⁶)
μl	=	microliter (s)
μM	=	micromolar
mg	=	milligram (s)
ml	=	milliliter (s)
mM	=	millimolar
MgCl ₂	=	magnesium chloride
ng	=	nanogram (s) (10 ⁻⁹)
NaCl	=	sodium chloride
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
pmol	=	picomole (s) (10 ⁻¹²)
pH	=	logarithm of reciprocal of hydrogen (H) ion
rpm	=	revolutions per minute
Taq	=	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	=	Tris-borate EDTA buffer
TE	=	Tris - EDTA buffer
TNES	=	Tris-NaCl-EDTA-Sodium dodesylsulfate
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) methylamine

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวาย *Pangasianodon hypophthalmus*
(Sauvage 1878) จากโรงเพาะฟักในประเทศไทย

Genetic Diversity of Hatchery Stocks of Striped Catfish *Pangasianodon*
***hypophthalmus* (Sauvage 1878) in Thailand**

คำนำ

ปลาสวาย *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) เป็นปลาน้ำจืดที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ ในประเทศไทยพบปลาสวายในแม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำโขง (ชวลิต, 2544) ปลาสวายเป็นสัตว์น้ำชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย จากรายงานสถิติประมงของประเทศไทย การเพาะเลี้ยง ปริมาณผลผลิต และมูลค่าของผลผลิตปลาสวาย มีแนวโน้มเพิ่มอย่างต่อเนื่องทุกปี ซึ่งในปี 2549 มูลค่าของผลผลิตปลาสวายมีถึง 784.1 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2551) นอกจากนี้ในประเทศไทยคนนิยมปลานี้มีการเลี้ยงแพร่หลาย และมีแนวโน้มการส่งออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะในปี 2551 มีการส่งออกถึง 640,000 ตัน (Anonymous, 2009) ประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงปลาสวายมาเป็นระยะเวลาที่ยาวนานกว่า 30 ปี การเลี้ยงปลาสวายในอดีตนั้นใช้ลูกปลาสวายที่รวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติ แต่ภายหลังจากที่มีการพัฒนาการเพาะพันธุ์ปลาสวายขึ้นในปี พ.ศ. 2509 (อารีย์ และสุจิต, 2509) คาดว่าเกษตรกรจะใช้ลูกปลาจากโรงเพาะฟักมาโดยตลอด จึงนับได้ว่าการการเพาะพันธุ์ในโรงเพาะฟักอย่างต่อเนื่องมานับน้อยกว่า 20 ปีแล้ว

โดยทั่วไปประชากรปลาที่นำมาเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในโรงเพาะฟักหลายชั่วอายุ จะมีข้อดีคือสามารถปรับตัวได้ดีในสภาพกักขัง และอาจมีลักษณะดีอื่นๆอีก หากมีการจัดการพันธุกรรมอย่างถูกต้อง (Doyle, 1983) แต่โดยทั่วไปแล้วเกษตรกรมักไม่ได้นำความรู้ทางพันธุศาสตร์มาช่วยในการจัดการ ทำให้ประชากรโรงเพาะฟักมักสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากผลของการขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) ซึ่งเกิดจากการใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อย ผลที่ตามมาอีกประการคือ การผสมเลือดชิด (สุภาวดี, 2551) ซึ่งมีผลต่อเนื่องในทางลดความสามารถในการปรับตัวของประชากรแม้ในภาพรวมจะมีข้อสังเกตว่าปลาสวายสายพันธุ์ไทยนี้เจริญเติบโตช้าลง และเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เร็วขึ้น แต่ก็มีข้อดีอื่นๆ เช่น เจริญพันธุ์ได้ดีในที่กักขัง ปรับตัวเข้ากับสภาพการเลี้ยงได้ดี และอาจมีข้อดีอื่นๆอีก

นอกจากนั้นโรงเพาะฟักบางโรงเพาะฟักได้นำปลาจากแหล่งอื่นๆ เช่นแม่น้ำโขง เข้ามาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในรูปแบบต่างๆ เช่นนำมาผสมกับประชากรเดิมโดยมีวัตถุประสงค์ในการลดการผสมเลือดชิด ในขณะที่บางโรงเพาะฟักนำมาใช้เพื่อการผสมข้าม วิธีปฏิบัติดังกล่าวนี้ในบางครั้งก็ไม่ได้ให้ผลดีตามที่หวัง เนื่องจากมีความผิดพลาด เช่น นำปลาสายพันธุ์ใหม่เข้ามาเพียงจำนวนน้อย ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่ได้สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม เช่น ที่มีรายงานในกุ่มก้ามกรามที่พบว่า ฟาร์มที่นำกุ่มจากแหล่งธรรมชาติที่เชื่อได้ว่ามีความหลากหลายสูงมาเป็นพ่อแม่พันธุ์กลับมีความหลากหลายต่ำกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองดั้งเดิม (Charoentawee *et al.*, 2006) ดังนั้นจึงควรศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาสวายในโรงเพาะฟักขนาดใหญ่ในประเทศไทย เพื่อทราบผลของการจัดการพันธุกรรมดังกล่าว ในขณะเดียวกันก็จะได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม ที่จะประโยชน์ในการเลือกประชากรมาใช้เป็นประชากรเริ่มต้นในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบสถานะภาพทางพันธุกรรมของประชากรปลาสวายใน
โรงเพาะฟักขนาดใหญ่ในประเทศไทย โดยเปรียบเทียบกับประชากรธรรมชาติ ทั้งนี้โดยมีวัตถุประสงค์เฉพาะ 2 ประการ คือ

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรของปลาสวายจากโรงเพาะฟัก โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ
2. เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรปลาสวายจากโรงเพาะฟัก และ ประชากรปลาสวายจากธรรมชาติ

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปและความเป็นมาของการเลี้ยงปลาสวาย

ปลาสวาย *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) มีชื่อสามัญว่า striped catfish จัดอยู่ในครอบครัว Pangasiidae เป็นปลาน้ำจืดไม่มีเกล็ดขนาดค่อนข้างใหญ่ พบเห็นอยู่ทั่วไปทั้งในประเทศไทย เขมร และเวียดนาม ในประเทศไทยนั้นพบการแพร่กระจายในแม่น้ำโขง แม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำสาขา (ชวลิต, 2544) ปลาสวายเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งเมื่อพิจารณาจากผลผลิต และมูลค่าของปลาในกลุ่ม catfish (ปลาสวาย - เทโพ) พบว่าในช่วงปี พ.ศ. 2544 - 2548 มูลค่าของปลาในกลุ่มนี้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2551) การเลี้ยงปลาสวายในอดีตนั้นใช้ลูกปลาสวายที่รวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติ เมื่อมีการขยายกิจการทางด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณลูกปลาสวายไม่เพียงพอับความต้องการของประชาชน จึงได้มีการพัฒนาวิธีการเพาะพันธุ์ปลาสวายด้วยวิธีการฉีดฮอร์โมนผสมเทียม โดยสามารถเพาะขยายพันธุ์ได้สำเร็จในปี พ.ศ. 2509 (อารีย์ และสุจิต, 2509) และคาดว่าเกษตรกรจะใช้ลูกปลาจากโรงเพาะฟักมาโดยตลอด จึงนับได้ว่ามีการการเพาะพันธุ์ในโรงเพาะฟักอย่างต่อเนื่องมาเป็นระยะเวลายาวนาน

ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ (microsatellite DNA)

ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ คือส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำช่วงสั้นๆ (simple sequence repeats, SSRs) ขนาดประมาณ 1 - 6 นิวคลีโอไทด์ มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 2 ซ้ำ ขึ้นไปไม่เกิน 100 ซ้ำ และแต่ละชุดซ้ำเรียงต่อกันอยู่ในทิศทางเดียวกันตลอด (tandem repeat) พบกระจายทั่วไปในจีโนม และมีตำแหน่งอยู่ในส่วนของ noncoding region ซึ่งความหลากหลายเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของจำนวนซ้ำ และมีรายงานพบว่าสูงถึง 10^{-2} ต่อรุ่น (Weber and Wong, 2003) สาเหตุเกิดจากกระบวนการเข้าสู่ผิดของลำดับเบส ในขณะที่มีการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (slipped strand mispairing) โดยพบว่า dinucleotide repeat จะเกิดการกลายเร็วกว่า trinucleotide repeat และลำดับเบสที่มี AT สูง จะเกิดการกลายเร็วกว่าการมีลำดับเบส GC (Schlotterer and Tautz, 1992)

ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ แบ่งตามจำนวนซ้ำ (repeat) ได้เป็น 3 แบบคือ perfect repeat เป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่มีชุดซ้ำแบบเดียวกันติดต่อกัน เช่น $(CT)_{20}$, $(GAT)_{20}$ หากมีเบสอื่นแทรกอยู่ระหว่างชุดซ้ำเรียกว่า imperfect repeat เช่น $(CT)_{20}AG(CT)_{25}$ และไมโครแซทเทลไลต์ที่ประกอบด้วยชุดซ้ำที่มากกว่า 1 ชุดเรียงต่อกันเรียกว่า compound repeat เช่น $(CT)_{20}(GA)_{20}$, $(CAG)_{20}(AG)_{20}$ (Goldstein, 2001) เนื่องจากไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำ จึงมีชื่อเรียกว่า Simple Sequence Repeat (SSR), Short Tandem Repeat (STR), Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) และ Sequence Tagged Microsatellite Site (STMS)

ปัจจุบันมีการใช้ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ ในการศึกษาแผนที่จีโนม แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่ลูก (parentage assignment) เป็นต้น ข้อดีของการใช้ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ คือเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายสูง การแสดงออกเป็นแบบข่มร่วม (co-dominant) สามารถศึกษาได้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งต้องการปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย ผลที่ได้สามารถนำไปวิเคราะห์ได้ และสามารถทำซ้ำโดยผลที่ได้ไม่เปลี่ยนแปลง พบกระจายทั่วไปในจีโนม ทั้งในระหว่างยีนและภายในยีน

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม หมายถึง ความผันแปรของยีน หรือหน่วยของพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง ทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรเกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน (recombination) และการรวมตัวกันใหม่ (rearrangement) ของยีน และโครโมโซม ในระหว่างการแบ่งตัวแบบไมโอซิส รวมทั้งการกลาย (mutation) ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเกิดขึ้นเมื่อสมาชิกในประชากรมีการแยกตัวออกจากประชากรเดิมเริ่มแยกกลุ่มผสมพันธุ์ลดการถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างประชากร ทำให้ความถี่ของอัลลีลเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งถ้ามีการถ่ายเทของยีนมาก ประชากรก็มีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ถ้ามีการถ่ายเทของยีนน้อยหรือไม่มีเลยประชากรก็จะแตกต่างกันมากจนในระยะเวลาหนึ่งประชากรที่แยกจากกันจะมีวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างประชากร

พันธุศาสตร์ประชากร เป็นการศึกษาที่ว่าด้วยการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนที่เกิดขึ้นกับประชากรอื่นเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น รวมไปถึงการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร ซึ่งหมายถึงแบบแผนความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากน้อยเพียงใด การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนอกจากจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนแล้วยังมีความสำคัญต่อการเกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกัน ซึ่งประชากร หมายถึง กลุ่มของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอยู่ร่วมกัน และมีการผสมพันธุ์กันภายในประชากร ดังนั้นประชากรจึงเป็นแหล่งรวมของยีน หรือ จีโนไทป์ชนิดต่างๆ ของประชากร การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร โดยตั้งอยู่บนพื้นฐานของทฤษฎีสมดุลของฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก (Hardy - Weinberg equilibrium) ที่ว่า “ประชากรที่มีขนาดใหญ่ มีการผสมพันธุ์แบบสุ่ม ไม่มีการกลายพันธุ์ ไม่มีการคัดเลือก และไม่มี การอพยพย้ายถิ่นในประชากรนั้น ความถี่ของยีนและความถี่ของจีโนไทป์จะคงที่ในทุกชั่วอายุ” ซึ่งค่าที่บอกถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรประกอบด้วยจากค่าต่าง ๆ ดังนี้ (Hedrick, 2000; Petit *et al.*, 1998)

1. จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (average number of allele per locus, A) และค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่ง คำนวณโดยนับจำนวนอัลลีลทุกตำแหน่ง แล้วนำมาหารด้วยจำนวนตำแหน่งทั้งหมดที่ศึกษา

2. ค่า effective number of allele (A_e) เป็นค่าที่แสดงถึงจำนวนอัลลีลของพ่อแม่ที่สามารถผสมพันธุ์กันและถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้

3. ค่า allelic richness (A_r) เป็นค่าที่บอกถึงจำนวนอัลลีล โดยไม่ขึ้นกับจำนวนตัวอย่าง ดังนั้นจึงใช้ค่านี้เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลกับตัวอย่างประชากรที่ไม่เท่ากันได้

4. เฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) หมายถึงความถี่ของเฮเทอโรไซโกตต่อยีน 1 ตำแหน่ง จะคำนวณทั้งค่าสังเกต (H_o) และค่าคาดหวัง (H_e)

H_o (observed heterozygosity) คือ สัดส่วนของเฮเทอโรไซกัสจีโนไทป์เฉลี่ยต่อตำแหน่ง คำนวณได้จากข้อมูลจริง

H_e (expected heterozygosity) คือ สัดส่วนของเฮเทอโรไซกัสโนไทป์เฉลี่ยต่อตำแหน่งที่ได้จากการคำนวณทางอ้อม โดยตั้งสมมติฐานว่าประชากรนั้นอยู่ในสภาพสมดุลฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก

ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร สามารถบอกได้ด้วยข้อมูลต่อไปนี้

1. ค่าสัมประสิทธิ์ F (F -coefficients) เป็นค่าที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของอัลลีลภายในประชากร ซึ่งสามารถบอกได้ว่าประชากรนั้นมีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อยหรือไม่ (Nei, 1977) ค่าสัมประสิทธิ์ F มีทั้งหมด 3 ค่า ใช้ในการแบ่งความผันแปรทางพันธุกรรมออกเป็นระดับประชากรทั้งหมด (T), ประชากรย่อย (S) และในแต่ละตัวอย่าง (I) โดยมีทั้งหมด 3 ค่า ดังนี้

F_{ST} หมายถึง ค่าที่วัดระดับความแตกต่างของความถี่อัลลีลในประชากรต่าง ๆ เพื่อศึกษาว่าประชากรมีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อยหรือไม่

F_{IS} และ F_{IT} หมายถึง ค่าที่บอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลของฮาร์ดี - ไวน์เบิร์กของประชากรย่อย และประชากรทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งจะมีทั้งค่าบวกและค่าลบ โดยค่าบวกหมายความว่า ค่าเฮเทอโรไซโกตน้อยกว่าที่ควรจะเป็น เกิดขึ้นเนื่องจากการผสมเลือดชิด หรือมีการรวมกันของประชากรที่มีความถี่อัลลีลต่างกัน (Wahlunds' effect) เป็นต้น และมีค่าเฮเทอโรไซโกตมากกว่าที่ควรจะเป็นเมื่อ F_{IS} มีค่าเป็นลบ

2. ค่าความแตกต่างระหว่างประชากร (Population differentiation) เป็นการศึกษาความแตกต่างของประชากรโดยใช้การกระจายตัวของอัลลีลในแต่ละประชากรเป็นตัวทดสอบ

3. ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) เป็นค่าที่บอกจำนวนยีนหรือโคดอน (codon) ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปภายในยีนแต่ละตำแหน่ง หลังจากที่ประชากรทั้งสองเริ่มแยกจากกัน ซึ่งค่าระยะห่างทางพันธุกรรมจะบอกถึงความถี่ และปริมาณของการถ่ายเทยีนระหว่างประชากร โดยปกติแล้วค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของประชากรที่อยู่ใกล้ชิดกันมีค่าต่ำ แต่ถ้ามีสิ่งกีดขวางตามสภาพภูมิศาสตร์ จะมีค่าสูงขึ้น (Nei, 1978)

4. Pairwise F_{ST} เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่ยัลลีลในทุกคู่ประชากร สามารถใช้เป็นค่าระยะห่างทางพันธุกรรม เพื่อใช้สนับสนุนการทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากร

การเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางพันธุกรรมเนื่องจากกระบวนการ domestication

เมื่อปลาจากธรรมชาติถูกนำมาเลี้ยงหลายชั่วอายุ พันธุกรรมของปลาเหล่านั้นจะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม สาเหตุอาจเนื่องมาจากการใช้พ่อแม่พันธุ์เริ่มต้นจำนวนน้อย พ่อแม่พันธุ์เหล่านั้นอาจไม่เป็นตัวแทนของประชากรดั้งเดิม ซึ่งทำให้ความถี่ของยีนของประชากรเริ่มต้นแตกต่างจากประชากรเดิม การใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อย ยังเป็นสาเหตุให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง ไม่ว่าจะเป็นการลดระดับเฮเทอโรไซโกซิตี และการลดอัลลีลไดเวอร์ซิตี รวมทั้งอาจส่งผลให้มีโอกาสที่จะเกิดการผสมพันธุ์ระหว่างเครือญาติมากขึ้น (อุทัยรัตน์, 2543) นอกจากนี้การจัดการในโรงเพาะฟักก็มีส่วนสำคัญที่ทำให้พันธุกรรมของประชากรในโรงเพาะฟักเปลี่ยนไปจากเดิม เช่น ความถนัดในการใช้แม่ปลาขนาดเล็กในการเพาะพันธุ์ การใช้พ่อแม่พันธุ์จากช่วงใดช่วงหนึ่งของฤดูผสมพันธุ์

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของประชากรปลาในโรงเพาะฟัก ทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาที่ผ่านกระบวนการ domestication ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเพื่อช่วยในการจัดการพ่อแม่พันธุ์ เช่น Cuoghlán *et al.* (1998) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลา turbot (*Scophthalmus maximus*) ระหว่างประชากรในธรรมชาติและประชากรจากฟาร์มที่เพาะเลี้ยงแบบหนาแน่น โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ 3 ตำแหน่ง พบว่าค่า H_o ของ ประชากรจากฟาร์มเลี้ยงมีค่าต่ำกว่าประชากรจากธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่งของประชากรจากฟาร์มเลี้ยงมีค่าเท่ากับ 4.7 ± 1.2 ซึ่งต่ำกว่าประชากรธรรมชาติที่มีค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่งเท่ากับ 8.0 ± 2.0 อย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่าเกิดการลดลงของอัลลีล ของประชากรที่เลี้ยงในฟาร์ม

Xu *et al.* (2001) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในกึ่งกุลาดำ ระหว่างประชากรธรรมชาติ และประชากรจากการเพาะเลี้ยงในประเทศฟิลิปปินส์ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่ง พบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากรธรรมชาติ และพบว่าประชากรจากการเพาะเลี้ยงมีการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรเมื่อเปรียบเทียบกับความถี่อัลลีล และจีโนไทป์กับประชากรธรรมชาติ

Sekino *et al.* (2002) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลา Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) โดยเปรียบเทียบระหว่าง 3 ประชากรจากโรงเพาะฟัก กับ 3 ประชากรจากธรรมชาติ โดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์ 11 ตำแหน่ง พบว่าจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งของประชากรโรงเพาะฟักมีค่าลดลง และอาจเป็นผลมาจากการขาดช่วงทางพันธุกรรม

Kohlmann *et al.* (2003) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของปลา common carp (*Cyprinus carpio*) ในประชากรที่ผ่านการ domestication และประชากรจากธรรมชาติ จากทวีปยุโรป เอเชียตอนกลาง และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ด้วยเทคนิค allozymes เทคนิคไมโครแซทเทลไลต์ และ mitochondrial DNA จากการศึกษาพบว่าทุกเทคนิค ให้ผลการศึกษาออกมาคล้ายคลึงกันคือ ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงอย่างชัดเจน ในประชากรที่ผ่านการ domestication และจากการศึกษายังพบอีกว่าประชากรธรรมชาติ (ประเทศเยอรมัน) เกิดการปนเปื้อนทางพันธุกรรม

Romana-Eguia *et al.* (2005) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ซึ่งมีการคัดพันธุ์แบบ mass selection โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 5 ตำแหน่ง ใน 2 ประชากรในกลุ่มควบคุม และอีก 3 ประชากรในกลุ่มที่คัดเลือก พบว่าจำนวนอัลลีลที่พบในประชากรในกลุ่มที่มีการคัดเลือกเท่ากับ 7.4 - 10 อัลลีล ซึ่งสูงกว่าประชากรในกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 6.8 - 8.8 อัลลีล และเห็นได้ชัดว่า ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีล และ ค่า H_e ลดลงอย่างต่อเนื่องในปลารุ่นถัดไปทั้ง 2 กลุ่มประชากร จากการวิเคราะห์อัตราการผลิตพบการเพิ่มขึ้นของอัตราการผลิตในรุ่นที่มีการคัดเลือกมากกว่าในกลุ่มควบคุม

ในระบบการเพาะเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่มีการปล่อยพ่อแม่พันธุ์ลงในกระชังให้ผสมพันธุ์แบบสุ่ม โดยใช้พ่อแม่พันธุ์หลายคู่ต่อกระชัง ซึ่งเมื่อใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 7 ตำแหน่ง เพื่อศึกษาระบบการสืบพันธุ์พบว่าตัวผู้หลายตัวสามารถผสมพันธุ์กับตัวเมีย

เพียง 1 ตัว การผสมแบบนี้ส่งผลให้ลูกปลาในรุ่นถัดไปมีโอกาสมผสมเลือดชิดสูงขึ้น (Fessehaye *et al.*, 2006)

Lundrigan *et al.* (2005) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลา Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) จากฟาร์มเพาะเลี้ยงโดยศึกษาเปรียบเทียบกับประชากรจากธรรมชาติในอเมริกาเหนือ พบว่าปลาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงนั้นมีความหลากหลายของอัลลีลน้อยกว่าปลาจากธรรมชาติ แสดงให้เห็นว่าประชากรจากการเพาะเลี้ยงมีความหลากหลายต่ำกว่าประชากรธรรมชาติ การที่ความหลากหลายต่ำนั้นอาจมีผลมาจากการใช้ประชากรเริ่มต้นจำนวนน้อย

Appleyard and Ward (2006) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และ effective population size ในประชากรของหอยนางรมแปซิฟิก (*Crassostrea gigas*) ที่ผ่านการคัดพันธุ์แบบ mass selection โดยเปรียบเทียบระหว่างประชากรจากโรงเพาะฟักในเกาะแทสมาเนีย ที่ผ่านการคัดพันธุ์แบบ mass selection อย่างต่อเนื่องมา 4 รุ่น โดยเปรียบเทียบกับประชากรธรรมชาติ 2 ประชากรจากเกาะแทสมาเนีย และ อีก 2 ประชากรที่เป็นประชากรเฉพาะถิ่นของประเทศญี่ปุ่น โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง จากการศึกษาพบว่าจำนวนอัลลีล และค่าเฮตเออร์โอไซโกซิตี ลดลงในประชากรที่ผ่านการคัดพันธุ์ เมื่อพิจารณาถึงค่า effective population size แล้วเห็นได้ชัดว่าความหลากหลายจะลดลงในประชากรที่ผ่านการคัดพันธุ์

Luan *et al.* (2006) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้ง Kuruma (*Marsupenaeus japonicus*) ระหว่างประชากรจากธรรมชาติและประชากรจากการเพาะเลี้ยงโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง พบว่าค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่งมีค่าระหว่าง 9.83 (ประชากรจากการเพาะเลี้ยง) ถึง 11.83 (ประชากรธรรมชาติ) H_o มีค่าเท่ากับ 0.6935 ในประชากรจากการเพาะเลี้ยง และ 0.7370 ในประชากรธรรมชาติ ส่วน H_e มีค่าเท่ากับ 0.8209 ในประชากรจากการเพาะเลี้ยง และ 0.8169 ในประชากรธรรมชาติ แต่พบว่าบางอัลลีลที่หายากที่มักสูญหายไปแต่จะปรากฏในประชากรจากการเพาะเลี้ยง ซึ่งพบอัลลีลที่พิเศษ 14 อัลลีลในประชากรธรรมชาติ แต่มี 2 อัลลีลพิเศษที่พบเฉพาะในประชากรจากการเพาะเลี้ยง

Thai *et al.* (2007) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลา common carp ในประเทศเวียดนาม โดยศึกษาในประชากรจากโรงเพาะฟัก 11 ประชากร ประชากรจากธรรมชาติ 6 ประชากร และประชากรสายพันธุ์ที่ได้มีการทดลองเพาะพันธุ์ขึ้นอีก 3 ประชากร โดยใช้โดย

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 4 ตำแหน่ง พบว่าประชากรปลา common carp ธรรมชาติมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าประชากรจากโรงเพาะฟัก โดยพิจารณาจากค่าอัลลีลจะเห็นว่าประชากรธรรมชาติ มีค่าความถี่อัลลีล ระหว่าง 8.75 – 10.0 ส่วนประชากรโรงเพาะฟักมีค่าระหว่าง 6.50 - 9.50

Gross *et al.* (2007) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างปลา rainbow trout 12 สายพันธุ์ในยุโรปเหนือและตะวันออก เปรียบเทียบกับ 2 ประชากรจากธรรมชาติในแคนาดา และสายพันธุ์จากอเมริกา โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 10 ตำแหน่งพบว่า ประชากรส่วนใหญ่ของสายพันธุ์ยุโรปมีความคล้ายคลึงกับประชากรสายพันธุ์จากอเมริกา และพบว่าสายพันธุ์ที่ผ่านการ domestication มีจำนวนอัลลีลลดลง

สำหรับปลา catfish โดยเฉพาะในครอบครัว Pangasiidae ก็ได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดย Barua *et al.* (2004) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสาวย (*Pangasianodon hypophthalmus*) จากโรงเพาะ 4 ประชากรในประเทศบังกลาเทศ ด้วยเทคนิค allozymes จำนวน 6 ตำแหน่ง พบว่ามีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีเฉลี่ย $11.3 \pm 8.5 \%$ ค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่งมีค่า 1.3 และสามารถแบ่งประชากรออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรเท่ากับ 0.18 ประชากรจาก Anudan และ Brahmaputa มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง ในขณะที่ประชากรจาก Bhai - Bhai มีการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างสมบูรณ์

การศึกษความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรปลาสาวยในแม่น้ำโขงที่มีการอพยพย้ายถิ่น ตัวอย่างปลาสาวยเก็บจาก 10 จุด ในแม่น้ำโขง เป็นระยะทางประมาณ 1,230 กิโลเมตร ในประเทศกัมพูชาและเวียดนาม และใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง พบว่า บริเวณแหล่งวางไข่และแหล่งหากินปลาสาวยมีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง ($H_e = 0.757$) กว่าปลาน้ำจืดชนิดอื่นๆ ในประชากรจากแหล่งวางไข่ (spawning site) พบความถี่จีโนไทป์เบี่ยงเบนไปจากสมดุลฮาร์ดี - ไวน์เบิร์กในทุกประชากร สาเหตุเกิดจากการปะปนกันของประชากรย่อยอื่น (admixture) และไม่พบการลดลงของขนาดประชากรในประชากรใดเลย (So *et al.*, 2006)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างปลาสด

เก็บตัวอย่างครีบน้ำของปลาสด จำนวน 9 ประชากร (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1) ประกอบด้วย ประชากรจากโรงพยาบาล 6 ประชากร ได้แก่ ประชากรจาก ป. เจริญฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา 2 ประชากร ประกอบด้วย ประชากรปลาเทศผู้ (นำมาจากแม่น้ำโขง) จำนวน 40 ตัว และประชากร ปลาเทศเมีย 40 ตัว ประชากรจากฟาร์มสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี 50 ตัว ประชากรจากศูนย์ พัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดนครสวรรค์ 46 ตัว ประชากรจากณรงค์บ่อปลา จังหวัดนครสวรรค์ 56 ตัว และประชากรจากฟาร์มเฮียแซ่ จังหวัดนครสวรรค์ 52 ตัว นอกจากนั้นได้เก็บตัวอย่างปลาจากธรรมชาติ 3 ประชากร ประกอบด้วย ประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา จำนวน 51 ตัว แม่น้ำสะแกกรัง จังหวัดอุทัยธานี 20 ตัว และแม่น้ำโขง จังหวัดนครพนม 20 ตัว เพื่อใช้เป็นประชากรอ้างอิง รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 375 ตัวอย่าง โดยตัดครีบน้ำใสลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุเอทานอลความเข้มข้น 95% เก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากครีบน้ำของปลาสด ด้วยวิธีมาตรฐาน phenol-chloroform โดยดัดแปลง จากวิธีของ Taggart *et al.*, (1992) ใช้ตัวอย่างครีบน้ำของปลาสดประมาณ 2-5 กรัม ตัดให้เป็น ชิ้นเล็กๆ ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 ml เติม TNES-Urea (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 7.5, 0.5% SDS, 4M Urea) ปริมาตร 350 μ l และเติม proteinase K ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 μ g/ml เพื่อทำการย่อยโปรตีน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืนจากนั้นนำตัวอย่างที่ย่อยแล้วมาสกัดดีเอ็นเอ โดยขั้นแรกเติมสารละลาย phenol (pH 8) ปริมาตร 400 μ l ขั้นที่สองเติมสารละลาย phenol:chloroform:isoamyl alcohol ใน อัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตร 400 μ l และขั้นที่สามเติมสารละลาย chloroform:isoamyl alcohol ใน อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 400 μ l ในแต่ละขั้นตอนต้องนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสด้านบน (aqueous phase) ใส่หลอดไมโครเซนตริ ฟิวส์หลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย เอทานอลความเข้มข้น 95% ที่เย็นจัด

ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรตัวอย่างที่ได้ ล้างตะกอนดีเอ็นเออีก 2 ครั้งใน เอทานอล ความเข้มข้น 70% แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วเติม TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM EDTA pH 8.0) ปริมาณ 50-100 µl แล้วเก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอปลาสายที่สกัดได้ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ ดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยอาศัยหลักการว่าโครงสร้างของดีเอ็นเอจะดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตได้ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) ซึ่งในสภาวะที่ดีเอ็นเอเกลียวคู่ความเข้มข้น 50 µg/ml จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร (A_{260}) เท่ากับ 1 ซึ่งความเข้มข้นของดีเอ็นเอคำนวณได้จากสูตร

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = (A_{260}) \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

หาอัตราส่วนของ $A_{260} : A_{280}$ ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 - 1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่บริสุทธิ์ แต่ถ้าหากได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในตัวอย่างดีเอ็นเอมีอาร์เอ็นเอปนอยู่และถ้าค่าที่ได้น้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง

4. การวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลต์

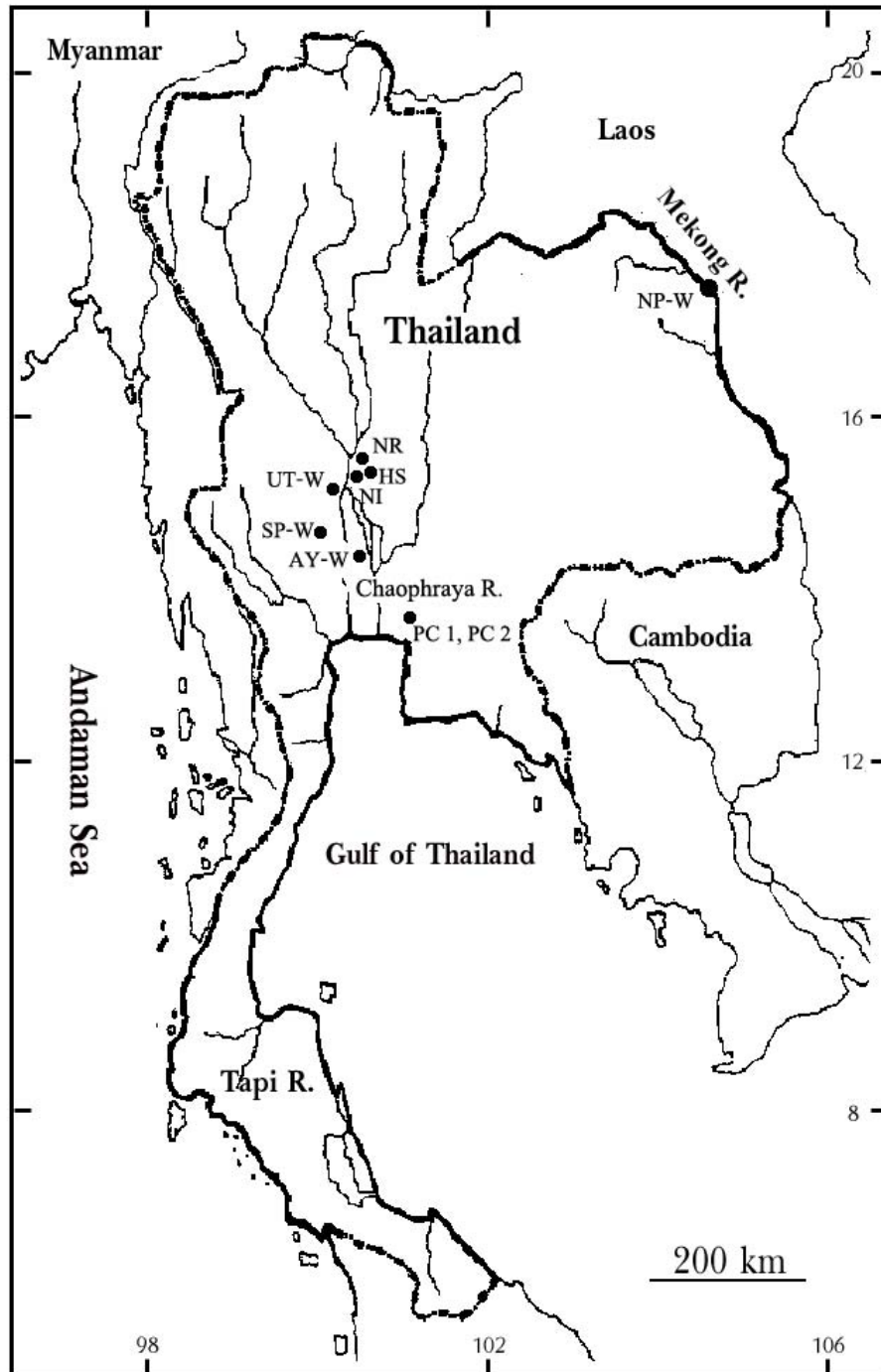
เจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอปลาสายด้วยน้ำกลั่น (deionized H_2O) ให้ได้ความเข้มข้น 10 ng/µl นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์สำหรับไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาจาก ดีเอ็นเอของปลาบึก จำนวน 5 คู่ คือ *Pg -1*, *Pg -2*, *Pg -3*, *Pg -13* และ *Pg -14* (Na-Nakorn *et al.*, 2006) (ตารางที่ 2) ลำดับเบสของไพรเมอร์แสดงไว้ในตารางที่ 2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ ใช้ส่วนผสมในปฏิกิริยารวม 10 µl ในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.5 มิลลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอเริ่มต้น 10 ng, พีซีอาร์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 1 เท่า (100 mM Tris - HCl pH 9.0, 500 mM KCl), 100 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl_2 , ไพรเมอร์ (Forward และ Reverse) 0.5 pmol, 0.2 Unit Tag DNA polymerase และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 µl จากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ (PCT-100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc.) โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิและเวลาดังนี้ 1) 94 องศาเซลเซียส

นาน 3 นาที 1 รอบ 2) 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, อุณหภูมิในการ annealing (T_A) 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ 3) 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้เติม loading buffer (0.1% bromophenol blue, 0.1% Xylene cyanol FF, 0.5 M EDTA pH 8 และ 99% formamide) ปริมาตร 5 μ l และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 3 μ l มาแยกขนาดบนโพลีอะคริลาไมด์เจล 4.5% (denaturing polyacrylamide gel ประกอบด้วย 40% acrylamide 19:1, 10X TBE และ 7 M urea) ในบัฟเฟอร์ 1X TBE ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส sequencing gel apparatus (BioRad, USA) ผ่านกระแสไฟฟ้า ขนาด 60 วัตต์ นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นตรวจสอบผลด้วยวิธี silver staining ขนาดของอัลลิลจะเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M13 sequence ladder)

ตารางที่ 1 ชื่อย่อประชากร จำนวนตัวอย่าง สถานที่เก็บตัวอย่างปลาซวยที่ใช้ในการศึกษา

ประชากร	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	ประวัติสายพันธุ์
PC 1	ป. เจริญฟาร์ม (เทศผู้) อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา	40	ปลาธรรมชาติจากแม่น้ำ โขง เพาะพันธุ์ติดต่อกัน 2-3ชั่วอายุ
PC 2	ป. เจริญฟาร์ม (เทศเมีย) อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา	40	ประชากรเริ่มต้นได้จาก ประชากร domesticate จากแม่น้ำเจ้าพระยา
SP	ฟาร์มสองพี่น้อง อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี	50	ประชากรเริ่มต้นจาก ฟาร์มในจังหวัด นครสวรรค์ และนำพ่อแม่พันธุ์จาก แม่น้ำโขงเข้ามาผสมบ้าง
NI	ศพจ. นครสวรรค์ อ.เมือง จ.นครสวรรค์	46	ประชากรเริ่มต้นจาก แม่น้ำเจ้าพระยามีการ เพาะพันธุ์ต่อเนื่องมานาน กว่า 20 ปี
NR	ฟาร์มบ่อปลาณรงค์ อ.ชุมแสง จ.นครสวรรค์	56	ประชากรเริ่มต้นจาก ศพจ.นครสวรรค์และนำ ประชากรจากแม่น้ำโขง มาผสมบ้าง
HS	ฟาร์มเฮียร์แซร์ อ. ชุมแสง จ.นครสวรรค์	52	ประชากรเริ่มต้นจาก แม่น้ำเจ้าพระยามีการ เพาะพันธุ์ต่อเนื่องมานาน กว่า 20 ปี
AY-W	แม่น้ำเจ้าพระยา จ.อยุธยา	51	ประชากรธรรมชาติ
UT-W	แม่น้ำสะแกกรัง จ.อุทัยธานี	20	ประชากรธรรมชาติ
NP-W	แม่น้ำโขง จ.นครพนม	20	ประชากรธรรมชาติ
รวม		375	



ภาพที่ 1 แหล่งเก็บตัวอย่างปลาสายทั้ง 9 ประชากร

ตารางที่ 2 รายละเอียดของไมโครเซทเทลโลไทป์ไพรเมอร์ หมายเลข GenBank Accession ลำดับเบส ของไพรเมอร์ อุณหภูมิ Annealing (°C) ทั้ง 5 ตำแหน่ง (Na-Nakorn *et al.*, 2006)

ตำแหน่ง	หมายเลข GenBank Accession	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'→3')	T _A (°C)
<i>Pg-1</i>	AY364900	F GGCCTGTCACAATGTGTATTGC R GTCTGAGGTAGGCCTGTGAGGAG	58
<i>Pg-2</i>	AY364901	F TGTGTCTAATCTTGTCCGTGCTG R TACAGTTGGACCAGACGTTTCCTC	58
<i>Pg-3</i>	AY364902	F CCAGCCCACATTAGGTAGCATC R ACTAAAAGGCCTGACCCTTAGC	60
<i>Pg-13</i>	AY364905	F GTTTTCCATCCAGGTTGTTTTTCC R TAAGTCCATGTGGGTTTCCTCTG	60
<i>Pg-14</i>	AY364906	F ACCGTGCATGTGCATTATCATAG R AGAATGTGACCTGGAAATGAGCA	52

5. การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไมโครเซทเทลโลไทป์

เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้พัฒนามาจากดีเอ็นเอของปลาชนิดอื่น (ปลาบึก) ก่อนนำไปใช้ในปลาสาวยจึงทำการทดสอบการถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปสู่ลูก ว่าเป็นไปตามกฎของ Mendel หรือไม่ การศึกษาทำโดยใช้ตัวอย่าง พ่อ แม่ ลูกอายุ 15 วัน (จำนวน 20 ตัว/ครอบครัว) จำนวน 3 ครอบครัว นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ที่ใช้ในการศึกษานี้ แยกผลผลิตพีซีอาร์ใน 4.5% โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีการในข้อ 4 จากนั้นทดสอบสัดส่วนของจีโนไทป์ของลูกว่าแตกต่างจากสัดส่วนตามกฎของ Mendel ด้วยวิธีไคสแควร์ (Chi-square Goodness of Fit Test) ที่มีการปรับค่าไคสแควร์เพื่อความถูกต้องมากขึ้น (Sokal and Rohlf, 1969) จากสูตร

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E - 0.5)^2}{E}$$

เมื่อ

O = ค่าที่ได้จากการทดลอง (observed value)

E = ค่าทางทฤษฎี (expected value)

0.5 = ค่าที่ใช้ปรับค่าไคสแควร์ให้ถูกต้องยิ่งขึ้น กรณีตัวอย่างมีจำนวนน้อย

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกข้อมูลจีโนไทป์ปลาซวายในแต่ละตำแหน่งของประชากรนำมาคำนวณและวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร ซึ่งประกอบด้วยความถี่อัลลีล จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง ค่า Effective number of allele (A_e) ค่าสังเกตและค่าคาดหมายเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o และ H_e) โดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 2000) คำนวณค่า Allelic richness (A_r) โดยใช้โปรแกรม FSTAT ver. 1.2 (Goudet, 1995) ทดสอบความแตกต่างของจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง ค่าเฉลี่ย A_r , A_e , A_e รวมทั้งค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o) ทั้ง 9 ประชากรด้วย ด้วยวิธี t - test (Archie, 1985)

6.1 ความถี่ของอัลลีล (Allele frequency) ของแต่ละตำแหน่ง คำนวณตามสูตร ดังนี้

$$X_i = (2H_A + H_B)/2N$$

เมื่อ

X_i คือ ความถี่ของอัลลีลที่ i

H_A คือ จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัส

H_B คือ จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส

N คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

6.2 จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (Mean number of alleles per locus) (Hedrick, 2000)
คำนวณได้จาก

$$N = \frac{\text{จำนวนอัลลีลทั้งหมดทุกตำแหน่ง}}{\text{จำนวนตำแหน่งทั้งหมดที่ศึกษา}}$$

6.3 Effective number of allele (A_e) (Kimura and Crow, 1964) คำนวณได้จาก

$$A_e = 1/\sum p_i^2$$

เมื่อ

p_i คือ ความถี่ของอัลลีลที่ i

6.4 Allelic richness (A_r) (Hurlbert, 1971) ใช้เปรียบเทียบความหลากหลายของอัลลีล ใน
ประชากรที่มีจำนวนตัวอย่างไม่เท่ากัน วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม FSTAT ver. 1.2 (Goudet, 1995)

6.5 ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีต่อตำแหน่งต่อตัว (Heterozygosity) คำนวณได้จากสูตร

6.5.1 ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (Observed heterozygosity, H_o)

$$H_o = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}}$$

6.5.2 ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวัง (Expected heterozygosity, H_e)

$$\begin{aligned} h_k &= 2n(1 - \sum X_i^2)/2n-1 \\ H_e &= \sum h_k/r \end{aligned} \quad (\text{Nei, 1978})$$

เมื่อ

h_k	คือ	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ตำแหน่ง k
X_i	คือ	ความถี่ของอัลลีล i ที่ตำแหน่ง k
N	คือ	จำนวนอัลลีลที่ตำแหน่ง k
r	คือ	จำนวนตำแหน่งที่ทำการศึกษา
H_e	คือ	ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีต่อตำแหน่ง

เปรียบเทียบค่า H_o ในทุกคู่ของประชากรด้วยวิธี Independent t - test (Archie, 1985) และปรับระดับความน่าจะเป็นสำหรับการใช้ข้อมูลชุดเดิมวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้งด้วย Sequential Bonferroni correction (Rice, 1989)

6.6 การทดสอบสมดุลฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก (Hardy - Weinberg Equilibrium)

นำความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของแต่ละตำแหน่งภายในประชากรมาทดสอบว่าเบี่ยงเบนไปจากสมดุลฮาร์ดี - ไวน์เบิร์กหรือไม่ โดยการประเมินค่า exact P - value ด้วยวิธี Markov chain ตามวิธีการของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization: 1000, Batches: 100, Iterations per batch: 1000) โดยใช้โปรแกรม Genepop Version 3.4 (Raymond and Rousset, 2003) และวิเคราะห์ค่า F_{IS} (inbreeding coefficient) เฉลี่ยทุกตำแหน่งในแต่ละประชากรด้วยโปรแกรม FSTAT ver. 1.2 (Goudet, 1995) และปรับระดับความน่าจะเป็นสำหรับการใช้ข้อมูลชุดเดิมวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้งด้วย sequential Bonferroni correction (Rice, 1989)

6.7 การทดสอบสภาวะคอขวด (bottleneck test)

นำข้อมูลของจีโนไทป์แต่ละประชากร มาทดสอบการกระจายตัวของความถี่อัลลีลว่าแต่ละประชากรได้ผ่านสภาวะคอขวดหรือไม่ โดยโปรแกรม Bottleneck version 1.2.02 (Cornuet and Luikart, 1997)

6.8 การทดสอบ Genotypic disequilibrium

ทำการทดสอบว่าจีโนไทป์ที่ตำแหน่งหนึ่งเป็นอิสระจากจากจีโนไทป์ที่ตำแหน่งอื่นหรือไม่ โดยการประเมินค่า exact P - value ด้วยวิธี Markov chain ตามวิธีการของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization: 1000, Batches: 100, Iterations per batch: 1000) โดยใช้โปรแกรม Genepop Version 3.4 (Raymond and Rousset, 2003) และปรับระดับความน่าจะเป็นสำหรับการใช้ข้อมูลชุดเดิมวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้งด้วย sequential Bonferroni correction (Rice, 1989)

6.9 ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F - Coefficients)

วิเคราะห์โครงสร้างประชากรย่อยของประชากรปลาสร้อยจากโรงเพาะฟักและธรรมชาติ โดยใช้โปรแกรม FSTAT ver. 1.2 (Goudet, 1995) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (Wright, 1951) ซึ่งประกอบด้วยค่า F_{IS} (smallF), F_{IT} (capF) และ F_{ST} (theta) ตามวิธีการของ Weir and Cockerham (1984) และประเมินความแตกต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญด้วย Bootstrapping ที่ความเชื่อมั่น 95% ซึ่งคำนวณค่าต่างๆ ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} F_{IS} &= (H_S - H_O) / H_S \\ F_{ST} &= (H_T - H_S) / H_T \\ F_{IT} &= (H_T - H_O) / H_T \end{aligned}$$

เมื่อ

H_O	คือ	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตภายในประชากร
H_S	คือ	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหมายในประชากรกลุ่มย่อย
H_T	คือ	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหมายในประชากรทั้งหมด

โดย

$$H_S = H_{is}/n$$

เมื่อ

$$H_{is} = 1 - \sum P_{ik}^2$$

$$H_T = 1 - \sum P_k^2$$

เมื่อ

$$P_k = \sum P_{ik}/n$$

โดย

P_{ik} คือ ค่าความถี่อัลลีลที่ i ในประชากรย่อย k

n คือ จำนวนประชากรย่อย

6.10 การทดสอบความแตกต่างของประชากร (population differentiation)

ทดสอบความถี่อัลลีลของแต่ละประชากรว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยวิธี

Fisher's exact test โดยใช้โปรแกรม Genepop Version 3.4 (Raymond and Rousset, 2003) วิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบแต่ละคู่ประชากรจนครบทุกประชากร แสดงความแตกต่างระหว่างประชากรด้วยเมตริกซ์ของระดับความน่าจะเป็น (P - value) และปรับระดับความน่าจะเป็นสำหรับการใช้ข้อมูลชุดเดิมวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้งด้วย sequential Bonferroni correction (Rice, 1989)

6.11 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance)

คำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม โดยวิธีของ Cavalli - Sforza and Edwards (1967)

chord distance จากสูตร

$$D_c = (2\sqrt{2} / \pi) (\sqrt{1 - \cos \theta})$$

$$\text{โดยที่ } \cos \theta = \sum_{i=1}^n \sqrt{p_{ix} p_{iy}}$$

เมื่อ

p_{ix}	คือ	ความถี่อัลลีลใดๆของประชากร x
p_{iy}	คือ	ความถี่อัลลีลใดๆของประชากร y
θ	คือ	$\pi/2$

ดังนั้น Cavalli - Sforza and Edwards (1967) chord distance คำนวณได้จากสูตร

$$D_c = 2/\pi [2(1 - \sum_{i=1}^n \sqrt{p_{ix} p_{iy}})]^{1/2}$$

การคำนวณทำโดยใช้โปรแกรม PHYLIP version 3.6 (Felsenstein, 1993)

6.12 AMOVA (Analysis of Molecular Variance)

วิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากรย่อยตามวิธีการของ Excoffier *et al.* (1992)

ด้วยโปรแกรม Arlequin version 2.0 (Schneider *et al.*, 2000) โดย Variance component จะนำมาคำนวณค่า F - statistics ซึ่งเป็น analogues ของ theta (Weir and Cockerham, 1984) สำหรับการศึกษามOVA ค่า F - statistics ที่ใช้ในการคำนวณ คือ

$$\begin{aligned} F_{ST} &= \text{อัตราส่วนความแปรปรวนระหว่างประชากรทั้งหมด} \\ F_{SC} &= \text{อัตราส่วนความแปรปรวนระหว่างประชากรภายในกลุ่มประชากร} \\ F_{CT} &= \text{อัตราส่วนความแปรปรวนระหว่างกลุ่มภายในตัวอย่างทั้งหมด} \end{aligned}$$

6.13 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรปลาสร้อย โดยนำความถี่อัลลีลมาทำซ้ำ 1,000 ครั้ง ในโปรแกรมย่อย SEQBOOT ผลข้อมูลที่ได้นำไปคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยวิธี Cavalli-Sforza and Edwards (1967) ในโปรแกรมย่อย GENDIST และนำค่าที่ได้ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ ด้วยวิธี Neighbor - Joining คำนวณค่า bootstrap ของจุดแยก (node) ในการสุ่ม 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรมย่อย NEIGHBOR และ CONSENSE โปรแกรมย่อยทั้งหมดนี้อยู่ในชุดโปรแกรม PHYLIP version 3.6 (Felsenstein, 1993)

6.14 การวิเคราะห์แหล่งที่มาของประชากร (assignment test)

วิเคราะห์แหล่งที่มาของประชากร เพื่อศึกษาว่าประชากรโรงเพาะฟักแต่ละประชากรมีความคล้ายคลึงกับประชากรธรรมชาติใด โดยการคำนวณ likelihood ของจีโนไทป์ในแต่ละตัวอย่างของประชากรปลาสร้อยจากธรรมชาติ เทียบกับประชากรปลาสร้อยจากธรรมชาติ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GENECLASS Version 2 (Cornuet *et al.*, 1999)

7. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. ระยะเวลาทำการทดลอง

ระยะเวลาเริ่มการทดลองเดือนมิถุนายน 2549 สิ้นสุดการทดลองในเดือนมีนาคม 2551

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การทดสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (Mendelian inheritance)

ผลการทดสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไพรเมอร์ ทั้ง 5 คู่ ในปลาสร้อยจำนวน 3 ครอบครัว พบทุกคู่ให้สัดส่วนจีโนไทป์ในรุ่นลูก ไม่แตกต่างจากสัดส่วนตามกฎของเมนเดล (ตารางที่ 3)

2. การศึกษาความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอในปลาสร้อย

2.1 ความถี่อัลลีล

จากตัวอย่างปลาสร้อยจำนวน 9 ประชากร จำนวน 375 ตัวอย่าง พบว่าตำแหน่ง *Pg-1* มีจำนวนอัลลีลทั้งสิ้น 13 อัลลีล โดยมีขนาด 215-239 bp ไมโครแซทเทลไลต์ ตำแหน่ง *Pg-2* มีจำนวนอัลลีล 12 อัลลีล ขนาด 226-248 bp ตำแหน่ง *Pg-3* มี 23 อัลลีล ขนาด 190-237 bp ตำแหน่ง *Pg-13* มี 18 อัลลีล ขนาด 199-239 bp และตำแหน่ง *Pg-14* มี 22 อัลลีล ขนาด 250-296 bp ซึ่งความถี่ของแต่ละอัลลีลที่พบในทุกตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์แสดงไว้ในตารางที่ 4

2.2 จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (*A*)

จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งในแต่ละประชากร มีดังนี้ ประชากรจากนครังค์บ่อปลา (NR) เท่ากับ 11.0 ± 1.89 ซึ่งถือว่ามีความหลากหลายต่อตำแหน่งสูงที่สุด และประชากรจาก ป.เจริญฟาร์ม เพศเมีย (PC 2) เท่ากับ 3.6 ± 0.80 มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งต่ำที่สุด ส่วนประชากรอื่นมีค่า จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งดังนี้ ประชากรจาก ป.เจริญฟาร์ม เพศผู้ (PC 1) เท่ากับ 6.8 ± 2.04 ฟาร์มสองพี่น้อง (SP) เท่ากับ 8.6 ± 1.85 ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัด

นครสวรรค์ (NI) เท่ากับ 5.8 ± 1.93 ฟาร์มเฮียร์แซร์ (HS) เท่ากับ 7.6 ± 1.49 แม่น้ำเจ้าพระยา จ.อยุธยา (AY-W) เท่ากับ 5.0 ± 0.89 แม่น้ำสะแกกรัง จ.อุทัยธานี (UT-W) เท่ากับ 7.4 ± 1.35 และ แม่น้ำโขง จ.นครพนม (NP-W) มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งเท่ากับ เท่ากับ 5.2 ± 1.60 ค่าเฉลี่ย จากทุกประชากรเท่ากับ 6.87 ± 1.54 โดยที่ประชากร NR มีความแตกต่างจากทุกประชากรอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากประชากร SP ส่วนประชากร PC 2 มีความแตกต่าง จากทุกประชากรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากประชากร NP-W (ตารางที่ 5)

2.3 ค่าเฉลี่ย Effective number of allele (A_e)

ค่าเฉลี่ย Effective number of allele (A_e) ของแต่ละประชากร ดังนี้ ประชากรจาก ป. เจริญฟาร์ม เพศผู้ (PC 1) $A_e = 4.12 \pm 1.05$ ป.เจริญฟาร์ม เพศเมีย (PC 2) เท่ากับ 2.43 ± 0.25 ฟาร์ม สองพี่น้อง (SP) เท่ากับ 4.70 ± 1.22 ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดนครสวรรค์ (NI) เท่ากับ 3.87 ± 1.51 ฌรงค์บ่อปลา (NR) เท่ากับ 6.02 ± 1.37 ฟาร์มเฮียร์แซร์ (HS) เท่ากับ 3.94 ± 0.54 แม่น้ำ เจ้าพระยา จ.อยุธยา (AY-W) เท่ากับ 4.21 ± 1.10 แม่น้ำสะแกกรัง จ.อุทัยธานี (UT-W) เท่ากับ 3.80 ± 0.37 และ แม่น้ำโขง จ.นครพนม (NP-W) เท่ากับ 3.58 ± 1.09 ค่าเฉลี่ยจากทุกประชากรเท่ากับ 4.07 ± 0.94 พบว่าประชากร NR มีความแตกต่างจากทุกประชากรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ ไม่แตกต่างจากประชากร SP และประชากร PC 2 มีความแตกต่างจากทุกประชากรอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 5)

2.4 ค่าเฉลี่ย Allelic richness (A_r)

ค่าเฉลี่ย Allelic richness (A_r) ของแต่ละประชากร พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันและไม่ แตกต่างกันทางสถิติ เว้นแต่ประชากรจากฌรงค์บ่อปลา (NR) มีค่าเฉลี่ย Allelic richness เท่ากับ 8.06 ± 0.95 ซึ่งถือว่าเป็นค่าสูงที่สุด และประชากรจาก ป.เจริญฟาร์ม เพศเมีย (PC 2) เท่ากับ 0.18 ± 0.57 เป็นค่าที่ต่ำที่สุด ซึ่งทั้งสองประชากรนี้มีค่าเฉลี่ย Allelic richness แตกต่างจากประชากรอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่าประชากรจากฟาร์มเฮียร์แซร์ (HS) ค่าเฉลี่ย Allelic richness 6.06 ± 0.93 และ แม่น้ำเจ้าพระยา จ.อยุธยา (AY-W) เท่ากับ 4.89 ± 0.88 แตกต่างจากกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนประชากรอื่นๆมีค่าเฉลี่ย Allelic richness ดังนี้ ประชากร จาก ป.เจริญฟาร์ม เพศผู้ (PC 1) เท่ากับ 5.46 ± 1.45 ฟาร์มสองพี่น้อง (SP) เท่ากับ 6.53 ± 1.57 ศูนย์

พัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดนครสวรรค์ (NI) เท่ากับ 5.09 ± 1.70 ฟาร์มเฮียร์แซร์ (HS) เท่ากับ 6.06 ± 0.93 แม่น้ำสะแกกรัง จ.อุทัยธานี (UT-W) เท่ากับ 5.98 ± 0.92 และ แม่น้ำโขง จ.นครพนม (NP-W) เท่ากับ 4.94 ± 1.57 และมีค่าเฉลี่ยจากทุกประชากรเท่ากับ 5.58 ± 1.17 (ตารางที่ 5)

2.5 ค่าสังเกต และค่าคาดหวังเซตเทอโรไซโกซิดี

ค่าสังเกตเซตเทอโรไซโกซิดี (H_o) มีค่าระหว่าง 0.608 - 0.788 โดยที่ประชากร HS และ UT-W มีความแตกต่างจากประชากรอย่างอื่นมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนค่าคาดหวังเซตเทอโรไซโกซิดี (H_e) มีค่าระหว่าง 0.593 - 0.834 โดยที่ประชากร PC 2 มีความแตกต่างจากทุกประชากรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 5) ซึ่งจากค่า F_{IS} พบว่าทุกประชากรมีค่าสังเกตเซตเทอโรไซโกซิดีต่ำกว่าค่าคาดหวัง ยกเว้นประชากรจาก ป.เจริญฟาร์ม เพศเมีย (PC 2) มีค่าสังเกตเซตเทอโรไซโกซิดีสูงกว่าค่าคาดหวัง (ตารางที่ 5)

2.6 การทดสอบสมมูลของฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก

การทดสอบการเข้าสู่สมมูลของฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก (ตารางที่ 6) และปรับระดับความน่าจะเป็นด้วย Bonferroni correction $P < 0.002$ ($0.01/5$) เมื่อพิจารณาแยกในแต่ละตำแหน่ง พบว่าตำแหน่งที่ Pg-1 มีประชากรที่อยู่ในสมมูลคือ PC 1, PC 2, NR, HS, AY-W, UT-W และ NP-W ส่วนตำแหน่ง Pg-2 มีประชากรที่อยู่ในสมมูลคือ PC 1, PC 2, SP, NI, AY-W, UT-W และ NP-W ตำแหน่ง Pg-3 คือ PC 2, SP, NI, AT-W, UT-W และ NP-W ตำแหน่งที่ Pg-13 คือ PC 1, PC 2, SP, NI, HS, AY-W, UT-W และ NP-W และตำแหน่งที่ Pg-14 มีประชากร PC 1, PC 2, NI, UT-W และ NP-W ที่อยู่ในสมมูลของฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก จากข้อมูลพบว่าตำแหน่ง Pg-1, Pg-2, Pg-3, Pg-13 และ Pg-14 มีประชากรที่อยู่ในสมมูลจำนวน 7, 6, 6, 8 และ 5 ประชากร ตามลำดับ จากที่ศึกษาทั้งหมด 9 ประชากร

เมื่อพิจารณาในแต่ละประชากร พบว่า NR เบี่ยงเบนไปจากสมมูล 4 ตำแหน่ง คือ Pg-2, Pg-3, Pg-13 และ Pg-14 ประชากร HS เบี่ยงเบนจากสมมูล 3 ตำแหน่ง คือ Pg-2, Pg-3 และ Pg-14 ประชากร SP เบี่ยงเบนจากสมมูล 2 ตำแหน่ง คือ Pg-1 และ Pg-14 ประชากร NI เบี่ยงเบนจากสมมูลเพียงตำแหน่งเดียว คือ Pg-1 ประชากร PC 1 เบี่ยงเบนจากสมมูล 1 ตำแหน่ง ได้แก่ตำแหน่ง Pg-3 และประชากร AY-W เบี่ยงเบนจากสมมูล 1 ตำแหน่ง คือ Pg-14 ผลการทดสอบสมมูลของ

ฮาร์ดี - ไวน์เบิร์กของแต่ละประชากรพิจารณาจากทุกตำแหน่ง พบว่าประชากรจากโรงเพาะฟักทั้ง 6 ประชากร ได้แก่ ประชากร PC 1, PC 2, SP, NI, NR และ HS ไม่อยู่ในสมดุลของฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก ส่วนประชากรธรรมชาติ 3 ประชากร พบว่าประชากร AY-W เป็นประชากรเดียวที่ไม่อยู่ในสมดุลของฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก ส่วนประชากร UT-W และ NP-W อยู่ในสมดุลของฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก

2.7 การทดสอบสภาวะคอขวด (Bottleneck)

ทดสอบการเกิดสภาพคอขวดของแต่ละประชากร พบว่าการกระจายตัวของอัลลีลในประชากร PC 1, SP, NI, NR, HS และ AY-W ไม่เบี่ยงเบนไปจาก L-shaped แสดงว่าไม่เกิดสภาวะคอขวด ส่วนอีก 3 ประชากร ได้แก่ PC 2, UT-W และ NP-W เกิดสภาวะคอขวด

2.8 การทดสอบ Genotypic disequilibrium

ในการทดสอบ Genotypic disequilibrium ในประชากรปลาสร้อย 9 ประชากร พบว่าการกระจายตัวของจีโนไทป์ไม่เป็นอิสระต่อกัน อย่างมีความแตกต่างทางสถิติ ในประชากรณรงค์ บ่อปลา (NR) ที่สองคู่ตำแหน่ง *Pg-1* กับ *Pg-13* และ *Pg-3* กับ *Pg-13* ประชากร และประชากร ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดนครสวรรค์ (NI) ที่คู่ตำแหน่ง *Pg-3* กับ *Pg-13* (ตารางที่ 7)

2.9 การทดสอบความแตกต่างของประชากร (Population differentiation)

เมื่อทดสอบความแตกต่างของประชากรปลาสร้อยทั้ง 9 ประชากร ด้วยวิธี Fisher's method ที่ทุกตำแหน่งและปรับระดับความน่าจะเป็นด้วย Bonferroni correction ($P < 0.0014$) พบว่าประชากรปลาสร้อยมีความแตกต่างระหว่างประชากรทุกคู่ประชากร (ตารางที่ 8)

2.10 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance)

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของปลาสร้อย โดยคำนวณตามวิธีของ Cavalli - Sforza and Edward (1967) แสดงในตารางที่ 9 พบว่าค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากโรงเพาะฟักด้วยกันมีค่าอยู่ในช่วงกว้าง ระหว่าง 0.0591 (ปล. เจริญฟาร์ม เพศผู้ กับฟาร์มสองพี่น้อง) ถึง

0.1777 (ปล. เจริญฟาร์ม เพศเมีย กับศูนย์ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดนครสวรรค์) ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรธรรมชาติด้วยกัน มีค่า ระหว่าง 0.0355 (อยุธยา กับ อุทัยธานี) ถึง 0.0534 (นครพนม กับ อุทัยธานี) และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างโรงเพาะฟักกับประชากรธรรมชาติ มีค่าระหว่าง 0.0554 (ปล. เจริญฟาร์ม เพศผู้ กับ อยุธยา) ถึง 0.1685 (นครพนม กับ ณรงค์ บ่อปลา)

ตารางที่ 3 จีโนไทป์ของพ่อ แม่ และสัดส่วนจีโนไทป์ของลูกปลาสาย จำนวน 3 ครอบครัว
และค่า χ^2 ในการทดสอบสัดส่วนลูกจีโนไทป์ต่างๆกับสัดส่วนตามทฤษฎี

ตำแหน่ง	ครอบครัว	จีโนไทป์		อัตราส่วน	จีโนไทป์ของลูก		χ^2
		พ่อ	แม่		จีโนไทป์	จำนวนที่พบ	
Pg-1	1	231/231	231/233	1:1	231/231	9	0.05 ^{ns}
					231/233	11	
	2	227/233	227/229	1:1:1:1	227/227	2	7.80 ^{ns}
					227/229	4	
					227/233	3	
					229/233	11	
	3	221/225	221/225	1:2:1	221/221	8	3.72 ^{ns}
					221/225	5	
					225/225	7	
Pg-2	1	228/232	228/228	1:1	228/228	12	0.45 ^{ns}
					228/232	8	
	2	228/232	228/232	1:2:1	228/228	8	2.52 ^{ns}
					228/232	10	
					232/232	2	
	3	228/228	228/228	1	228/228	20	0.01 ^{ns}
Pg-3	1	228/230	228/228	1:1	228/228	7	1.25 ^{ns}
					228/230	13	
	2	228/228	228/232	1:1	228/228	11	0.05 ^{ns}
					228/232	9	
	3	228/232	228/232	1:2:1	228/228	5	0.12 ^{ns}
					228/232	10	
					232/232	5	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ตำแหน่ง	ครอบครัว	จีโนไทป์		อัตราส่วน	จีโนไทป์ของลูก		χ^2
		พ่อ	แม่		จีโนไทป์	จำนวนที่พบ	
<i>Pg-13</i>	1	217/217	217/219	1:1	217/217	11	0.05 ^{ns}
					217/219	9	
	2	219/221	217/217	1:1	219/221	10	0.05 ^{ns}
					217/217	10	
	3	221/221	219/221	1:1	219/221	10	0.05 ^{ns}
					221/221	10	
<i>Pg-14</i>	1	280/280	286/288	1:1	280/286	11	0.05 ^{ns}
					280/288	9	
	2	280/288	280/286	1:1:1:1	280/280	5	0.58 ^{ns}
					280/286	6	
					280/288	3	
					286/288	6	
	3	276/276	276/292	1:1	276/276	8	0.05 ^{ns}
					276/292	12	

หมายเหตุ ^{ns} คือ ผลการทดสอบไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$, $df = 1$, $\chi^2 = 3.84$, $P < 0.05$, $df = 2$, $\chi^2 = 5.99$, $P < 0.05$, $df = 3$, $\chi^2 = 7.82$)

ตารางที่ 4 ความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลต์ 5 ตำแหน่งในประชากรปลาซวาย

อัลลีล	PC 1	PC 2	SP	NI	NR	HS	AY-W	UT-W	NP-W
<i>Pg-1</i>									
N	40	40	50	46	56	52	20	51	19
215	0.000	0.000	0.000	0.076	0.000	0.000	0.029	0.100	0.184
217	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000
219	0.175	0.000	0.130	0.076	0.063	0.087	0.078	0.125	0.184
221	0.013	0.000	0.050	0.272	0.107	0.000	0.294	0.300	0.158
223	0.175	0.575	0.140	0.174	0.152	0.135	0.098	0.125	0.105
225	0.300	0.000	0.240	0.109	0.214	0.173	0.324	0.300	0.290
227	0.025	0.175	0.100	0.076	0.080	0.096	0.039	0.000	0.053
229	0.263	0.200	0.200	0.087	0.116	0.442	0.088	0.050	0.000
<i>Pg-2</i>									
N	40	39	50	46	53	51	19	50	19
226	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000
228	0.000	0.000	0.410	0.000	0.000	0.147	0.000	0.000	0.000
230	0.013	0.436	0.010	0.000	0.000	0.039	0.421	0.560	0.553
232	0.400	0.013	0.150	0.370	0.142	0.314	0.026	0.100	0.000
234	0.063	0.449	0.080	0.239	0.000	0.029	0.105	0.160	0.026
236	0.338	0.000	0.230	0.294	0.104	0.177	0.105	0.080	0.184
238	0.075	0.103	0.100	0.044	0.057	0.029	0.263	0.100	0.158
240	0.088	0.000	0.020	0.054	0.321	0.226	0.079	0.000	0.079
242	0.025	0.000	0.000	0.000	0.104	0.020	0.000	0.000	0.000
244	0.000	0.000	0.000	0.000	0.160	0.000	0.000	0.000	0.000
246	0.000	0.000	0.000	0.000	0.057	0.000	0.000	0.000	0.000
248	0.000	0.000	0.000	0.000	0.057	0.000	0.000	0.000	0.000

ตารางที่ 4 (ต่อ)

อัลลิค	PC 1	PC 2	SP	NI	NR	HS	AY-W	UT-W	NP-W
<i>Pg-3</i>									
N	38	40	50	45	53	52	20	44	19
190	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
193	0.066	0.000	0.090	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000
195	0.079	0.000	0.090	0.000	0.000	0.019	0.000	0.011	0.000
197	0.382	0.375	0.290	0.000	0.000	0.039	0.000	0.080	0.237
199	0.145	0.025	0.280	0.000	0.000	0.058	0.125	0.205	0.474
201	0.263	0.000	0.020	0.000	0.000	0.433	0.075	0.398	0.132
203	0.000	0.000	0.080	0.000	0.000	0.269	0.350	0.171	0.000
205	0.053	0.600	0.120	0.000	0.000	0.029	0.350	0.091	0.158
207	0.013	0.000	0.020	0.000	0.000	0.135	0.100	0.034	0.000
209	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000
213	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000
215	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000
217	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000
219	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000
221	0.000	0.000	0.000	0.000	0.198	0.000	0.000	0.000	0.000
223	0.000	0.000	0.000	0.044	0.085	0.000	0.000	0.000	0.000
225	0.000	0.000	0.000	0.233	0.189	0.000	0.000	0.000	0.000
227	0.000	0.000	0.000	0.000	0.255	0.000	0.000	0.000	0.000
229	0.000	0.000	0.000	0.244	0.113	0.000	0.000	0.000	0.000
231	0.000	0.000	0.000	0.478	0.047	0.000	0.000	0.000	0.000
233	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000
235	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000
237	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000

ตารางที่ 4 (ต่อ)

อัลลิค	PC 1	PC 2	SP	NI	NR	HS	AY-W	UT-W	NP-W
<i>Pg-13</i>									
N	39	40	50	45	56	52	20	49	18
199	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
205	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000
207	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000
209	0.000	0.000	0.000	0.000	0.134	0.000	0.000	0.000	0.000
211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.045	0.000	0.000	0.000	0.000
213	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000
217	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.337	0.000	0.000	0.000
219	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.308	0.000	0.000	0.000
221	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.260	0.000	0.000	0.000
223	0.000	0.000	0.030	0.000	0.027	0.048	0.000	0.000	0.000
225	0.000	0.000	0.300	0.067	0.009	0.048	0.000	0.031	0.000
227	0.372	0.263	0.000	0.222	0.196	0.000	0.200	0.082	0.000
229	0.321	0.525	0.350	0.000	0.027	0.000	0.225	0.245	0.194
231	0.308	0.213	0.290	0.167	0.205	0.000	0.200	0.286	0.444
233	0.000	0.000	0.000	0.544	0.223	0.000	0.375	0.327	0.361
235	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027	0.000	0.000	0.010	0.000
239	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000
<i>Pg-14</i>									
N	38	39	50	46	56	52	13	51	19
250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.039	0.000	0.000	0.000
258	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000
260	0.066	0.000	0.010	0.000	0.000	0.096	0.000	0.010	0.000
262	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.053
264	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.442	0.000	0.000	0.000

ตารางที่ 4 (ต่อ)

อัลลิ	PC 1	PC 2	SP	NI	NR	HS	AY-W	UT-W	NP-W
<i>Pg-14</i>									
268	0.171	0.000	0.000	0.000	0.000	0.135	0.000	0.000	0.026
270	0.000	0.000	0.030	0.000	0.000	0.096	0.000	0.226	0.000
272	0.145	0.000	0.000	0.033	0.009	0.019	0.000	0.177	0.211
274	0.171	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.308	0.235	0.053
276	0.013	0.000	0.380	0.217	0.000	0.000	0.346	0.098	0.395
278	0.013	0.000	0.000	0.000	0.098	0.019	0.154	0.098	0.105
280	0.290	0.500	0.040	0.000	0.009	0.000	0.192	0.128	0.158
282	0.026	0.000	0.100	0.402	0.089	0.000	0.000	0.020	0.000
284	0.000	0.000	0.010	0.141	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000
285	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000
286	0.026	0.205	0.080	0.011	0.420	0.000	0.000	0.000	0.000
288	0.079	0.295	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000
289	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
290	0.000	0.000	0.180	0.174	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000
292	0.000	0.000	0.090	0.000	0.188	0.000	0.000	0.000	0.000
294	0.000	0.000	0.000	0.000	0.089	0.135	0.000	0.000	0.000
296	0.000	0.000	0.070	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

หมายเหตุ N คือ จำนวนตัวอย่าง

ตารางที่ 5 จำนวนตัวอย่างเฉลี่ยต่อประชากร จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง ($\pm$ SE) effective number of allele (A_e) ($\pm$ SE) ค่าเฉลี่ย allelic richness (A_r) ($\pm$ SE) ค่าเฉลี่ยค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตี และค่าคาดหวัง ($\pm$ SE) และค่า F_{IS} ในปลาสรวย 9 ประชากร

ประชากร	ค่าเฉลี่ย ตัวอย่าง	จำนวนอัลลิล (A) เฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย(A_e) Effective number of allele	Mean allelic Richness (A_r)	ค่าเฉลี่ย		
					H_o	H_e	F_{IS}^*
PC 1	40	6.8 $\pm$ 2.04 ^{ace}	4.12 $\pm$ 1.05 ^b	5.46 $\pm$ 1.45 ^b	0.638 ^a	0.753 ^b	0.152
PC 2	40	3.6 $\pm$ 0.80 ^b	2.43 $\pm$ 0.25 ^c	3.18 $\pm$ 0.57 ^c	0.662 ^a	0.593 ^d	-0.115
SP	50	8.6 $\pm$ 1.85 ^{ad}	4.70 $\pm$ 1.22 ^{ab}	6.53 $\pm$ 1.57 ^{ab}	0.692 ^a	0.783 ^{ab}	0.117
NI	46	5.8 $\pm$ 1.93 ^{ce}	3.87 $\pm$ 1.51 ^b	5.09 $\pm$ 1.70 ^b	0.740 ^a	0.723 ^{bc}	-0.024
NR	56	11.0 $\pm$ 1.89 ^d	6.02 $\pm$ 1.37 ^a	8.06 $\pm$ 0.95 ^a	0.763 ^a	0.834 ^a	0.085
HS	52	7.6 $\pm$ 1.49 ^{ac}	3.94 $\pm$ 0.54 ^b	6.06 $\pm$ 0.93 ^b	0.633 ^b	0.750 ^b	0.155
AY-W	51	5.0 $\pm$ 0.89 ^c	4.21 $\pm$ 1.10 ^b	4.89 $\pm$ 0.88 ^b	0.722 ^a	0.755 ^b	0.045
UT-W	20	7.4 $\pm$ 1.35 ^c	3.80 $\pm$ 0.37 ^b	5.98 $\pm$ 0.92 ^b	0.608 ^b	0.756 ^{ab}	0.195
NP-W	20	5.2 $\pm$ 1.60 ^{be}	3.58 $\pm$ 1.09 ^b	4.94 $\pm$ 1.57 ^b	0.788 ^a	0.720 ^c	-0.094
ค่าเฉลี่ย	41.7	6.87 $\pm$ 1.54	4.07 $\pm$ 0.94	5.58 $\pm$ 1.17	0.694	0.741	0.56

* $F_{IS} = 1 - (H_o/H_e)$ (Nei, 1977)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบสมมติฐานดี - ไวน์เบิร์กของประชากรปลาซวาย 9 ประชากร

ประชากร	<i>Pg-1</i>		<i>Pg-2</i>		<i>Pg-3</i>		<i>Pg-13</i>		<i>Pg-14</i>		All loci
	<i>P</i> -value	<i>F_{IS}</i>	<i>P</i> -value	<i>F_{IS}</i>	<i>P</i> -value	<i>F_{IS}</i>	<i>P</i> -value	<i>F_{IS}</i>	<i>P</i> -value	<i>F_{IS}</i>	Prob
PC 1	0.0439	+0.1130	0.4452	-0.0110	0.0000	+0.4150	0.1183	-0.1060	0.0158	+0.3100	0.000
PC 2	0.0022	+0.2590	0.0972	-0.2740	0.1674	-0.0900	0.0442	-0.2990	0.0062	-0.1430	0.000
SP	0.0003	+0.2060	0.0024	+0.0370	0.0051	+0.2840	0.1673	+0.1270	0.0000	-0.0770	0.000
NI	0.0000	+0.2130	0.4025	-0.1440	0.0067	-0.3120	0.0465	+0.1540	0.0051	-0.0770	0.000
NR	0.0063	+0.0480	0.0001	-0.1410	0.0000	+0.2420	0.0000	+0.1630	0.0001	+0.1600	high. sign.
HS	0.2215	+0.0710	0.0000	+0.0710	0.0000	+0.2570	0.0195	+0.1280	0.0000	+0.2630	high. sign.
AY-W	0.0058	+0.1880	0.2283	+0.2270	0.0644	+0.1960	0.0588	+0.2010	0.0008	+0.1900	0.0000
UT-W	0.1133	+0.0550	0.1064	+0.0010	0.2554	+0.0780	0.0125	-0.0330	0.0321	+0.1080	0.0026
NP-W	0.2821	-0.1450	0.3723	-0.2300	0.0707	+0.1720	0.1531	-0.3770	0.6163	+0.0540	0.1427

$P < 0.002$ (0.01/5) Bonferroni correction

ตารางที่ 7 การทดสอบ Genotypic disequilibrium ในประชากรปลาสวาย 9 ประชากร

ตำแหน่ง	<i>P</i> -value								
	PC 1	PC 2	SP	NI	NR	HS	AY-W	UT-W	NP-W
<i>Pg1-Pg2</i>	0.5678	0.1269	0.4789	0.4191	0.6400	0.3638	0.2314	1.0000	0.0208
<i>Pg1-Pg3</i>	0.4853	0.5631	0.8483	0.0621	0.4647	0.5094	0.4572	1.0000	0.1984
<i>Pg1-Pg13</i>	0.9894	0.8818	0.6663	0.0943	0.0000	0.8318	0.2221	0.0859	0.3245
<i>Pg1-Pg14</i>	0.4012	0.3101	0.8526	0.2690	0.1976	0.3944	0.8561	0.0449	1.0000
<i>Pg2-Pg3</i>	0.0843	0.4603	0.0608	0.7582	0.7178	0.1877	0.1765	1.0000	0.6212
<i>Pg2-Pg13</i>	0.6986	0.1668	0.8873	0.2851	0.2641	0.2555	0.0165	1.0000	0.1725
<i>Pg2-Pg14</i>	0.0438	0.3082	0.8528	0.4117	0.3993	0.1157	0.8561	0.5536	0.9272
<i>Pg3-Pg13</i>	0.3934	0.8294	0.5441	0.0000	0.0000	0.2312	0.9741	0.3182	0.2965
<i>Pg3-Pg14</i>	0.3980	0.9557	0.9069	0.4590	0.2455	0.0902	0.2506	0.6988	0.8490
<i>Pg13-Pg14</i>	0.4378	0.2014	0.8300	0.1178	0.7387	0.3805	0.4862	0.0174	0.9917

$P < 0.001$ (0.01/10) Bonferroni correction

ตารางที่ 8 ความแตกต่างระหว่างประชากรจากการทดสอบ Population differentiation ของประชากรปลาทราย 9 ประชากร

ประชากร	PC 1	PC 2	SP	NI	NR	HS	AY-W	UT-W	NP-W
PC 1	-								
PC 2	Highly sign.	-							
SP	Highly sign.	Highly sign.	-						
NI	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	-					
NR	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	-				
HS	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	-			
AY-W	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	-		
UT-W	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	-	
NP-W	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	<0.0001	-

$P < 0.0014$ (0.05/36) Bonferroni correction

ตารางที่ 9 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ของประชากรปลาสวาย 9 ประชากร

ประชากร	PC 1	PC 2	SP	NI	NR	HS	UT-W	AY-W
PC 1	-							
PC 2	0.0977	-						
SP	0.0591	0.1044	-					
NI	0.1351	0.1777	0.1217	-				
NR	0.1416	0.1761	0.1402	0.0893	-			
HS	0.0710	0.1511	0.0875	0.1594	0.1504	-		
UT-W	0.0949	0.1120	0.0880	0.1443	0.1661	0.0966	-	
AY-W	0.0554	0.1109	0.0726	0.1394	0.1662	0.0731	0.0355	-
NP-W	0.0627	0.1010	0.0758	0.1479	0.1685	0.1182	0.0534	0.0407

2.11 ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient)

ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F_{IS} , F_{IT} และ F_{ST}) ของประชากรปลาสร้อยแดงไว้ในตารางที่ 11 ค่า F_{ST} เฉลี่ยทุกตำแหน่งของประชากรปลาสร้อยแดงเท่ากับ 0.1668 ซึ่งจากการทดสอบค่าเฉลี่ย F_{ST} ด้วยวิธี Bootstrapping ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% พบว่าค่าเฉลี่ย F_{ST} มีค่าสูงกว่า 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (CI = 0.121-0.197) และแสดงว่าประชากรที่นำมาศึกษานี้มีการแบ่งเป็นประชากรย่อย

ตารางที่ 10 ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient) ในไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง

ตำแหน่ง	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
<i>Pg-1</i>	+0.1180	+0.0770	+0.1860
<i>Pg-2</i>	-0.0480	+0.1760	+0.1350
<i>Pg-3</i>	+0.1580	+0.2100	+0.3320
<i>Pg-13</i>	+0.0380	+0.1820	+0.2130
<i>Pg-14</i>	+0.0900	+0.1890	+0.2630
ค่าเฉลี่ย	+0.0712	+0.1668	+0.2258

ค่า Bootstrapping ทุกตำแหน่งที่ความเชื่อมั่น 95 %

	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
ค่าสูงสุด	0.009	0.121	0.170
ค่าต่ำสุด	0.126	0.197	0.289

2.12 AMOVA (Analysis of Molecular Variance)

จากการทดสอบค่าความแปรปรวนของประชากรปลาสร้อยแดงโดยวิธี AMOVA ทำการทดสอบความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากรจากโรงเพาะฟัก และ ประชากรธรรมชาติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มมีค่าเท่ากับ 2.17 เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนระหว่างประชากรภายในกลุ่มมีค่าเท่ากับ 15.41 และเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนภายในประชากรมีค่าเท่ากับ 82.42 (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ค่าความแปรปรวนโดยการวิเคราะห์ AMOVA ระหว่างกลุ่มประชากรโรงเพาะฟักและแหล่งน้ำธรรมชาติ

แหล่งความแปรปรวน	d.f.	Sum squares	Variance components	Percentage variation	P-value
ระหว่างกลุ่ม	1	41.677	0.04745	2.17	0.05279
ระหว่างประชากรภายในกลุ่ม	7	207.001	0.33683	15.41	0.00000
ภายในประชากร	739	1331.245	1.80141	82.42	0.00000
รวม	747	1579.924	2.1857		

2.13 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาซวาย ซึ่งคำนวณจากค่า Cavalli - Sforza and Edward's distance (ภาพที่ 2) และใช้ประชากรธรรมชาติจากประเทศเวียดนาม มาวิเคราะห์ร่วม แสดงว่าแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรก เป็นโรงเพาะฟักในจังหวัดนครสวรรค์และสุพรรณบุรีรวมทั้งประชากรจากประเทศเวียดนาม ซึ่งแบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อย มีค่าการทำซ้ำเท่ากับ 47% กลุ่มย่อยแรกประกอบไปด้วยประชากรจาก ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดนครสวรรค์ (NI) ณรงค์บ่อปลา (NR) และประชากรจากประเทศ เวียดนาม (VN-W) โดยที่ NI และ NR จับคู่กันโดยมีค่าการทำซ้ำเท่ากับ 64% ส่วนค่าการทำซ้ำ ระหว่างสองประชากรนี้กับ VN-W มีค่าเท่ากับ 58% กลุ่มย่อยที่สองประกอบไปด้วย ฟาร์มเฮียร์ แชร์ (HS) และฟาร์มสองพี่น้อง (SP) มีค่าการทำซ้ำเท่ากับ 46% กลุ่มที่สองประกอบไปด้วย ประชากรจาก ป.เจริญฟาร์มและประชากรจากธรรมชาติจากแม่น้ำประชากรจากสองแม่น้ำ ได้แก่ แม่น้ำเจ้าพระยา (จังหวัดอยุธยา และอุทัยธานี) และแม่น้ำโขง (จังหวัดนครพนม) ในกลุ่มนี้ ประชากรจากธรรมชาติและประชากรจากโรงเพาะฟักแยกออกจากกันอย่างชัดเจนเป็นสองกลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยแรกประกอบไปด้วย ป.เจริญฟาร์ม ปลาซวายเพศผู้ (PC 1) และ ป.เจริญฟาร์ม ปลา ซวายเพศเมีย (PC 2) มีค่าการทำซ้ำเท่ากับ 50% ส่วนกลุ่มประชากรจากธรรมชาติซึ่งประกอบไปด้วย ประชากรจากสองแม่น้ำ ได้แก่แม่น้ำเจ้าพระยา (จังหวัดอยุธยา และอุทัยธานี) และแม่น้ำโขง (จังหวัดนครพนม) แบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อย คือ ประชากรจากจังหวัดนครพนม และอุทัยธานี

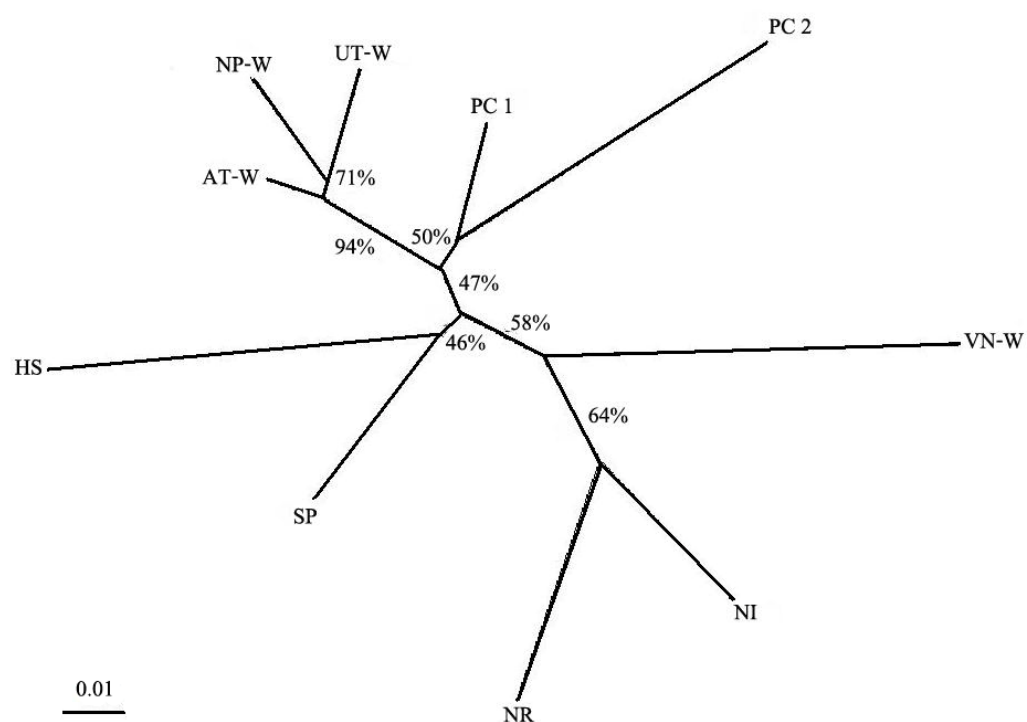
มีค่าการทำซ้ำเท่ากับ 71% ส่วนประชากรจากจังหวัดอุษายานันแยกออกไปจากกลุ่ม โดยมีค่าการทำซ้ำเท่ากับ 94%

2.14 การวิเคราะห์แหล่งที่มาของประชากร (assignment test)

ผลการวิเคราะห์แหล่งที่มาของประชากรปลาสร้อยในโรงเพาะฟัก ทำโดยนำ multilocus genotypes ของประชากรแต่ละประชากรไปจำแนกโดยเปรียบเทียบกับข้อมูล multilocus genotypes ของประชากรปลาสร้อยจากธรรมชาติ ซึ่งรวมไปถึงข้อมูลของปลาสร้อยจากธรรมชาติในประเทศเวียดนาม พบว่าประชากร ป.เจริญฟาร์มเพชรผู้ (PC 1) มาจากแม่น้ำเจ้าพระยา จ.อยุธยา มากที่สุด (66.33%) ประชากร ป.เจริญฟาร์มเพชรเมียว (PC 2) มาจากแม่น้ำสะแกกรัง จ.อุทัยธานี มากที่สุด (40.25%) ประชากรสองพี่น้องฟาร์ม (SP) มาจากแม่น้ำเจ้าพระยา จ.อยุธยา มากที่สุด (42.82%) ประชากรศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดนครสวรรค์ (NI) มาจากประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยา จ.อยุธยา มากที่สุด (48.41%) ประชากรนครบ่อปลา (NR) มาจากแม่น้ำสะแกกรัง จ.อุทัยธานี มากที่สุด (56.14%) และประชากรจากฟาร์มเฮียร์แซร์ (HS) มาจากแม่น้ำสะแกกรัง จ.อุทัยธานี มากที่สุด (65.45%) (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบแหล่งที่มาของประชากร (assignment test) ของประชากรปลาสร้อยจากโรงเพาะฟัก โดยใช้ประชากรปลาสร้อยจากธรรมชาติเป็นประชากรพื้นฐาน

ประชากร	แหล่งที่มา	เปอร์เซ็นต์	แหล่งที่มา	เปอร์เซ็นต์	แหล่งที่มา	เปอร์เซ็นต์	แหล่งที่มา	เปอร์เซ็นต์
PC 1	AY-W	66.33	NP-W	28.36	UT-W	5.30	VN-W	0.01
PC 2	UT-W	40.25	AY-W	33.05	NP-W	26.63	VN-W	0.03
SP	AY-W	42.82	NP-W	39.17	UT-W	18.02	VN-W	0.00
NI	AY-W	48.41	UT-W	38.12	NP-W	13.45	VN-W	0.02
NR	UT-W	56.14	NP-W	41.95	AY-W	1.83	VN-W	0.08
HS	UT-W	65.45	AY-W	19.29	NP-W	15.20	VN-W	0.06



ภาพที่ 2 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาสวาย 9 ประชากร
(เปอร์เซ็นต์ที่แสดงบนจุดแยกคือค่าร้อยละของการทำซ้ำจากการสุ่ม 1,000 ครั้ง)

วิจารณ์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรของปลาสวาย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรของปลาสวาย พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟักอยู่ในช่วงกว้าง ($A = 3.6 - 11.0$, $A_r = 3.18 - 8.06$, $H_o = 0.63 - 0.76$) ซึ่งบางประชากรมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่า และมีบางประชากรต่ำกว่าประชากรธรรมชาติ ($A = 5.0 - 7.4$, $A_r = 4.89 - 5.98$, $H_o = 0.68 - 0.79$) และพบว่ามีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยปลาน้ำจืด 13 ชนิด ($A = 9.1 \pm 6.1$, DeWoody and Avise, 2000) เมื่อนำค่าความหลากหลายของอัลลีลของประชากรธรรมชาติที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้มาเปรียบเทียบกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวายจากแม่น้ำโขงที่ใช้ไมโครแซทเทลไลต์ที่ไพรเมอร์ตำแหน่งต่างกัน ($A_r = 7.9 - 10.4$; จำนวนตัวอย่าง 47.0 - 59.9., So *et al.*, 2006) จะเห็นว่าประชากรธรรมชาติในการศึกษานี้มีค่าความหลากหลายของอัลลีลต่ำกว่า และเมื่อเปรียบเทียบกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวายจากแม่น้ำโขงโดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์ที่ไพรเมอร์ตำแหน่งเดียวกัน ($A = 4.80 - 6.20$; $A_r = 4.54 - 5.06$; $A_e = 2.86 - 3.20$; $H_o = 0.62 - 0.65$; $H_e = 0.62 - 0.64$, Ha *et al.*, 2009) พบว่าบางประชากรมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าแต่บางประชากรมีค่าต่ำกว่า ซึ่งในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรที่ผ่านการ domestication โดยทั่วไปมักจะสูญเสียความหลากหลายของอัลลีล มีรายงานใน Japanese flounder ($A = 5.9 - 10.4$, $H_o = 0.57 - 0.72$ ในประชากรโรงเพาะฟัก และ $A = 15.3 - 18.2$, $H_o = 0.75 - 0.78$ ในประชากรธรรมชาติ) (Sekino *et al.*, 2002) ปลาใน *Cyprinus caprio* L. ($A_r = 4.44$, $H_o = 0.09 - 0.49$ ในประชากรโรงเพาะฟัก และ $A_r = 8.22$, $H_o = 0.63 - 0.86$ ในประชากรธรรมชาติ) (Kohlmann *et al.*, 2005) Aho *et al.* (2006) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมและระดับของ N_e แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ความหลากหลายของอัลลีลมีความสัมพันธ์ทางลบกับระยะเวลานับจากเมื่อเริ่มสร้างสต็อก (อัลลีลจะสูญหายไปในอัตรา 0.1 อัลลีล/ชั่วอายุ) ยังพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง N_e เมื่อเริ่มสร้างสต็อก กับค่าความหลากหลายของอัลลีล

การศึกษานี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงผลของระบบการจัดการพ่อแม่พันธุ์ในโรงเพาะฟัก (โรงเพาะฟักที่ไม่มีการนำเอาประชากรอื่นมาผสมเพิ่มเติม, มีการนำประชากรจากแหล่งเดิม และการนำเอาประชากรที่ไม่ใช่ประชากรท้องถิ่นมาผสมเพิ่มเติม) ซึ่งเห็นได้ว่าค่า A_r (แสดงถึงค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่เป็นอิสระจากจำนวนตัวอย่างแล้ว) มีค่าลดลงในประชากรที่ไม่มีการนำเอาประชากรอื่นมาผสมเพิ่มเติม (PC 2 และ HS) และการนำประชากรจากแหล่งเดิมมาผสม

เพิ่มเติม (NI นำประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยามาผสมเพิ่ม) เมื่อเปรียบเทียบกับประชากรที่มีการนำประชากรที่ไม่ใช่ประชากรท้องถิ่นมาผสมเพิ่มเติม (NR และ SP นำประชากรจากแม่น้ำโขงมาผสมเพิ่ม) จะเห็นว่าประชากร NR ($A = 11.0 \pm 1.89$, $A_r = 8.06 \pm 0.95$) และ SP ($A = 8.6 \pm 1.85$, $A_r = 6.53 \pm 1.57$) มีค่าความหลากหลายของอัลลีลสูงกว่าประชากรจากธรรมชาติอย่างเห็นได้ชัด ส่วนประชากรอื่น ได้แก่ HS ($A = 7.6 \pm 1.49$, $A_r = 6.06 \pm 0.93$, $H_o = 0.63$) PC 1 ($A = 6.8 \pm 2.04$, $A_r = 5.46 \pm 1.45$, $H_o = 0.64$) NI ($A = 5.8 \pm 1.93$, $A_r = 5.09 \pm 1.70$, $H_o = 0.74$) และ PC 2 ($A = 3.6 \pm 0.80$, $A_r = 3.18 \pm 0.57$, $H_o = 0.66$) ถึงแม้ว่าความหลากหลายของอัลลีลไม่สูงมากนัก แต่ก็ไม่แตกต่างจากประชากรธรรมชาติ ประชากรโรงเพาะฟักมีความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่ต่างจากประชากรธรรมชาติ มีรายงานอยู่บ้าง เช่น ในปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) ในประเทศนอร์เวย์ และไอร์แลนด์ พบว่าปลาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงมีค่า $A = 6.8 - 11.9$, $H_o = 0.41 - 0.64$ ขณะที่ประชากรธรรมชาติมีค่า $A = 7.6 - 11.5$, $H_o = 0.0.64 - 0.68$ (Norris, 1999) ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งในบางประชากรจากโรงเพาะฟักที่มีค่าต่ำกว่าประชากรจากธรรมชาติ (PC 1, PC 2 และ NI) แต่เมื่อพิจารณาที่ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี ไม่มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับประชากรธรรมชาติ เช่นเดียวกับการศึกษาในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในประเทศฟิลิปปินส์ (ประชากรจากธรรมชาติ และประชากรโรงเพาะฟักมีค่า $A = 23.9$ และ 12.8 ตามลำดับ และ $H_o = 0.750 - 0.791$ และ $0.742 - 0.798$ ตามลำดับ (Xu *et al.*, 2001) Allendorf and Phelps (1980) สรุปไว้ว่าค่าเฮเทอโรไซโกซิตีไม่ไวต่อการขาดช่วงทางพันธุกรรม ทำให้ค่านี้ใช้วัดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ภายในประชากรได้ไม่ดีเท่ากับจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง เช่น ถ้าเกิดปรากฏการณ์คอขวดขึ้นในประชากร จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งจะลดลงในขณะที่ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Xu *et al.*, 2001; Kalinowski, 2004; Lundrigan *et al.*, 2005; Machado - Schiaffino *et al.*, 2007)

ประชากรที่ผ่านการ domestication มักจะสูญเสียความหลากหลายของอัลลีล ซึ่งเป็นผลโดยตรงจากการเกิดการขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) (Allendorf and Phelps, 1980) ทั้งนี้ อาจมีสาเหตุเนื่องจากการนำพ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อยมาใช้เป็นประชากรเริ่มต้น (founder) และการที่ค่า N_e ลดต่ำลง ทั้งนี้การที่ N_e ลดต่ำลงนั้นเป็นอาจผลมาจากการสร้างประชากรในระยะเริ่มต้นของโรงเพาะฟักมีการใช้พ่อแม่พันธุ์ในอัตราส่วนที่ไม่เท่ากัน เนื่องจากปลาสายเพศเมียสามารถให้ไข่ในจำนวนที่มาก (170,000 - 2,575,000 ฟอง/ตัว, อารีย์ และสุจิต, 2509) ซึ่งเพียงพอต่อการผลิตลูกปลา ทำให้มีการใช้แม่พันธุ์จำนวนน้อย นอกจากนั้นยังพบว่าในการเพาะพันธุ์ด้วยวิธีการผสมเทียม มักใช้พ่อแม่พันธุ์ในอัตราส่วนที่ไม่เท่ากัน (อารีย์ และสุจิต, 2509) การปฏิบัติในลักษณะนี้ส่งผลให้

ค่า N_e ลดลง (Falconer and Mackay, 1996) สำหรับประชากรธรรมชาติ (AY-W, UT-W และ NP-W) ค่า A_r ไม่มีความแตกต่างกัน แต่พบว่ามีความต่ำกว่าประชากรโรงเพาะฟักบางประชากร ทั้งนี้เนื่องจากการนำไพรเมอร์ที่พัฒนามาเพื่อสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมาใช้กับอีกชนิดที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน มักมีข้อจำกัดในเรื่องของการพบสถานะความหลากหลายของยีนลดลง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน (Primmer *et al.*, 1996; Rutkowski *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้เช่นกันว่า ประชากรปลาสวยในธรรมชาติอาจสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม จนมีค่าไม่แตกต่างจากประชากรโรงเพาะฟัก เนื่องจากการผสมพันธุ์กับปลาจากโรงเพาะฟักซึ่งเป็นปลาที่มีการปล่อยตามนโยบายการเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำของกรมประมงโดยพบว่าในแต่ละปีมีการปล่อยปลาสวยลงแม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำอื่น ๆ อย่างสม่ำเสมอ

ประชากรส่วนใหญ่ไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก โดยมีโฮโมไซโกตมากกว่าค่าคาดหวัง (ยกเว้นในประชากร PC 2 และ NP ที่มีโฮโมไซโกตน้อยกว่าค่าคาดหวัง) ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ การมีประชากรที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันมากกว่า 1 ประชากรอยู่ในตัวอย่างเดียวกัน (Wahlund effect) หรือการผสมเลือดชิด (Falconer and Mackay, 1996) หรืออาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้มีน้อยทำให้ไม่ครอบคลุม จีโนไทป์ทุกจีโนไทป์ที่เป็นไปได้ทั้งหมด (Hedrick, 2000) เมื่อพิจารณาจากค่า F_{IS} ของไมโครแซทเทลไลต์แต่ละตำแหน่งแล้วพบว่าประชากรที่ไม่อยู่ในสมดุลของฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก มีโฮโมไซโกตมากกว่าค่าคาดหวังในบางตำแหน่งเท่านั้น จึงเป็นไปได้ว่าเกิดการผสมเลือดชิดในประชากรนั้น ๆ เนื่องจากการผสมเลือดชิดจะมีผลต่อยีนทุก ๆ ตำแหน่งเท่า ๆ กัน นอกจากนั้นค่าเฮเทอโรไซโกติของประชากรทั้งหมดยังอยู่ในระดับสูง ทำให้การผสมเลือดชิดไม่น่าจะเป็นสาเหตุของการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก และไม่พบ null allele ในไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 5 ตำแหน่งที่ศึกษา ดังนั้นการปะปนกันระหว่างประชากรที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันน่าจะเป็นสาเหตุของการ ไม่อยู่ในสมดุลของฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก คำอธิบายนี้สอดคล้องกับวิธีปฏิบัติของโรงเพาะฟักส่วนใหญ่ที่นำปลาจากแหล่งอื่นๆเข้ามาผสม นอกจากนี้ยังพบ Linkage disequilibrium ของไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 2 ตำแหน่ง ($Pg1-Pg13$ และ $Pg3-Pg13$) ใน 2 ประชากร (NR และ NI) ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับข้อมูลของโรงเพาะฟัก (NR) พบว่ามีการนำพ่อแม่พันธุ์บางส่วนมาจากแม่น้ำโขงเข้ามาผสม ประชากร PC 2 เบี่ยงเบนจากสมดุลของฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก ไปในทางที่มีเฮเทอโรไซโกตสูงกว่าค่าคาดหวัง แต่กลับทดสอบพบสถานะคอขวดในประชากร (การทดสอบ Bottleneck Cornuet and Luikart, 1997) การที่มีเฮเทอโรไซโกตสูงกว่าค่าคาดหวังอาจเกิดจากสาเหตุต่างๆ เช่น การที่โฮโมไซโกตมีอัตราการลดต่ำกว่าเฮเทอโรไซโกตซึ่งพบในหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) (Fujio *et al.*, 1979) อย่างไรก็ตามไม่มีข้อมูลสนับสนุนว่าสาเหตุใดทำให้เกิดการเบี่ยงเบน ในประชากรนี้ แต่โดยปกติประชากรที่เกิดสถานะคอขวด มักจะ

เบี่ยงเบนจากสมดุลของฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก ไปในทิศทางที่มีโฮโมไซโกตมากกว่าค่าคาดหวัง ดังนั้นคาดว่าประชากร PC 2 อาจเกิดจากการผสมข้ามระหว่างประชากรที่มีพันธุกรรมต่างกัน แต่การผสมใช้พ่อแม่เพียงน้อยคู่ แต่คำอธิบายนี้ก็ยังมีข้อขัดแย้งเล็กน้อยเนื่องจากไม่พบ genotypic disequilibrium ในประชากรนี้

โครงสร้างทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

ในการศึกษาโครงสร้างประชากรโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ Wright (1978) ได้ให้ความหมายของค่า F_{ST} ในแต่ละช่วงไว้ดังนี้ ค่า F_{ST} เท่ากับ 0 - 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ค่า F_{ST} เท่ากับ 0.05 - 0.15 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง ค่า F_{ST} เท่ากับ 0.15 - 0.25 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก และค่า F_{ST} มากกว่า 0.25 ขึ้นไป แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด จากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปลาซายทั้ง 9 ประชากร พบว่า F_{ST} มีค่าสูง และแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าประชากรปลาซายที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อย ซึ่งระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาซายนี้มีค่าต่ำเมื่อเทียบกับปลาชนิดอื่นๆ เช่น ปลา European grayling ($F_{ST} = 0.394$) (Gum *et al.*, 2003), cutthroat trout ($F_{ST} = 0.121$) (Wenburger *et al.*, 1998), bull trout ($F_{ST} = 0.659$) (Spruell *et al.*, 2003) และ jarabugo ($F_{ST} = 0.112$) (Salgueiro *et al.*, 2003) และมีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลาซัลมอน (*Salmo salar*) ($F_{ST} = 0.057$) (Norris *et al.*, 1999), steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) ($F_{ST} = 0.05$) (Nielsen *et al.*, 1999), Chinook salmon ($F_{ST} = 0.039$) (Beacham *et al.*, 2003), *Brycon opalinus* ($F_{ST} = 0.0432$) (Barroso *et al.*, 2005) และปลาเทราท์ ($F_{ST} = 0.02$) (Nielsen *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามค่า F_{ST} จากการศึกษาต่างๆ อาจไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง แม้จะใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดเดียวกัน เนื่องจากในการเก็บตัวอย่าง ในแต่ละการศึกษาคครอบคลุมพื้นที่ขนาดต่างๆกัน (เช่น การศึกษาที่ครอบคลุมระยะทาง 500 กิโลเมตร ย่อมจะมีค่า ต่ำกว่าการศึกษาที่ครอบคลุมระยะทาง 2000 กิโลเมตรเป็นต้น)

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ประชากรปลาซายทั้ง 9 ประชากร มีค่าระหว่าง 0.0355 (อุทัยธานีกับอยุธยา) ถึง 0.1777 (ป.เจริญฟาร์มเพชรเมืง กับศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดจันทบุรี นครสวรรค์) เมื่อพิจารณาจากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาซายที่ศึกษา นี้ พบว่าสอดคล้องกับประวัติของปลาในโรงเพาะฟักเป็นอย่างดี จะเห็นว่าประชากร NR จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ NI จากประวัติ NR รับพ่อแม่พันธุ์เริ่มต้นจากศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดนครสวรรค์

(NI) และมีการนำปลาจากแม่น้ำโขงมาผสม SP จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ HS ซึ่ง SP (สองพี่น้องฟาร์ม) ให้ข้อมูลว่านำปลาจากโรงเพาะฟักดั้งเดิมที่นครสวรรค์ มาเป็นประชากรเริ่มต้น และได้นำปลาจากแม่น้ำโขงมาผสมบ้าง เป็นที่น่าสังเกตว่าประชากรจากธรรมชาตินั้นมีการเกาะกลุ่มเป็นกลุ่มเดียวกันอย่างชัดเจน โดยที่ประชากรจากแม่น้ำโขง (NP-W) ก็จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยาอย่างคาดไม่ถึง อาจเป็นไปได้ว่าในอดีตมีการเชื่อมต่อระหว่างแม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำโขง (Kottelat, 1989) ดังนั้นจึงส่งผลให้เกิดความคล้ายคลึงของปลาในสองแม่น้ำนี้ (เช่นที่พบในปลาคูก้าน *Clarias batrachus*, อธิยา และคณะ, 2544; ปลาคูกอูย *C. macrocephalus*, Na - Nakorn et al., 2004) นอกจากนั้นการที่ปลาเลี้ยงเล็ดลอดลงไปในแม่น้ำ และการปล่อยปลาตามนโยบายการเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำของกรมประมง อาจเป็นสาเหตุให้ปลาทั้งสองแม่น้ำนี้คล้ายกันมากกว่าที่ควรจะเป็น โดยในแต่ละปีมีการปล่อยปลาสายลงแม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำสาขามาโดยตลอด (ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดนครสวรรค์, 2545; ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดชัยนาท, 2546; สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดอุทัยธานี, 2546) ดังนั้นจึงเชื่อได้ว่าการเล็ดลอดของประชากรโรงฟักไปสู่ธรรมชาติทั้งในแม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำโขง

การวิเคราะห์แหล่งที่มาของประชากร (assignment test) ใช้ข้อมูลของประชากรปลาสายจากธรรมชาติเป็นข้อมูลพื้นฐาน ผลที่ได้สอดคล้องกับประวัติของปลาในโรงเพาะฟัก โดยโรงเพาะฟักที่นำเอาพ่อแม่พันธุ์จากแม่น้ำโขงเข้ามาผสม (NR และ SP) นั้นพบว่ามาจากแม่น้ำโขง (NP -W) 41.95 และ 39.17% ตามลำดับ และมีความเป็นไปได้ว่าเกิดความผิดพลาดในการบันทึกประวัติของประชากร PC 1 และ PC 2 เนื่องจากประชากร PC 1 ได้บันทึกว่าเป็นประชากรปลาธรรมชาติจากแม่น้ำโขง โดยมีการเพาะพันธุ์ติดต่อกัน 2 - 3ชั่วอายุ แต่พบว่าประชากร PC 1 มาจากแม่น้ำเจ้าพระยา จ.อยุธยา (AY-W) 66.33% และมาจากแม่น้ำโขง (NP-W) เพียง 28.36% จากการวิเคราะห์แหล่งที่มาของประชากร ก่อนข้างจะเป็นที่ชัดเจนว่าประชากรจากโรงเพาะฟักในแต่นั้นที่มีการปนเปื้อนโดยประชากรปลาจากแม่น้ำโขงในไทยไม่ใช่จากเวียดนามแต่อย่างใด จะเห็นได้จากประชากรโรงเพาะฟักทุกประชากรมาจากแม่น้ำโขง (NP-W) โดยที่บางประชากรไม่มีประวัติว่าได้นำปลาจากแม่น้ำโขง หรือจากแหล่งอื่นมาผสม (HS มาจาก NP-W 15.20%, NI มาจาก NP-W 13.45% และ PC 2 มาจาก NP-W 28.64%)

จากการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงข้อมูลระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและของประชากรปลาสายทั้งจากโรงเพาะฟักและธรรมชาติซึ่งข้อมูลนี้นับว่ามีความสำคัญต่อการวางแผนการจัดการพ่อแม่พันธุ์ในโรงเพาะฟัก

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสร้อยจากโรงเพาะฟักในประเทศไทย ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ สรุปได้ดังนี้

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาจากปลาบึก ทั้ง 5 คู่ นี้ได้แก่ *Pg-1*, *Pg-2*, *Pg-3*, *Pg-13* และ *Pg-14* สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปลาสร้อยได้ ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปลาสร้อย มีค่าปานกลางโดยประชากรปลาสร้อยจากโรงเพาะฟักมีค่าเท่ากับ $A = 3.6 - 11.0$, $A_r = 3.18 - 8.06$, $H_o = 0.63 - 0.76$ และประชากรปลาสร้อยจากธรรมชาติมีค่าเท่ากับ $A = 5.0 - 7.4$, $A_r = 4.89 - 5.98$, $H_o = 0.68 - 0.79$ แสดงให้เห็นว่าประชากรโรงเพาะฟักมีการจัดการพันธุกรรมที่ดีในระดับหนึ่ง ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่ลดลงเมื่อเทียบกับประชากรธรรมชาติ ประชากรจากโรงเพาะฟักทุกประชากรที่ศึกษามีความถี่โนไทป์ไม่อยู่ในสมดุลของฮาร์ดี - ไวน์เบิร์กทุกประชากร อาจมีสาเหตุมาจากการที่มีประชากรที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่า 1 ประชากรเข้ามาผสม

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาสร้อยที่ศึกษานี้ แบ่งแยกออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มแรกเป็นโรงเพาะฟักในจังหวัดนครสวรรค์และสุพรรณบุรีรวมทั้งประชากรจากประเทศเวียดนามซึ่งได้นำข้อมูลมาวิเคราะห์ร่วม โดยแบ่งเป็นสองกลุ่มย่อยได้แก่ ประชากรจากศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดนครสวรรค์ (NI) ณรงค์บ่อปลา (NR) และประชากรจากประเทศเวียดนาม (VN-W) กลุ่มย่อยที่สองประกอบไปด้วย ฟาร์มเฮียร์แซร์ (HS) และฟาร์มสองพี่น้อง (SP) กลุ่มที่สองประกอบไปด้วยสองกลุ่มย่อยเช่นกันได้แก่ ป.เจริญฟาร์ม ปลาสร้อยเทศผู้ (PC 1) และ ป.เจริญฟาร์ม ปลาสร้อยเทศเมีย (PC 2) อีกกลุ่มประกอบไปด้วยประชากรจากธรรมชาติทั้ง 3 ประชากร

ข้อเสนอแนะ

1. ประชากรจากโรงเพาะฟักในการศึกษาบางประชากรมีความหลากหลายของอัลลีลต่ำกว่าปลาในธรรมชาติ (เช่น PC 2) หากนำมาทำการ domestication ต่อไปจะทำให้ได้ประชากรที่มีความหลากหลายต่ำ ซึ่งอาจจะส่งผลเสียต่อลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ จึงควรนำพ่อแม่ปลาจากประชากรจากโรงเพาะฟักอื่นมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพิ่มเติม เพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมและหลีกเลี่ยงการผสมเลือดชิดภายในประชากร
2. ประชากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงอยู่แล้ว ควรมีการจัดการประชากรปลาในโรงเพาะฟักตามหลักการที่ถูกต้อง เช่น เมื่อทำการเพาะพันธุ์ควรใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนมาก และควรใช้พ่อแม่พันธุ์ในอัตราส่วนที่เท่ากัน เพื่อไม่ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงและเกิดการผสมเลือดชิด อีกประการคือควรระวังปลาไม่ให้เล็ดลอดไปสู่ธรรมชาติ เพราะจะทำให้พันธุกรรมของประชากรปลาที่มีอยู่เดิมในธรรมชาติเปลี่ยนแปลงไป โดยอาจทำให้ลดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร
3. ควรรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันในแต่ละประชากรไว้ เนื่องจากความแตกต่างระหว่างประชากรเป็นเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแต่ละประชากรเพราะหากต้องการนำประชากรมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์นั้นต้องการประชากรที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม
4. ควรมีการศึกษาลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่นการเจริญเติบโต ความต้านทานโรคของประชากรที่มีพันธุกรรมต่างกันเพื่อเป็นข้อมูลในการใช้ประโยชน์ประชากรเหล่านี้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชวลิต วิทยานนท์. 2544. **ปลาน้ำจืดไทย**. นานมีบุ๊ค. กรุงเทพฯ.

สุภาวดี พุ่มพวง. 2551. การผสมเลือดชิดและการขาดช่วงทางพันธุกรรมในประชากรขนาดเล็ก, หน้า 34-45. ใน อุทัยรัตน์ ณ นคร และวงศ์ปฐม กมลรัตน์, บรรณาธิการ. **พันธุศาสตร์ประชากรเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. กรุงเทพฯ.

สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดอุทัยธานี สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2546. **รายงานประจำปี พ.ศ. 2546**.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดชัยนาท สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2546. **รายงานประจำปี พ.ศ. 2546**.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดนครสวรรค์ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2545. **รายงานประจำปี พ.ศ. 2545**.

ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2551. **สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2545**. เอกสารฉบับที่ 8/2551.

อารีย์ สิทธิมงคล และสุจิต ภิญโญอิง. 2509. การเพาะปลาสาวยโดยวิธีฉีดฮอร์โมนผสมเทียม. **เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 5**. กองบำรุงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรมประมง.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2543. **พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อัยยา อรรถอินทรีย์, อุทัยรัตน์ ณ นคร, สมศรี งามวงศ์ชน และ พงศ์เชษฐ พิษิตกุล. ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปลาคูกด้าน (*Clarias batrachus*) ในประเทศไทย, หน้า 113-120. ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- Aho, T., J. Rönn., J. Piironen and M. Björklund. 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. **Aquaculture** 253: 244-248.
- Allendorf, F.W and S.R. Phelps. 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of Cutthroat Trout. **Trans. Am. Fish. Soc.** 109: 537-543.
- Anonymous. 2009. **Vietnam's tra fish exports to Russia to be resumed.** Vietnam Net. Available Source: http://vietnamnet.vn/service/printversion.vnn?article_id=1177024, March 26, 2009.
- Appleyard, S.A and R.D. Ward. 2006. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture** 254: 148-159.
- Archie, J.W. 1985. Statistical analysis of heterozygosity data: independent sample comparisons. **Evolution** 39: 623-637.
- Barroso, R.M., A.W. S. Hilsdorf, H.L.M. Moreira, P.H. Cabello and Y.M. Traub-Cseko. 2005. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. **Aquaculture** 247: 51-65.
- Barua, S., M. S. Alam., Md. M, R. Khan and V. Simonsen. 2004. Genetic variation in four hatchery population of Thai Pangas, *Pangasius hypophthalmus* of Mymensingh region in Bangladesh using allozyme marker. **Pakistan J. Biol. Sci.** 7 (2): 144-149.
- Beacham, T.D., K.J. Supernault, M. Wetklo, B. Deagle, K. Labaree, J.R. Irvine, J.R. Candy, K.M. Miller, R.J., Nelson and R.E. Withler. 2003. The geographic basis for population structure in Fraser River chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. **Fish. Bull.** 101 (2): 229-242.

- Cavalli-Sforza, L.L and A.W.F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedure. **Evolution** 21: 550-570.
- Charoentawee, K., P. Supawadee and U. Na-Nakon. 2006. Isolation and characterization of microsatellites in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Mol. Ecol. Notes**. 6: 823–825.
- Cornuet, J.M and G. Luikart. 1997. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics** 144: 2001-2014.
- Cornuet, J.M., S. Piry, G. Luikart, A. Estoup and M. Solignac. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. **Genetics** 153: 1989-2000.
- Cuoghlán, J.P., A.K. Imaland., P.T. Galvin., R.D. Fitzgerald., G. Naevdal and T.F. Cross. 1998. Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study. **J. Fish Biol.** 2: 916-922.
- DeWoody, J.A and J.C. Avise. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. **J. Fish Biol.** 56: 461-473.
- Doyle, R.W. 1983. An approach to the quantitative analysis of domestication selection in aquaculture. **Aquaculture** 33: 167-185.
- Excoffier, L., P.E. Smouse and J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131: 479-491.

- Falconer, D.S and T.F.C. Mackay. 1996. **Introduction to Quantitative Genetics**. Longman, Essex.
- Felsenstein, J. 1993. **PHYLIP** (Phylogeny Inference Package) Version 3.5 c. Distributed by the author. Department of Genetic, University of Washington, Seattle, USA.
- Fessehaye, Y., Z. El-bialy, M. A. Rezk, R. Crooijmans, H. Bovenhuis and H. Komen. 2006. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: a microsatellite analysis. **Aquaculture** 256: 148–158.
- Fujio, Y., Y. Nakamuru and M. Sugita. 1979. Selective advantage of heterozygotes at catalase locus in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Jpn. J. Genet.** 54: 359-366.
- Goldstein, D.B. 2001. **Microsatellites Evolution and Application**. Oxford University Press Inc., New York.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (ver. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Heredity**. 86: 485-486.
- Gross, R., P. Lulla and T. Paaver. 2007. Genetic variability and differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains in northern and Eastern Europe. **Aquaculture** 272S1: S139-S146.
- Gum, B., R. Gross, O. Rottmann, W. Schröder and R. Kühn. 2003. Microsatellite variation in Bavarian populations of European grayling (*Thymallus thymallus*): implications for conservation. **Conserv. Genet.** 4: 659-672.
- Guo, S.W and E.A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics** 48: 361-372.

Hedrick, P.W. 2000. **Genetics of populations**. Jones and Bartlett Publishers, Inc., USA.

Hurlbert, S.H. 1971. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. **Ecology** 52: 577-586.

Kalinowski, S.T. 2004. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. **Conserv. Genet.** 5: 539–543.

Kimura, M and J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics** 49: 725-738.

Kohlmann, K., R. Gross, A. Murakaeva and P. Kersten. 2003. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers. **Aquat. Living Resour.** 16: 421-431.

Kohlmann, K., P. Kersten and M. Flajshans. 2005. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. **Aquaculture** 247: 253-266.

Kottelat, M. 1989. Zoogeography of The Fishes from Indochinese Inland Waters with An Annotated Check-list. Bulletin Zoologisch Museum, Universiteit Van Amsterdam. Vol. 12, No. 1, 56 pp.

Luan, S., J. Kong and Q.Y. Wang. 2006. Genetic variation of wild and cultured populations of the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate 1888) using microsatellites. **Aquac. Res.** 37: 785-793.

- Lundrigan, T.A., J.D. Reist and M.M. Ferguson. 2005. Microsatellite genetic variation within and among Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from aquaculture and natural populations in North America. **Aquaculture** 244: 63-75.
- Machado-Schiaffino, G., E. Dopico and E. Garcia-Vazquez. 2007. Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. **Aquaculture** 264: 59-65
- Na-Nakorn, U., W. Kamonra and T. Ngamsiri. 2004. Genetic diversity of walking catfish, *Clarias macrocephalus*, in Thailand and evidence of genetic introgression from introduced farmed *C. gariepinus*. **Aquaculture** 240: 145-163.
- _____, U., K. Sriphairoj., S. Sukmanomon., S. Poompuang and W. Kamonrat. 2006. Polymorphic microsatellite primers developed from DNA of the endangered Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas* (Chevey) and cross-species amplification in three species of *Pangasius*. **Mol. Ecol. Notes**. 6: 1174-1176.
- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Ann. Human. Genet. Ann.** 1: 225-233.
- _____. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 89: 583-590.
- Nielsen, J.L., K.D. Crow and M.C. Fountain. 1999. Microsatellite diversity and conservation of a relic trout population: the McCloud River redband trout. **Mol. Ecol.** 8: 129-142.
- Norris, A.T., D.G. Bradley and E.P. Cunningham. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon *Salmo salar* populations. **Aquaculture** 180: 247-264.

- Petit, R.J., A.E. Mousadik and O. Pons. 1998. Identifying Populations for Conservation on the Basis of Genetic Markers. **Conserv. Biol.** 12: 844-855.
- Primmer, C.R., A.P. Møller and H. Ellegren. 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. **Mol. Ecol.** 5: 365-378.
- Raymond, M and F. Rousset. 2003. Genepop 3.4., an updated version of Genepop V.1.2 (1995): populationgenetics software for exact tests and ecumenicism. **Heredity** 86: 248-9.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution** 43: 223-225.
- Romana-Eguia, M.R.R., M. Ikeda, Z.U. Basiao and N. Taniguchi. 2005. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites. **Aquac. Res.** 36: 69-78.
- Rutkowski, R., I. Olejniczak., P. Boniecki., A. Tereba., M. Cybulska and A. parys. 2007. Cross-species amplification of microsatellite loci in *Orchesella flavescens* (Apterygota: Collembola)*. **Genus.** 14: 59-62.
- Salgueiro, P., G. Carvalho, M.J. Collares-Pereira and M.M. Coelho. 2003. Microsatellite analysis of genetic population structure of the endangered cyprinid *Anaecypris* in Portugal: implications for conservation. **Biol. Conser.** 109: 47–56.
- Schlotterer, C and C. Tautx. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucl. Acids Res.** 0: 211-215.
- Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. **ARLEQUIN** Version 2.0 A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

- Sekino, M., M. Hara and N. Taniguchi. 2002. Genetic diversity within and between hatchery strains of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* assessed by means of microsatellite and mitochondrial DNA sequencing analysis. **Aquaculture** 213: 101-122.
- So, N., G.E. Maes and F.A. Volckaert. 2006. High genetic diversity in cryptic populations of the migratory sutchi catfish *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong River. **Heredity** 96 (2): 166 - 174.
- Sokal, R.R and F.J. Rohlf. 1969. **Biometry; The Principles and Practice of Statistic in Biological Research**. W.H. Freeman and Company, New York.
- Spruell, P., A.R. Hemmingsen, P.J. Howell, N. Kanda and F. Allendorf. 2003. Conservation genetics of bull trout: Geographic distribution of variation at microsatellite loci. **Conserv. Genet.** 4: 17-29.
- Taggart, J.B., R.A. Hynes, P.A. Prodöhl and A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. **J. Fish Biol.** 40: 963 - 965.
- Thai, B.T., C.P. Burridge and C.M. Austin. 2007. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Vietnam using four microsatellite loci. **Aquaculture** 269: 174 - 186.
- Weber, J.L And C. Wong. 2003. Mutation of human short tandem repeats. **Hum. Mol. Genet.** 2: 1123 - 1128.
- Wenburger, J.K., P. Bentzen and C.J. Foote. 1998. Microsatellite analysis of genetic population structure in an endangered salmonid : the coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*). **Mol. Ecol.** 7: 733-749.
- Weir, B.S and C.C. Cockerham. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** 38 (6): 1358-1370.

- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. **Ann. Eugen.** 15: 313-354.
- _____. 1978. **Evolution and the Genetics of Populations**, Vol. 4, Variability Within and Among Natural Population, University of Chicago Press, Chicago.
- Xu, Z., J.H. Primavera., L.D. de la Pena., P. Pettit., J. Belak and A. Alcivar-Warren. 2001. Genetic diversity of wild and cultured Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. **Aquaculture** 199: 13-40.
- Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle. 1999. **POPGENE** version 1.31. Microsoft window-based software for population genetics analysis, University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารเคมี

การทำ Agarose gel electrophoresis (เสาวนีย์, 2536)

การเตรียมสารเคมี

1. บัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 10 เท่า

ผสม Tris base 108 กรัม, กรดโบริก 55 กรัม และ 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 40 ml เข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วยกรด HCl นำไปฆ่าเชื้อใน autoclave เก็บที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำมาใช้งานให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนบัฟเฟอร์ TBE 10 เท่าต่อน้ำกลั่นเป็น 1 ต่อ 9

2. Loading buffer

ผสม 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF และ 30% glycerol เข้าด้วยกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3. สีย้อม ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 µg/ml

ผสม ethidium bromide 250 µg เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 ml กวนให้สีละลายด้วยเครื่อง magnetic stirrer นำไปเก็บไว้ในภาชนะที่บดแสงที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการ

1. ประกอบถาดหล่อเจลเข้ากับซี่หวี (comb) เพื่อให้เจลที่แข็งตัวมีช่อง (wells) ซึ่งใช้สำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ

2. ชั่งอะกาโรส (USB, Spain) 0.6 g ใสลงในพลาสติก และเติมบัฟเฟอร์ 1X TBE ปริมาตร 40 ml จะได้อะกาโรสความเข้มข้น 1.5%

3. ละลายอะกาโรสโดยนำเข้าไมโครเวฟนานประมาณ 1 นาที เมื่อเดือดให้นำออกมาเขย่าให้เข้ากันแล้วนำเข้าไมโครเวฟอีกครั้ง ทำซ้ำดังกล่าวอีก 2-3 ครั้ง จนกระทั่งอะกาโรสละลายจนเป็นสารละลายใส

4. ปล่อยสารละลายเจลทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุ่น นำไปเทลงบนถาดหล่อเจลโดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น ทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัวและเย็น

5. ดึงซี่หวีออกจากเจล ค่อย ๆ ดึงแผ่นเจลขึ้น นำไปวางใน eletrophoresis chamber โดยหันด้านช่องหยอดตัวอย่างไปทางขั้วลบ
6. เติมนัฟเฟอร์ 1 X TBE เติมลง eletrophoresis chamber จนท่วมผิวหน้าเจลขึ้นมาประมาณ 2 mm
7. ผสม loading dye กับตัวอย่างดีเอ็นเอ หรือดีเอ็นเอมาตรฐาน อัตราส่วน 2.0: 10 μ l บนแผ่นพาราฟิน ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างขึ้นลง 3 – 4 ครั้ง แล้วนำไปหยอดลงในช่องหยอดตัวอย่าง
8. ปิดฝา eletrophoresis chamber ต่อขั้วไฟฟ้า แล้วเปิดสวิทช์ปล่อยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100V โดยให้กระแสไฟฟ้าไหลจากขั้วลบไปหาขั้วบวกตามความยาวของแผ่นเจล
9. สังเกตสีของ loading dye เมื่อสีเคลื่อนที่ไปจนถึงด้านปลายของแผ่นเจลให้หยุดปล่อยกระแสไฟฟ้า
10. นำแผ่นเจลออกไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่านาน 15 นาที (ระวังไม่ให้เอธิเดียมโบรไมด์โดนร่างกาย)
11. นำแผ่นเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต และถ่ายรูปแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยใช้ Gel document (Gene Genius)

Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

สารละลาย

1. 40% acrylamide gel (19:1) (1,000 ml)

acrylamide gel	380	g
bis- acrylamide	20	g

2. 4.5% acrylamide gel (1,000 ml)

40% acrylamide gel (19:1)	112.5	ml
5X TBE	200	ml
Urea	450	g

3. 4.5% denaturing acrylamide gel

acrylamide gel (1,000 ml)	50	ml
TEMED	70	μl
10% APS	250	μ l

การเตรียมกระจก

1. ทำความสะอาดแผ่นกระจก และ chamber โดยเช็ดทำความสะอาดแผ่นกระจกด้วย 95% เอทานอล จำนวน 3 ครั้ง ด้วยกระดาษ Kimwiped[®] จนกระทั่งกระจกแห้ง จากนั้นเช็ดด้วย gas bond เพื่อช่วยให้เจลติดแผ่นกระจก และเช็ดกระจกด้วยเอทานอล 95% อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นเช็ดทำความสะอาด chamber ด้วยเอทานอล 95% อีกครั้ง และเช็ดด้วยน้ำยาเช็ดกระจก (clear view) 1 ครั้ง เพื่อป้องกันไม่ให้เจลติด chamber
2. ประกอบแผ่นกระจกเข้ากับ chamber โดยคั่นด้วย spacer ซึ่งทำให้เกิดช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกและ chamber
3. เทสารละลายเจลลงในแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ โดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น แล้วสอด shark's tooth plate ทางด้านเรียบลงในสารละลายเจลที่อยู่ระหว่างกระจก ให้ความลึกประมาณ 0.5 cm
4. ทิ้งเจลไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิด polymerization ไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง

การแยกขนาดแถบดีเอ็นเอ

1. ดึงซี่หวีออก และประกอบกระจกเข้ากับเครื่อง แล้วสอด shark's tooth plate ด้านปลายแหลมเข้าไปด้านบนของเจลให้ปลายแหลมของซี่หวีแตะที่ผิวเรียบของเจลพอดี
2. ผ่านกระแสไฟฟ้า 100 วัตต์ ในเจล นานประมาณ 15-30 นาที
3. ทำให้ผลผลิตพีซีอาร์เสียสภาพโดยให้ความร้อนที่ 95°C นานประมาณ 3 นาที และแช่บนน้ำแข็งทันที
4. ทำความสะอาดช่องหยอดตัวอย่างด้วย 10X TBE ก่อนหยอดตัวอย่าง จากนั้นหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 3 μ l ลงในช่องหยอดตัวอย่าง
5. ผ่านกระแสไฟฟ้า 60 วัตต์ ในเจล นานประมาณ 1-2 ชั่วโมง
6. ตรวจสอบผลการแยกแถบดีเอ็นเอด้วย staining ต่อไป

การย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining

สารเคมี

1. staining solution (1,000 ml)

silver nitrate	1	g
3.7% formaldehyde	1.5	ml

2. developing solution (1,000 ml)

Anhydrous Na_2CO_3	30	g
3.7% formaldehyde	1.5	ml
10 mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	200	μ l

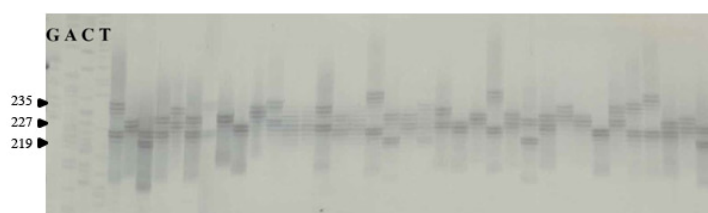
วิธีการ

1. นำแผ่นกระจกวางลงในถาดสำหรับการย้อม โดยให้ด้านหน้าเจลหงายขึ้น
2. ตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นเจลด้วย 10% gracial acetic acid นาน 20 นาที โดยเขย่าถาดย้อมตลอดเวลา
3. ล้างเจลด้วยน้ำเปล่า 3 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที โดยเขย่าถาดย้อมตลอดเวลา
4. ย้อมเจลด้วย staining solution ปริมาณ 1 ลิตร นาน 30 นาที โดยเขย่าถาดย้อมตลอดเวลา
5. ล้างด้วยน้ำเปล่า 1 ครั้ง โดยให้น้ำผ่านเจลแล้วเททิ้งทันที โดยขั้นตอนนี้ไม่ควรทำเกิน 10 วินาที
6. ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยแช่แผ่นกระจกใน developing solution ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 ลิตร เขย่าจนเห็นแถบดีเอ็นเอ
7. จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution (10% gracial acetic acid ที่ใช้ในข้อ 2) นาน 2-3 นาที
8. ล้างด้วยน้ำเปล่าอีก 2 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที โดยเขย่าถาดย้อมตลอดเวลา
9. ผึ่งกระจกให้แห้งก่อนนำกระจกไปอ่านผล

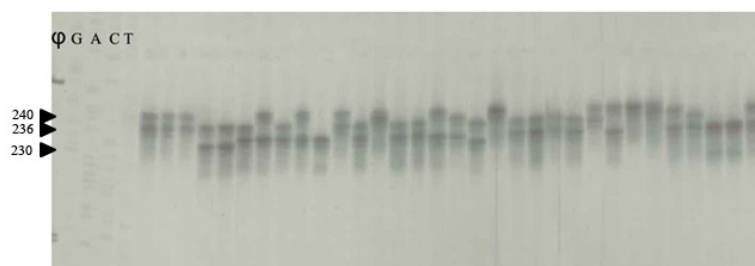
ภาคผนวก ข

ภาพแถบ microsatellite DNA จากการศึกษา

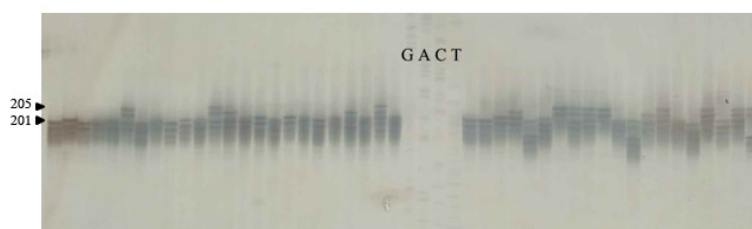
Pg-1



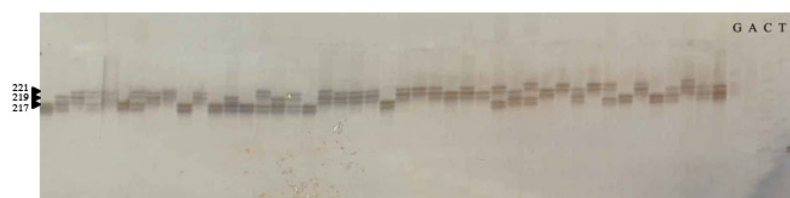
Pg-2



Pg-3



Pg-13



Pg14



ภาพผนวกที่ ข1 แสดงแถบ microsatellite DNA ที่ได้จากไพรเมอร์ *Pg-1*, *Pg-2*, *Pg-3*, *Pg-13* และ *Pg-14* (A, G, C, T = M13 sequence)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวทักษิณา เหมยคำ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	6 สิงหาคม พ.ศ.2525
สถานที่เกิด	เชียงใหม่
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(การประมง) มหาวิทยาลัยนเรศวร
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-