



วิทยานิพนธ์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*)
ในประเทศไทย

GENETIC DIVERSITY OF *Pangasius larnaudii* IN THAILAND

นางสาวจิตรารักษ์ ฟองอิสสระ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) ในประเทศไทย

Genetic Diversity of *Pangasius larnaudii* in Thailand

นามผู้วิจัย นางสาวจิตรภรณ์ ฟองอิสสระ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์วงศ์ปฐม กมลรัตน์, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุภาวดี พุ่มพวง, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วราห์ เทพาคูดี, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจจงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) ในประเทศไทย

Genetic Diversity of *Pangasius larnaudii* in Thailand

โดย

นางสาวจิตราภรณ์ ฟองอิสสระ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2550

จิตรภรณ์ ฟองอิสสระ 2550: ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเทโพ
(*Pangasius larnaudii*) ในประเทศไทย ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D. 86 หน้า

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) ทั้ง 11 แหล่ง ได้แก่ แม่น้ำเจ้าพระยา 6 แหล่ง แม่น้ำโขง 3 แหล่ง และจากโรงเพาะฟัก 2 แหล่ง โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ ไพเรเมอร์ทั้งหมด 5 ตำแหน่ง ได้แก่ Pg-2*, Pg-3*, Pg-6*, Pg-13* และ Pg-20* จากผลการศึกษาพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติมีค่าปานกลาง เมื่อเปรียบเทียบกับประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำโขง ($A = 6.6-8.0$; $A_c = 4.1-5.7$; $A_r = 4.7-6.1$; $H_o = 0.599-0.700$) และแม่น้ำเจ้าพระยา ($A = 5.4-9.4$; $A_c = 3.5-6.4$; $A_r = 4.0-5.5$; $H_o = 0.596-0.756$) ส่วนประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักทั้งสองมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยกว่าประชากรปลาเทโพจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในแง่ความหลากหลายของอัลลีล ในขณะที่ค่า H_o ไม่มีความแตกต่างกัน ประชากรปลาเทโพทุกประชากรอยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ($P > 0.05/55$) และคู่ประชากรส่วนใหญ่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ($P < 0.05/40$) จากค่าเฉลี่ย F_{ST} (0.062; CI=0.038-0.094) แสดงให้เห็นว่าประชากรปลาเทโพมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรระดับปานกลาง ในประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติค่าระยะห่างทางพันธุกรรมพบสูงสุดในคู่ประชากรจังหวัดเชียงรายและพนมเปญ (0.111) และต่ำสุดในคู่ประชากรจังหวัดชัยนาทและปทุมธานี-2 (0.025) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางพันธุกรรมและระยะทางทางภูมิศาสตร์ จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยาทั้งหมดแยกออกเป็น 1 กลุ่ม ในขณะที่ประชากรจากแม่น้ำโขง (พนมเปญ) จัดอยู่กลุ่มเดียวกับประชากรจากโรงเพาะฟักทั้งสองและประชากรจังหวัดเชียงรายจัดแยกออกนอกกลุ่ม จากผลการศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวางแผนอนุรักษ์และการจัดการประมงของปลาเทโพในประเทศไทยต่อไป

Jitraporn Fongissara 2007: Genetic Diversity of *Pangasius larnaudii* in Thailand.
Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of
Aquaculture. Thesis Adviser: Professor Uthairat Na-Nakorn, Ph.D. 86 pages.

The genetic diversity and genetic structure of 11 populations of Black Ear catfish (*Pangasius larnaudii*), six from the Chaopraya river basin, three from the Mekong river basin and 2 hatchery stocks, were assessed using five microsatellite primers (*Pg-2**, *Pg-3**, *Pg-6**, *Pg-13** and *Pg-20**). The results showed that genetic variation of the wild populations was moderate and comparable to those of Mekong populations ($A = 6.6-8.0$; $A_e = 4.1-5.7$; $A_r = 4.7-6.1$; $H_o = 0.599-0.700$) and Chaophraya populations ($A = 5.4-9.4$; $A_e = 3.5-6.4$; $A_r = 4.0-5.5$; $H_o = 0.596-0.756$). The two hatchery populations showed less genetic diversity than wild populations in terms of allelic diversity, while H_o was not different. All populations were in Hardy-Weinberg Equilibrium ($P > 0.05/55$) and most population pairs showed significant genetic differentiation ($P < 0.05/40$). The average F_{ST} value (0.062; $CI = 0.038-0.094$) indicated that genetic differentiation among populations was moderate. Among wild populations, the highest genetic distances were observed between Chiangrai and Pnom Pehn (0.111) and the smallest distances were observed between Pathumthanee-2 and Chainat (0.025); there was no correlation between genetic distance and geographical distance. A neighbor joining dendrogram placed all of the Chaophraya populations in one group while a population from Mekong River (Pnom Pehn) was clustered with the two hatchery populations and a population from Chiangrai was separated as an outgroup. The genetic information from this study is useful for conservation and fishery management of Black Ear catfish in Thailand.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อุทัยรัตน์ ณ นคร ประธานกรรมการที่ปรึกษา ดร. วงศ์ปฐม กมลรัตน์ กรรมการวิชาเอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาวดี พุ่มพวง กรรมการวิชาการ เป็นอย่างสูงในการให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางเพื่อความถูกต้องสมบูรณ์ ตลอดจนให้กำลังใจ และแก้ไขทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ อีกทั้งขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีรพล ศิริณฤมิตร ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ให้ความกรุณาช่วยเหลือแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ครบถ้วนมากยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ ต้องขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง สำหรับการให้การสนับสนุนงบประมาณโดยทุนพัฒนาบุคลากรระดับปริญญาโท-เอก (Master and Ph.D Graduate scholarship) ประจำปี 2546 จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ยังได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลอีกหลายท่าน คือ คุณศรีจรรยา สุขมนโนมนต์ คุณฉัฐพงษ์ ปานขาว คุณชวิน ตันพิทยคุปต์ ตลอดจนพี่ ๆ น้อง ๆ ที่ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ ผู้ซึ่งให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้คำปรึกษาในการวิจัย อีกทั้งพี่ดีและพี่แกละที่คอยช่วยเก็บตัวอย่างปลาเทโพ

ขอกราบขอบพระคุณ มารดา ที่กรุณาให้โอกาสในการศึกษาต่อและคอยให้กำลังใจ ห่วงใยให้การสนับสนุน ทั้งนี้ขอประโยชน์อันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ร่วมเป็นความสำเร็จของท่านทั้งหลาย ที่ได้เอื้อนามข้างต้นด้วยเช่นกัน

จิตราภรณ์ ฟองอิสสระ

มีนาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
ตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	17
ผลการทดลอง	29
วิจารณ์ผลการทดลอง	55
สรุปผลการทดลอง	62
ข้อเสนอแนะ	63
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	64
ภาคผนวก	75

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงตัวอย่างของประชากร ชื่อย่อประชากร จำนวนตัวอย่าง สถานที่เก็บตัวอย่าง ปลาเทโพที่ใช้ในการศึกษา	19
2	แสดงหมายเลข GenBank Accession ไมโครเซทเทลโลไทป์ไพรเมอร์ของปลาบึก ตำแหน่ง ลำดับเบสของไพรเมอร์ อุณหภูมิ Annealing ($^{\circ}\text{C}$) และขนาดผลผลิตพีซีอาร์ (bp) ทั้ง 5 ตำแหน่ง	21
3	แสดงสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR	29
4	แสดงการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไมโครเซทเทลโลไทป์ ทั้ง 5 ตำแหน่ง	30
5	แสดงความถี่อัลลีลของไมโครเซทเทลโลไทป์ 5 ตำแหน่ง ในประชากรปลาเทโพ	31
6	แสดงการทดสอบสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในประชากรปลาเทโพ 11 ประชากรก่อน ปรับยีนไทป์	41
7	แสดงการทดสอบสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในประชากรปลาเทโพ 11 ประชากรหลัง ปรับยีนไทป์	42
8	แสดงการทดสอบ Genotypic disequilibrium ในประชากรปลาเทโพ 11 ประชากร (P -value)	43
9	ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปลาเทโพ 11 ประชากร จำนวนอัล ลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง Allelic richness ค่าเฉลี่ย Effective number of allele ค่าเฉลี่ยเฮต เทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) และจากการคาดหมาย (H_e)	45
10	แสดงค่าสัมประสิทธิ์เอฟในแต่ละตำแหน่งของประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติทุก ประชากร	46
11	แสดงค่าสัมประสิทธิ์เอฟในแต่ละตำแหน่งของประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำ เจ้าพระยา	47
12	แสดงค่าสัมประสิทธิ์เอฟในแต่ละตำแหน่งของประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำโจง	47
13	ค่าความน่าจะเป็น (p -value) ของการทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากร (Genic differentiation) ปลาเทโพ 8 ประชากร	48

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
14	แสดงค่าความแปรปรวนโดยการวิเคราะห์ AMOVA ระหว่างประชากรและภายในประชากรปลาเทโพจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 9 ประชากร	49
15	แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (ด้านล่าง) และระยะทางทางภูมิศาสตร์ (กิโลเมตร) (ด้านบน) ของประชากรปลาเทโพ 8 ประชากร	51
16	แสดงผล assignment test ของประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักทั้ง 2 ประชากร	52

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงจุดเก็บตัวอย่างปลาเทโพ	20
2	แสดงการกระจายความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลต์ที่ตำแหน่ง Pg-2* ในประชากรปลาเทโพ	35
3	แสดงการกระจายความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลต์ที่ตำแหน่ง Pg-3* ในประชากรปลาเทโพ	36
4	แสดงการกระจายความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลต์ที่ตำแหน่ง Pg-6* ในประชากรปลาเทโพ	37
5	แสดงการกระจายความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลต์ที่ตำแหน่ง Pg-13* ในประชากรปลาเทโพ	38
6	แสดงการกระจายความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลต์ที่ตำแหน่ง Pg-20* ในประชากรปลาเทโพ	39
7	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางพันธุกรรมและระยะทางทางภูมิศาสตร์ของคู่ประชากรปลาเทโพจากลุ่มน้ำเจ้าพระยา	50
8	แสดงแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพ 8 ประชากร	53
9	Multidimensional scaling แสดงแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาเทโพทั้ง 8 ประชากร	54
10	แสดงการอพยพของปลาเทโพ (<i>Pangasius larnaudii</i>) จากแม่น้ำโขง	60
ภาพผนวกที่		
1	แสดงการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์ในครอบครัวปลาเทโพ	82
2	แสดงฮิโนไทป์ของประชากรปลาเทโพในแต่ละตำแหน่ง	84

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) ในประเทศไทย

Genetic Diversity of *Pangasius larnaudii* in Thailand

คำนำ

ปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) เป็นปลาพื้นเมืองของไทยที่พบแพร่กระจายทั่วไปตามแม่น้ำสาขาและแม่น้ำสายสำคัญ เช่น แม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำโขง เป็นปลาไม่มีเกล็ดที่มีขนาดใหญ่ รูปร่างคล้ายปลาสาวย ลักษณะเด่นที่สำคัญ คือ จุดสีดำขนาดใหญ่ที่อยู่เหนือบริเวณครีบหู ปลาเทโพจัดอยู่ในครอบครัวเดียวกันกับปลาสาวย ปลาเผาะ ปลาสังกะวาด และปลาเทพา เป็นต้น ปลาเทโพเป็นปลาที่มีรสชาติดีและมีมันมาก จึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภค

จากสถิติการประมงในปี 2544 ปริมาณสัตว์น้ำจืดที่จับได้ทั้งหมด (รวมเพาะเลี้ยง) ในกลุ่ม catfish (สาวย-เทโพ) มีปริมาณประมาณ 14.5 พันตัน และปริมาณการจับเพิ่มสูงขึ้นเป็น 33.7 พันตัน ในปี 2547 (สถิติการประมงแห่งประเทศไทย, 2547) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นปลาที่ต้องการของตลาดมาก ทำให้ปริมาณการจับสูงขึ้นทุกปี ซึ่งการจับที่เพิ่มขึ้นนี้จะส่งผลกระทบต่อจำนวนปลาเทโพในแหล่งน้ำธรรมชาติ ทำให้ความชุกชุมลดลงได้ จากแนวโน้มดังกล่าว จะเห็นได้ว่าประชากรของปลาเทโพในธรรมชาติกำลังประสบกับปัจจัยคุกคามเพิ่มขึ้น นอกเหนือจากการเสื่อมโทรมของถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติแล้ว ยังได้รับผลกระทบจากการจับที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น และยังมีเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากประชากรในโรงเพาะฟักในอนาคตอันใกล้นี้ ในปัจจุบันสามารถรวบรวมลูกพันธุ์ปลาเทโพจากธรรมชาติ นำมาเลี้ยงในกระชังประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดีและมีแนวโน้มเป็นปลาเศรษฐกิจชนิดใหม่ (ศุภรัตน์, 2538) แต่ในการรวบรวมลูกพันธุ์จากธรรมชาติ นอกจากจะได้ปริมาณที่ไม่แน่นอนแล้ว ยังไม่สามารถปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะตามที่ต้องการได้ กรมประมงจึงได้ทำการเพาะเลี้ยงปลาเทโพในโรงเพาะฟัก ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของปลาเทโพในแหล่งน้ำธรรมชาติจึงเป็นสิ่งจำเป็น ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลเพื่อการวางแผนอนุรักษ์และนำมาใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนต่อไป

เครื่องหมายทางพันธุกรรมจึงได้เข้ามามีบทบาทสำคัญ ในการใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร โดยเฉพาะเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ซึ่งมีการแสดงออกในลักษณะข่มร่วม มีความผันแปรสูงและพบกระจายอยู่ทั่วจีโนมของสิ่งมีชีวิต (De Woody and Avise, 2000) จึงนิยมใช้อย่างแพร่หลาย สามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำได้ผลดี และสามารถประเมินผลกระทบของปลาจากโรงเพาะฟักที่มีต่อพันธุกรรมปลาในธรรมชาติได้เนื่องจากมีความผันแปรสูง ดังนั้น ข้อมูลพื้นฐานที่ได้จักเป็นประโยชน์ต่อการบริหารการประมง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวางแผนอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติอันมีค่านี้ให้คงอยู่และเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเทโพในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพในประเทศไทย
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพในโรงเพาะฟักกับประชากรปลาเทโพในธรรมชาติ

ตรวจเอกสาร

ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็น 1 ใน 3 องค์ประกอบของความหลากหลายทางชีวภาพ (biological diversity หรือ biodiversity) ซึ่งประกอบด้วย

- 1) ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity)
- 2) ความหลากหลายของชนิด (species diversity)
- 3) ความหลากหลายทางนิเวศวิทยา (ecological diversity)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในสิ่งมีชีวิตและการสนับสนุนของสภาพแวดล้อมหรือนิเวศวิทยาที่หลากหลายจะนำไปสู่การแยกชนิด (speciation) ส่งผลให้เกิดความหลากหลายของชนิดขึ้นอย่างมากมาย ด้วยเหตุนี้ การแปรเปลี่ยนหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมจึงเป็นต้นเหตุหลักของการเกิดความหลากหลายทางชีวภาพ (วิสุทธิ, 2540)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญของสิ่งมีชีวิต ซึ่งประกอบด้วยความแปรผันของยีนหรือหน่วยทางพันธุกรรม ความผันแปรนี้สามารถตรวจสอบได้จากความหลากหลายของอัลลีลและอีโนไทป์ในกลุ่มของประชากรหรือในสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ถ้าที่ได้จะแสดงถึงระดับของความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากร ในสิ่งมีชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ธรรมชาติจะรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร โดยการเกิดรีคอมบิเนชัน (recombination) ซึ่งมีการแลกเปลี่ยนและสลับที่รวมตัวกันของยีนในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis)

ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร เกิดเมื่อสมาชิกของแต่ละประชากรมีการแยกตัวออกจากประชากรเดิมและลดการถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างประชากร จนเป็นเหตุให้ความถี่อัลลีลของประชากรเปลี่ยนแปลงไป ต่อมาประชากรที่แยกจากกันจะมีลักษณะของวิวัฒนาการที่แตกต่างออกไปตามสภาพแหล่งที่อยู่อาศัย เพื่อที่จะเอื้ออำนวยให้สิ่งมีชีวิตสามารถดำรงชีวิตให้สอดคล้องกับสภาพการของสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ ดังนั้นความหลากหลายทาง

พันธุกรรมจึงเป็นรากฐานสำคัญของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีค่าต่อการอนุรักษ์ และนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป (Hedrick, 2000; Frankham *et al.*, 2002)

ประชากร หมายถึง กลุ่มของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ที่มีการผสมพันธุ์และแลกเปลี่ยนยีนกัน ภายในกลุ่ม ซึ่งเกิดขึ้นในเวลาและสถานที่เดียวกัน (Hedrick, 2000) การศึกษาโครงสร้างของประชากร หมายถึง การศึกษาถึงแบบแผนความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน โดยมุ่งเน้นที่จะศึกษาว่าสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ แยกออกเป็นประชากรย่อยๆ หรือไม่ ประชากรเหล่านี้มีพันธุกรรมแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรมากน้อยเพียงใด ประชากรนั้นอยู่ในสมดุลหรือไม่ ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงจากสภาพสมดุล ความเปลี่ยนแปลงนั้นเกิดจากสาเหตุใด (May and Krueger, 1990)

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้โครงสร้างของประชากรเปลี่ยนแปลงไป ได้แก่

1. การคัดเลือก (selection) เป็นปัจจัยเดียวที่ได้รับอิทธิพลมาจากสภาพแวดล้อม โดยการคัดเลือกจากธรรมชาตินี้จะส่งผลต่อความผันแปรทางพันธุกรรมในแง่ที่จะไปเพิ่มความถี่ของอัลลีลที่เป็นประโยชน์ต่อการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมนั้นๆ

2. การอพยพ (migration) หรือการถ่ายเทของยีนระหว่างประชากร ทำให้ความถี่อัลลีลของประชากรเปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนความแตกต่างของอัลลีลจากประชากรที่มีการอพยพเข้าและประชากรดั้งเดิม นอกจากนี้การอพยพจะช่วยลดความแตกต่างระหว่างประชากรอันเนื่องมาจากการกลาย การคัดเลือก และการขาดช่วงทางพันธุกรรม

3. การขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) เป็นการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนในแต่ละชั่วอายุโดยมีทิศทางไม่แน่นอน เกิดจากการที่พ่อแม่พันธุ์ที่มีส่วนร่วมในการผสมพันธุ์สร้างประชากรในชั่วอายุต่อมาไม่เป็นตัวแทนของยีนไทป์ต่างๆ ในสัดส่วนเท่ากับที่มีอยู่ในประชากรเดิม มีผลให้ความถี่ของยีนแตกต่างจากประชากรเดิมโดยไม่สามารถคาดการณ์ได้ การขาดช่วงทางพันธุกรรมจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง โดยลดจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งและจะมีผลกระทบในประชากรที่มีขนาดเล็กชัดเจนกว่าประชากรขนาดใหญ่ (อุทัยรัตน์, 2543)

4. การกลาย (mutation) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกันไป ก็มีจุดเริ่มต้นมาจากการกลาย แต่อัตราการเกิดการกลายต่ำมากและต้องอาศัยระยะเวลาที่ยาวนาน โดยต้องใช้เวลาเป็นพันหรือล้านชั่วรุ่นในการทำให้เกิดความผันแปรในยีนหนึ่งตำแหน่ง ดังนั้นการกลายจึงส่งผลน้อยมากต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากรในช่วงเวลาสั้นๆ (Frankham *et al.*, 2002)

ค่าที่บอกความหลากหลายทางพันธุกรรม

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร ต้องสุ่มตัวอย่างยีนจำนวนหนึ่ง จากจำนวนทั้งหมดมาศึกษาและวิเคราะห์ค่าความผันแปรของพันธุกรรมในประชากรนั้น (วิสุทธิ, 2536) ข้อมูลความถี่ของยีนและความถี่โนโทพ์ของประชากรนำไปคำนวณค่าที่แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากรเหล่านั้นได้ ดังนี้

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

1. จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (average number of allele per locus, A) คำนวณจากผลรวมของจำนวนอัลลีลทั้งหมดทุกตำแหน่งแล้วหารด้วยจำนวนตำแหน่งยีนทั้งหมดที่ทำการศึกษา (Hedrick, 2000) จำนวนอัลลีลสามารถใช้ในการติดตามผลกระทบจากการเกิดสภาวะคอขวด (bottleneck) และติดตามการเกิด genetic drift ได้ดี เนื่องจากการเกิด genetic drift จะทำให้อัลลีลที่มีความถี่ต่ำ (rare allele) สูญหายไป (Allendorf and Phelps, 1980) โดยประชากรที่มีจำนวนอัลลีลน้อยจะทำให้ความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมลดน้อยลง จนนำไปสู่การผสมเลือดชิด (inbreeding) ภายในประชากร ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อความสามารถในการสืบพันธุ์และการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้จำนวนอัลลีลยังใช้ในการติดตามการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรขนาดเล็ก ได้ดีกว่าค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี (Allendorf, 1986; Frankham *et al.*, 2002)

2. Effective number of allele (A_e) เป็นค่าที่แสดงถึงจำนวนอัลลีลของพ่อแม่ที่สามารถผสมพันธุ์กันและถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ โดยค่านี้ใช้ในการเปรียบเทียบประชากรที่มีจำนวนและการกระจายตัวของอัลลีลแตกต่างกัน โดยปกติจะมีค่าน้อยกว่าจำนวนที่แท้จริง (actual number)

3. เฮตเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) เป็นค่าความถี่ของเฮตเทอโรไซโกต ต่อยีน 1 ตำแหน่ง ซึ่งจะคำนวณทั้งค่าจากการสังเกต (H_o) และจากค่าคาดหวัง (H_e) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีมีความสัมพันธ์กับขนาดประชากร โดยถ้ามีค่าต่ำแสดงว่าประชากรมีขนาดเล็ก ซึ่งค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีเป็นตัวชี้วัด genetic drift ที่ไม่คืนกลับ (Falconer, 1983) จากการศึกษาค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีด้วยเทคนิคไมโครแซตเทลไลท์ 75 ตำแหน่ง พบว่าค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีในปลาน้ำจืด 13 ชนิด ($H_e = 0.46$) มีค่าน้อยกว่าในปลาทะเล ($H_e = 0.79$) และปลากลุ่ม anadromous ($H_e = 0.68$) (DeWoody and Avise, 1999) นอกจากนี้ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจะบอถึงการอยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากร โดยการเปรียบเทียบค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตกับค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวัง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

1. ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient) เป็นค่าที่สำคัญในการศึกษาโครงสร้างของประชากร โดยค่านี้แสดงความสัมพันธ์ของอัลลีลภายในกลุ่มประชากร ซึ่งจะบ่งบอกว่ากลุ่มของประชากรนั้นๆ ได้แบ่งออกเป็นประชากรย่อยหรือไม่ (Wright, 1978) สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ อาจมีโครงสร้างประชากรเป็นแบบประชากรเดี่ยวขนาดใหญ่ หรือแบ่งออกเป็นประชากรย่อยที่มีการตัดขาดกันอย่างสิ้นเชิง หรือแบ่งเป็นประชากรย่อยที่อาจผสมข้ามประชากรบางโอกาส หรืออาจเป็นประชากรที่อยู่ในสภาพภูมิศาสตร์เดียวกันแต่ไม่มีการผสมข้ามประชากร หรือไม่เกิดการถ่ายเทยีนระหว่างประชากร หรืออาจมีหลายลักษณะปนกันไป

ค่าสัมประสิทธิ์เอฟมีทั้งหมด 3 แบบ ใช้ในการแบ่งความผันแปรทางพันธุกรรมออกเป็นระดับประชากรทั้งหมด (T), ประชากรย่อย (S) และในแต่ละตัวอย่าง (I) โดยมีทั้งหมด 3 ค่า คือ F_{ST} , F_{IT} และ F_{IS} โดยค่า F_{ST} เป็นค่าที่ใช้วัดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรย่อย มีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ส่วนค่า F_{IS} และ F_{IT} เป็นค่าที่บอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรย่อยและของประชากรทั้งหมด ค่านี้มีทั้งบวกและลบ หากเป็นบวกแสดงว่าเบี่ยงเบนไปในทางที่มีโฮโมไซโกตมากกว่าที่คาดหวัง (Wright, 1951)

2. ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เป็นค่าแสดงถึงจำนวนของอัลลีลที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละตำแหน่งหลังจากที่ประชากรทั้งสองเริ่มแยกออกจากกัน โดยจะบ่งบอกถึงความถี่และปริมาณการถ่ายเทยีนระหว่างประชากร หากความถี่อัลลีลของสองประชากรคล้ายคลึง

กัน ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมจะมีค่าเข้าใกล้ 1 และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเข้าใกล้ 0 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมนี้สามารถนำไปใช้สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic dendrogram) ได้ (Frankham *et al.*, 2002)

โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร

ในประชากรธรรมชาติความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างของประชากรนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยทางชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ สภาพแวดล้อมของแหล่งที่อยู่อาศัยและกระบวนการวิวัฒนาการ ได้แก่ การอพยพ (migration) การกลาย (mutation) การคัดเลือกโดยธรรมชาติ (natural selection) และการขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนในประชากรธรรมชาติ (Ayala, 1982; Slatkin, 1987)

การอพยพเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการถ่ายเทยีน (gene flow) จากประชากรที่มีการอพยพไปยังอีกประชากรหนึ่ง หากสิ่งมีชีวิตที่อพยพนั้นผสมพันธุ์กับประชากรท้องถิ่นนั้นๆ ซึ่งการถ่ายเทยีนมีแบบจำลอง (model) 3 รูปแบบ คือ continental-island, island และ stepping stone model (Halliburton, 2004) รูปแบบแรก คือ Continental-island เป็นรูปแบบการถ่ายเทของยีนจากประชากรขนาดใหญ่ที่อยู่ในทวีป (mainland) ไปยังประชากรเกาะ (island) ที่มีขนาดเล็กในทิศทางเดียว โดยความถี่อัลลีลของประชากรในเกาะจะได้อัลลีลจากความถี่อัลลีลจากประชากรในทวีป ซึ่งอัตราการเปลี่ยนแปลงความถี่อัลลีลจะขึ้นอยู่กับอัตราการถ่ายเทของยีน Island model เป็นรูปแบบการถ่ายเทยีนของประชากรจากแต่ละเกาะที่มีการอพยพไปยังอีกเกาะได้โดยสุ่ม ซึ่งอัตราการถ่ายเทยีนจะเป็นอัตราส่วนของอัลลีลจากแต่ละเกาะซึ่งได้มาจากที่ต่างๆ ในช่วงนั้น ส่วน stepping stone model เป็นรูปแบบที่ประชากรย่อยที่อยู่ใกล้กันสามารถแลกเปลี่ยนยีนกันได้ (Halliburton, 2004) โดยสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการกระจายตัวได้อย่างต่อเนื่อง ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรย่อยจะเพิ่มขึ้นตามระยะทางที่ประชากรย่อยทั้งสองนั้นแยกออกจากกัน เรียกว่า Isolation by distance (Wright, 1943)

ลักษณะทั่วไปและชีววิทยาบางประการของปลาเทโพ

ปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii* Bocourt, 1866) มีชื่อสามัญว่า black ear catfish จัดอยู่ในครอบครัว Pangasiidae เช่นเดียวกับปลาสวาย ปลาโพง ปลาเทพาและปลาบึก ปลาเทโพเป็นปลาน้ำจืดไม่มีเกล็ดขนาดใหญ่ชนิดหนึ่ง ในประเทศไทยพบแพร่กระจายทั่วไปตามแม่น้ำสายสำคัญ เช่น แม่น้ำโขง แม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำปิง แม่น้ำมูลและแม่น้ำสาขา มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามพื้นที่ต่างๆ เช่น ภาคกลางเรียกว่าปลาเทโพ ภาคเหนือเรียกปลาเต้า ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกปลาหุหมาดหรือปลาปิ้ง

ชวลิตและสมศักดิ์ (2536) ได้อธิบายลักษณะสำคัญของปลาเทโพ คือ หัวและจะงอยปากม่นปากอยู่ก่อนไปด้านล่างของจะงอย ฟันบนเพดานปากแบ่งเป็น 2 แถบ รูปโค้งยาวอยู่ห่างกัน ซึ่งกรงเหงือกสั้นมี 12-16 อัน รูปร่างป้อม สันหัวกว้าง ในปลาขนาดใหญ่ลำตัวส่วนท้องลึกถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของความยาวมาตรฐาน ปลายครีบหลัง ครีบอก ครีบท้อง และครีบกัน ขึ้นเป็นเส้นยาวเรียว ฐานครีบมีสองตอน ปลายของตอนท้ายขึ้นเป็นติ่งแหลมอยู่เลยช่องท้องถึงบริเวณเหนือฐานครีบกันตอนหน้า มีลักษณะเด่นคือ จุดสีดำขนาดใหญ่ที่บริเวณฐานครีบอก หัวและลำตัวมีสีเทาคล้ำอมน้ำตาล ด้านข้างมีสีเทาจาง ด้านท้องสีจางอมชมพู ครีบสีจาง ครีบกันมีแถบสีดำตามยาวและครีบหางมีแถบสีดำทั้งตอนบนและตอนล่าง แถบครีบหางมี 28-32 แถบและมีลักษณะฟันคล้ายกับปลาเทพา (Smith, 1945)

ปลาเทโพขนาดใหญ่ที่สุดมีความยาวถึง 1 เมตร เมื่อขนาดเล็กกินแมลงเป็นอาหารและเมื่อขนาดใหญ่ขึ้นกินได้ทั้งพืชและสัตว์ ทั้งที่มีชีวิตและตายแล้วเช่นเดียวกับปลาสวาย (วันเพ็ญ, 2528) ปลาเทโพที่อาศัยในแม่น้ำโขงจะมีการอพยพไปตอนบนของแม่น้ำโขง ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคม (Roberts, 1993) และวางไข่ในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคม ไข่ปลาเทโพมีลักษณะกลม สีเหลืองอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.23 มิลลิเมตร เป็นไข่ชนิดจมติดกับวัสดุ พัฒนาการคัพพะปลาเทโพใช้เวลา 22 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิน้ำ 27.5-29.0 องศาเซลเซียส พัฒนาการของปลาเทโพวัยอ่อนใช้เวลา 24-25 วัน จึงมีลักษณะเหมือนตัวเต็มวัย

ปลาเทโพเป็นปลาเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่เป็นที่นิยมและมีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายมาอย่างยาวนาน โดยปริมาณการจับปลาในกลุ่มสวาย-เทโพ (รวมเพาะเลี้ยง) ในช่วงปี พ.ศ. 2544-2547

พบว่ามีความประมาณ 14.5 พันตัน และปริมาณการจับเพิ่มสูงขึ้นเป็น 33.7 พันตัน (สถิติการประมงแห่งประเทศไทย, 2547) การเพาะพันธุ์ปลาเทโพเริ่มดำเนินการตั้งแต่ พ.ศ. 2535 โดยการรวบรวมปลาเทโพจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาเลี้ยงให้สามารถพัฒนาความสมบูรณ์เพศในสภาพบ่อเลี้ยงเพื่อนำมาเพาะขยายพันธุ์ ในปัจจุบันสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดศรีสะเกษประสบความสำเร็จในการเพาะพันธุ์ปลาเทโพจากพ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อดิน โดยการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ LHRHa (buserelin acetate) ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ domperidone (สมเกียรติและคณะ, 2544) ในการอนุบาลลูกปลาเทโพยังประสบปัญหาในเรื่องการอนุบาลให้มีอัตราการรอดที่สูง โดยเฉพาะในระยะที่เป็นลูกปลาวัยอ่อนอายุช่วง 3-10 วัน จะเกิดปัญหาการกินกันเองซึ่งจะเป็นพฤติกรรมที่พบในครอบครัว Pangasiidae

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในครอบครัว Pangasiidae

ปลาครอบครัว Pangasiidae (Suborder Siluroidei, Order Siluriformes) เป็นปลากลุ่ม catfish บางชนิดมีคุณค่าทางเศรษฐกิจทั้งด้านการตลาดและการส่งออก เช่น ปลาเผา (*P. bocourti*), *P. krempfi*, ปลาสายยู (*P. conchophilus*) และปลาเทโพ เป็นต้น พบแพร่กระจายในแม่น้ำโขง ประเทศไทย, พม่า, ลาว, กัมพูชา, มาเลเซีย, อินโดนีเซียและเวียดนาม ปลาในครอบครัว Pangasiidae มีทั้งหมด 30 ชนิด ใน 3 สกุล ได้แก่ สกุล *Pangasius*, *Helicophagus* และ *Pangasianodon* (Roberts and Vidthayanon, 1991; Pouyaud *et al.*, 1999)

Hogan and May (2002) ได้ทำการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากการรวมดีเอ็นเอของปลา Pangasiid catfish 3 ชนิด ได้แก่ ปลาเทโพ ปลาสายยู และปลาสังกะวาดทองคม (*P. pleurotaenia*) โดยพบสถานะหลากรูปของยีน ทั้งหมด 27 ตำแหน่ง ซึ่งไพรเมอร์ดังกล่าวเมื่อทดสอบกับปลาในครอบครัว Pangasidae ได้แก่ *Pangasius krempfi*, ปลาเผา ปลาสายยู ปลาสังกะวาดทองคม และสวายหนู (*Helicophagus waandersii*) พบว่าทั้ง 27 ตำแหน่ง จะเกิดสถานะหลากรูปของยีนอย่างน้อยในปลา 1 ชนิด และ 15 ตำแหน่ง ในปลาอย่างน้อย 3 ชนิด หรือมากกว่า ต่อมา Ngamsiri *et al.* (2006) ได้ทำการพัฒนาไพรเมอร์จากปลาบึกโดยใช้ (GT)₁₅ probe พบจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งมีค่าระหว่าง 1-4 ค่าเฉลี่ย H_e มีค่าระหว่าง 0.13-0.68 และไพรเมอร์นี้ยังสามารถใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาในกลุ่มนี้ได้อีก 4 ชนิด คือ ปลาเผา ปลาสายยู ปลาเทโพ และปลาเทพา

ต่อมา Na-Nakorn *et al.* (2006) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากดีเอ็นเอของปลาบึกทั้งหมด 10 คู่ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาบึกและประยุกต์ใช้เพื่อการอนุรักษ์ จากผลการวิเคราะห์ปลาบึกจากโรงเพาะฟัก ทั้ง 20 ตัวอย่าง พบว่าจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งเท่ากับ 6 และ $H_o = 0.05-0.95$; $H_e = 0.05-0.81$ ประชากรปลาบึกส่วนใหญ่อยู่ในสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ยกเว้นที่ตำแหน่ง *Pg-3* นอกจากนี้ไพรเมอร์ดังกล่าวยังสามารถนำไปใช้เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาในครอบครัวเดียวกัน ได้แก่ ปลาสวาย, ปลาเทโพ และปลาเทพา

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในกลุ่มนี้ยังมีไม่มากนัก So *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรปลาสวายและปลาเผาจากแม่น้ำโขงตอนล่าง ประเทศกัมพูชา ด้วย Restriction fragment polymorphism of mitochondrial DNA (mtDNA-RFLP) พบว่าโครงสร้างประชากรของปลาทั้งสองชนิดมีค่าต่ำ เนื่องจากมีการถ่ายเทของยีนระหว่างประชากรที่สูง และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรที่ต่ำ โดยประชากรปลาสวายมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าประชากรปลาเผา และจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าปลาสวายเริ่มเกิดสถานะคอขวด ต่อมา So *et al.* (2006) ได้ใช้ไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวาย บริเวณแหล่งวางไข่และแหล่งหากินในแม่น้ำโขงตอนล่างของประเทศกัมพูชา พบว่าปลาสวายมีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง ($H_e = 0.757$) กว่าปลาน้ำจืดชนิดอื่นๆ ในประชากรจากแหล่งวางไข่ (spawning site) พบความถี่โนโทพีเบียงเบนไปจากสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในทุกประชากร สาเหตุเกิดจากการปะปนกันของประชากรย่อยอื่น (admixture) และไม่พบการลดลงของขนาดประชากรในประชากรใดเลย

นอกจากนี้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากโรงเพาะฟัก Barua *et al.* (2004) ได้ใช้เทคนิค allozyme ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวายจากโรงเพาะฟัก 4 แห่ง ในประเทศบังคลาเทศ พบว่าค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของยีนหลากรูปแบบต่อประชากรมีค่าเท่ากับ 19.4% ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งและค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีมีค่าเท่ากับ 1.3 และ 0.060 ตามลำดับ จากแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถแบ่งประชากรปลาสวายออกเป็น 2 กลุ่มซึ่งไม่สัมพันธ์กับสภาพความเป็นจริงทางภูมิศาสตร์ โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรเท่ากับ 0.18 ประชากรจาก Anudan และ Brahmaputa มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง ในขณะที่ประชากรจาก Bhai-Bhai มีการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างสมบูรณ์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาแม่น้ำชนิดอื่น ได้แก่ การศึกษาโครงสร้างประชากรปลา *Brycon opalinus* ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่อาศัยอยู่ในลุ่มน้ำ Paraiba ประเทศบราซิล ใช้ตัวอย่างจากประชากรธรรมชาติ 7 ประชากร และจากโรงเพาะฟัก 1 ประชากร ศึกษาด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง พบสภาพหลากหลายของยีนในทุกตำแหน่งที่ทำการศึกษา ทั้งหมด 162 อัลลีล ค่าแฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) มีค่าระหว่าง 0.23 ถึง 1.00 และ F_{ST} มีค่า 0.043 และมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงว่าปลาชนิดนี้แบ่งออกเป็นประชากรย่อย จากการทดสอบระยะห่างทางพันธุกรรมของทุกคู่ประชากร (pairwise F_{ST}) พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมในทุกคู่ประชากรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าควรมีการจัดการในแต่ละหน่วยประชากรที่แตกต่างกัน เนื่องจากลุ่มน้ำ Paraiba เป็นลุ่มน้ำขนาดใหญ่ มีพื้นที่ลุ่มน้ำครอบคลุมถึง 57,000 ตารางกิโลเมตร การถ่ายเทของยีนระหว่างประชากรย่อยจึงเกิดขึ้นได้มาก จึงทำให้ปลา *B. opalinus* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง (Barroso *et al.*, 2005)

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลา European grayling (*Thymallus thymallus*) ในแม่น้ำ Danube, Main และ Elbe บริเวณ Bavaria ประเทศเยอรมันนี ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 20 ตำแหน่ง พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรมีค่าที่ต่ำและความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรมีค่าสูง F_{ST} เท่ากับ 0.394 เนื่องจากปลา European grayling มีความสามารถในการกระจายตัวต่ำ ในฤดูวางไข่จะมีการอพยพเพียง 10-15 กิโลเมตร และนอกฤดูวางไข่จะมีการแพร่กระจายประมาณ 1 กิโลเมตร จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ในแต่ละประชากรมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สูง (Gum *et al.*, 2003)

ในปลาแม่น้ำบางชนิดแหล่งที่อยู่อาศัยถูกปิดกั้นจากสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ ทำให้การถ่ายเทของยีนระหว่างประชากรปลาในแม่น้ำสายเดียวกันถูกจำกัด เช่น ในปลา jarabugo (*Anaocypris hispanica*) ซึ่งเป็นปลาในกลุ่ม cyprinid มีขนาดเล็ก อาศัยอยู่ในลุ่มน้ำ Guadiana แต่เมื่อ 30 ปีก่อน ลุ่มน้ำ Guadiana ถูกปิดกั้นทางตอนกลางและตอนล่างในประเทศโปรตุเกสและสเปน ทำให้จำนวนปลา jarabugo ลดลง Salgueiro *et al.* (2003) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากร ปลา jarabugo ทั้ง 8 แหล่ง ภายในลุ่มน้ำ Guadiana ประเทศโปรตุเกส ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 16 ตำแหน่ง พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างประชากรมีค่าสูง ($A = 14.4$, $H_o = 0.44-0.79$) ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรย่อย F_{ST} เท่ากับ 0.112 จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าขนาดประชากรปลา jarabugo ที่ลดน้อยลง และ

แหล่งที่อยู่อาศัยถูกแบ่งแยกเมื่อ 30 ปีก่อน ส่งผลกระทบน้อยมากต่อระดับความหลากหลายทางพันธุกรรม

นอกจากนี้ปลาที่อาศัยอยู่ตามทะเลสาบ ที่มีแหล่งที่อยู่อาศัยของปลาแต่ละประชากรแยกออกจากกันอย่างสิ้นเชิง (landlocked) เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลา Artic Char (*Salvelinus alpinus*) ในทะเลสาบทั้ง 12 แห่ง รัฐ Maine ประเทศสหรัฐอเมริกา ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรและความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรปลา Artic Char ($F_{ST} = 0.05-0.20$) มีค่าที่สูง จากการศึกษาแสดงว่าการที่แต่ละประชากรถูกปิดกั้นการถ่ายเทยีนระหว่างประชากรนั้น ส่งผลเพียงเล็กน้อยต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม (Bernatchez *et al.*, 2002)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (Microsatellite DNA) ประกอบด้วยการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำช่วงสั้นๆ (simple sequence repeats, SSRs) ประมาณ 1-6 bp ติดต่อกันไปเรื่อยๆ เป็นช่วงยาว ได้แก่ dinucleotide repeats มีลำดับเบสซ้ำชุดละ 2 bp เช่น CA และ GA trinucleotide repeats มีลำดับเบสซ้ำชุดละ 3 bp เช่น GTG และ tetranucleotide repeats มีลำดับเบสซ้ำชุดละ 4 bp เช่น GATA และ GACA เป็นต้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครแซทเทลไลท์ในปลาจะพบเบสซ้ำเฉลี่ยทุกๆ 10 kb (Wright, 1993) กระจายทั่วจีโนม และส่วนใหญ่มีตำแหน่งอยู่ในส่วนของ noncoding region ซึ่งความหลากหลายเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของจำนวนซ้ำ สาเหตุเกิดจากกระบวนการการเข้าสู่ผิดของลำดับเบส ในขณะที่มีการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (slipped-strand mispairing) โดยพบว่า dinucleotide repeat จะเกิดการกลายเร็วกว่า trinucleotide repeat และลำดับเบสที่มี AT สูง จะเกิดการกลายเร็วกว่าการมีลำดับเบส GC สูง (Schlotterer and Tautz, 1992) ลักษณะของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสามารถจำแนกได้ 3 ประเภทคือ perfect, imperfect และ compound repeats (Weber, 1990)

ข้อดีของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีการแสดงออกเป็นแบบข่มร่วม (codominant) มีสถานะหลากหลายของยีนที่สูง และมีการถ่ายทอดสู่รุ่นถัดไปเป็นไปตามกฎของเมนเดล (DeWoody and Avise, 2000)

ไมโครแซทเทลไลท์ไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์ที่พัฒนาในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง สามารถใช้เป็นไพร์เมอร์ให้กับอีกสิ่งมีชีวิตหนึ่งที่อยู่ในครอบครัวหรือสกุลเดียวกันได้ เนื่องจากในสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกันจะมีลำดับเบสที่เหมือนกัน (conserved sequence) เช่น การใช้ไมโครแซทเทลไลท์ในการศึกษาวิวัฒนาการของปลาในครอบครัว Centrarchidae โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์จากปลา bluegill ในการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของปลาในครอบครัวนี้ ได้แก่ ปลา pumpkinseed, largemouth bass, yellow perch และ northern pike (Neff *et al.*, 1999)

ไมโครแซทเทลไลท์ยังประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในสัตว์ที่มีความเสี่ยงที่จะสูญพันธุ์ เนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่มีระดับความหลากหลายสูง ใช้เนื้อเยื่อเพียงเล็กน้อยในการตรวจสอบ (Jarne and Lagoda, 1996; Beaumont and Bruford, 1999)

ข้อเสียของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ เริ่มแรกจะต้องทำการพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมของชนิดปลาที่ทำศึกษาก่อน ซึ่งใช้เวลาและค่าใช้จ่ายที่สูงและควรมีสถานที่พร้อมสำหรับการวิจัย

ปัญหาที่พบมากในการใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ ได้แก่ null allele เกิดจากอัลลลีนนั้นไม่ปรากฏหลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ สาเหตุเกิดจาก point mutation ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ไพร์เมอร์เกาะ ทำให้ไพร์เมอร์สายใดสายหนึ่งหรือทั้งสองสายไม่สามารถจับบริเวณดังกล่าว จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณอัลลลได้ ส่งผลให้อัลลลีนนั้นไม่ปรากฏบนแผ่นเจล ทำให้การอ่านข้อมูลผิดพลาดจากสเตเทอร์ไรโซโกตเป็นโฮโมไซโกต ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ตำแหน่งนั้นเบี่ยงเบนไปจากสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก โดยเบี่ยงเบนไปในทางที่มีโฮโมไซโกตมากกว่าคาดหมาย การเกิด null

allele นั้นพบได้ทั่วไปบ่อยครั้ง สามารถตรวจสอบได้โดย genotype-based statistics (เช่น F_{IS}) และการตรวจสอบการถ่ายทอดจากพ่อแม่สู่ลูก (Pemberton *et al.*, 1995; O'Reilly and Wright, 1995)

นอกจากนี้การที่บางอัลลีลสูญหายไปอาจเกิดจากอัลลีลขนาดใหญ่บางอัลลีลไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ทำอัลลีลขนาดเล็กในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Large allele dropout) สาเหตุเกิดจากดีเอ็นเอต้นแบบไม่มีคุณภาพ โดยใช้ตัวอย่างที่เก่า การเก็บรักษาตัวอย่างที่ไม่ดี มีสิ่งปนเปื้อนและมีปริมาณโปรตีนมาก ทำให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์ลดต่ำลง (O'Reilly and Wright, 1995) จากการศึกษาประชากรปลา Atlantic cod ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์พบว่าประชากรที่ไม่อยู่ในสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ที่ตำแหน่ง *Gmo141* สาเหตุเกิดจาก null allele โดยพบเฉพาะประชากรที่สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างจากกล้ามเนื้อแทนตัวอย่างจากเลือด ซึ่งใช้เทคนิคที่ง่ายและรวดเร็วกว่า ดังนั้นในการศึกษาที่ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอเก่า หรือคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดต่ำ ควรใช้ตำแหน่งที่มีอัลลีลขนาดเล็ก (<150 bp) เพื่อลดการผิดพลาดจากกระบวนการพีซีอาร์ (Bentzen *et al.*, 1996)

ในการศึกษาอีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลท์ (โดยเฉพาะ dinucleotide repeats) มักประสบปัญหาการเกิด stutter band ซึ่งสาเหตุเกิดจากกระบวนการเข้าสู่ผิดของลำดับเบสในขณะที่มีการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำให้ได้แถบของดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นเป็นปีนยาวหรือมีลักษณะเป็นแบบขั้นบันได ซึ่ง stutter band ที่เกิดขึ้นจะมีขนาดที่สั้นกว่าอัลลีลที่แท้จริง ซึ่งยากต่อการอ่านตำแหน่งและวิเคราะห์ลักษณะอีโนไทป์ที่แท้จริงของประชากร ทำให้อ่านข้อมูลผิดพลาดในการแยกโฮโมไซโกตออกจากเฮเทอโรไซโกต เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาที่จะเกิดขึ้นควรเลือกตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ที่มีลำดับเบสซ้ำแบบ trinucleotide และ tetranucleotide ซึ่งอ่านข้อมูลได้ง่ายกว่าเนื่องจากมีระยะห่างระหว่างอัลลีลมากกว่า และ stutter band เกิดขึ้นน้อยลงหากจำนวนเบสซ้ำเพิ่มมากขึ้น (O'Reilly and Wright, 1995; Liu and Cordes, 2004) เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์มักจะประสบปัญหาในการเพิ่มปริมาณตำแหน่งของดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างไม่จำเพาะ (nonspecific amplification) สาเหตุเกิดจากการจับตัวอย่างไม่จำเพาะของไพรเมอร์ (Liu and Cordes, 2004)

ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ สิ่งที่ต้องคำนึงถึง คือ หากตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ที่ทำการศึกษามีสภาวะหลากหลายรูปแบบของยีนที่สูง จำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาควรมีมากพอต่อการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่าง

ประชากร เพื่อให้แน่ใจว่าความแตกต่างของประชากรไม่ได้เกิดจากความผิดพลาดจากการสุ่ม (Liu and Cordes, 2004)

ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอใช้ในการศึกษาปลาแม่น้ำหลายชนิด เช่น แอตแลนติกซัลมอน, *Salmo salar* (McConnel *et al.*, 1995); เรนโบว์เทรัท, *Oncorhynchus mykiss* (Morris *et al.*, 1996); ปลาไน, *Cyprinus carpio* (Aliah *et al.*, 1999); ปลาคูยกษ์, *Clarias gariepinus* (Galbusera *et al.*, 1996); ปลาคูกอเมริกัน, *Ictalurus punctatus* (Waldbieser and Bosworth, 1997); ปลากดเหลือง, *Mystus nemurus* (Usmani *et al.*, 2003); ปลาคะเพียนขาว, *Puntius gonionotus* (Kamonrat, 1996); *Brycon opalinus* (Barroso *et al.*, 2005)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

รวบรวมปลาเทโพ 357 ตัวอย่าง จากแหล่งน้ำธรรมชาติ 9 แห่ง ได้แก่ แม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำสาขา 6 แห่ง ได้แก่ ประชากรจังหวัดพิษณุโลก, พิจิตร-1, พิจิตร-2, ชัยนาท, ปทุมธานี-1 และ ปทุมธานี-2 จากแม่น้ำโขงและแม่น้ำสาขา 3 แห่ง ได้แก่ ประชากรจังหวัดเชียงราย, อุบลราชธานี และพนมเปญ ประเทศกัมพูชา และประชากรจากโรงเพาะฟัก 2 แห่ง ได้แก่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดยโสธรและศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดอุบลราชธานี สถานที่เก็บและจุดเก็บจำนวนตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 1 และภาพที่ 1 ทำการเก็บตัวอย่างครีบบางปลาเทโพใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Ethanol ความเข้มข้น 95% จนท่วมตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Proteinase K/Phenol-Chloroform โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Taggart *et al.* (1992) โดยนำตัวอย่างครีบบางปลาเทโพประมาณ 50 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ 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 นำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำตัวอย่างที่ย่อยแล้วมาสกัดดีเอ็นเอโดยขั้นตอนแรกเติมสารละลาย Phenol (pH 8.0) ปริมาตร 400 μ l ในแต่ละหลอด และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 นาที ขั้นตอนที่สองดูดสารละลายในส่วนของ aqueous phase ย้ายใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ เติมสารละลาย Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 400 μ l และนำไปปั่นเหวี่ยงเหมือนกับขั้นตอนแรก ขั้นตอนที่สามดูดสารละลายในส่วนของ aqueous phase และเติมสารละลาย Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 400 μ l และนำไปปั่นเหวี่ยงเหมือนกับขั้นตอนแรก จากนั้นดูดสารละลายในส่วนของ aqueous phase และทำการตกตะกอนสารละลายดีเอ็นเอด้วย Ethanol เข้มข้น 95% ที่เย็นจัดปริมาตร 1.5-2 เท่าของสารละลายและล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol เข้มข้น 70% แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 15

นาที จากนั้นละลายตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 1 mM EDTA (pH 8.0) และเก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอปลาเทโพที่สกัด โดยการวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance, A) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยหาอัตราส่วนส่วนของ A_{260} : A_{280} ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่บริสุทธิ์ แต่ถ้าหากได้มากกว่า 1.85 แสดงว่าในตัวอย่างมีอาร์เอ็นเอปนอยู่ และถ้าค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปนอยู่ในตัวอย่าง

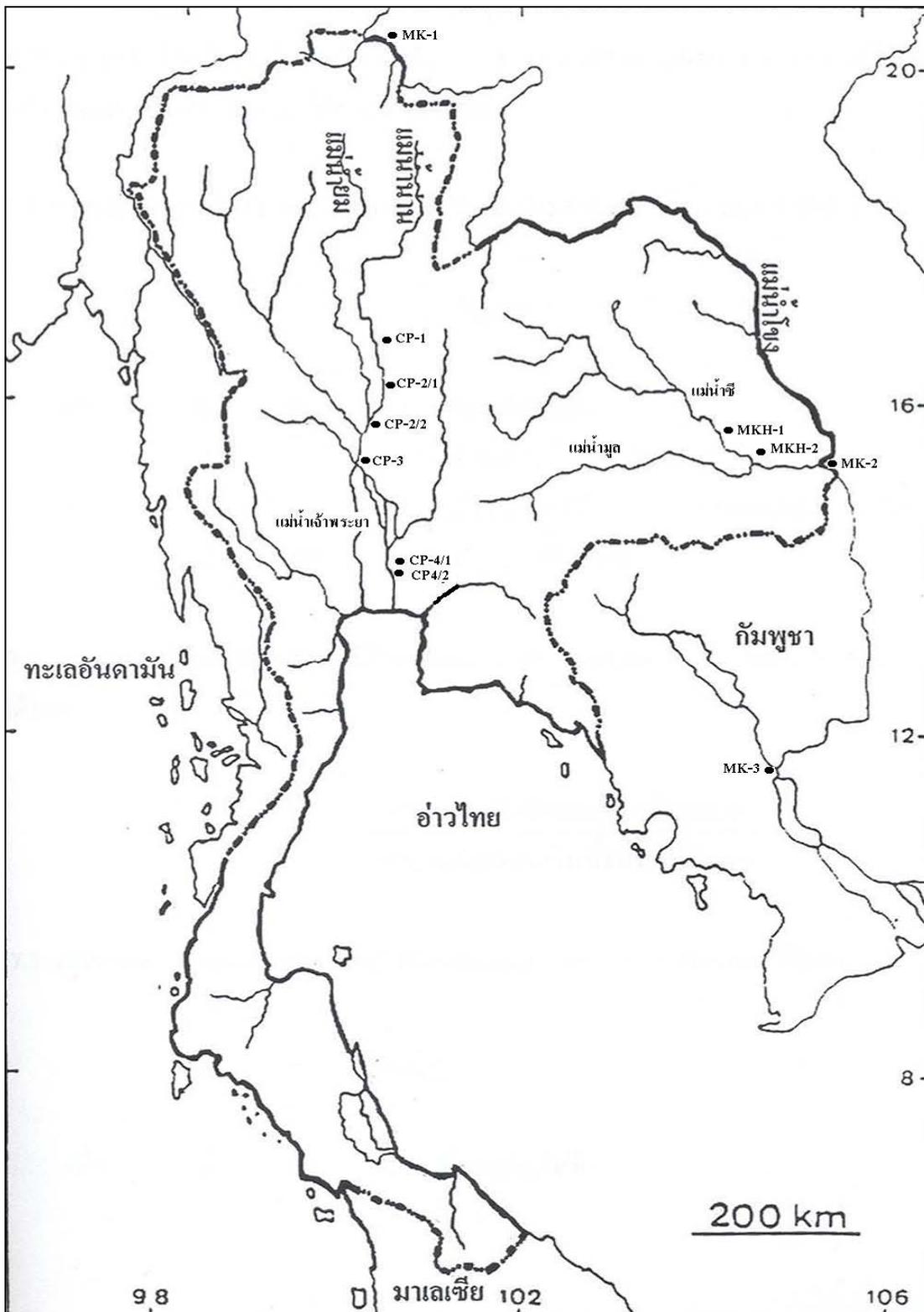
4. การวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์

เจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอปลาเทโพให้มีความเข้มข้น 20 ng/ μ l นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรมเมอร์ที่พัฒนาจากดีเอ็นเอปลาบึก 5 คู่ คือ *Pg-2**, *Pg-3**, *Pg-6**, *Pg-13** และ *Pg-20** (Na-Nakorn *et al.*, 2006) ลำดับเบสของไพรมเมอร์แสดงไว้ในตารางที่ 2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ ใช้ส่วนผสมในปฏิกิริยารวม 10 μ l ในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.5 ml ประกอบด้วยดีเอ็นเอเริ่มต้น 15-20 ng, พีซีอาร์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 1 เท่า (100 mM Tris-HCl pH 9.0 และ 500 mM KCl), 100 μ M dNTPs, 1.2-1.5 mM $MgCl_2$, ไพรมเมอร์ (Forward และ Reverse) 0.5 pmol/ μ l, 0.2 Unit *Tag* DNA polymerase (Pharmacia Biotech/FINNZYMES) และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 μ l เติม mineral oil ปิดคลุมชั้นบน จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องพีซีอาร์ (PTC-100TM Programmable thermal controller, MJ Research, Inc.) ควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งไว้ประกอบด้วย 1) 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 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 เมื่อสิ้นสุดการทำพีซีอาร์ นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้เติม loading dye (99% formamide, 10 mM NaOH, 0.1% bromophenol blue, 0.1% Xylene cyanol FF) ปริมาตร 5 μ l และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างของประชากร ชื่อย่อประชากร จำนวนตัวอย่าง สถานที่เก็บตัวอย่างปลา
เทโพที่ใช้ในการศึกษา

ประชากร	สัญลักษณ์	จำนวน ตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	Latitudes/ Longitudes
1. พิษณุโลก	CP-1	9	ตลาดปลา อ. เมือง	16° 49' 15" N; 100° 15' 35" E
2. พิษณุ-1	CP-2/1	23	ตลาดปลา อ. เมือง	16° 26' 29" N; 100° 21' 10" E
3. พิษณุ-2	CP-2/2	19	ตลาดปลา อ. บางมูลนาก	16° 01' 50" N; 100° 22' 39" E
4. ชัยนาท	CP-3	100	ตลาดปลา อ. เมือง	15° 10' 41" N; 100° 07' 27" E
5. ปทุมธานี-1	CP-4/1	7	วัดหษ์ปทุมมาวาส อ. เมือง	14° 01' 10" N; 100° 32' 11" E
6. ปทุมธานี-2	CP-4/2	45	ตลาดปลา อ. เมือง	14° 01' 01" N; 100° 32' 12" E
7. เชียงราย	MK-1	14	ตลาดปลา อ. เชียงแสน	20° 20' 09" N; 100° 06' 03" E
8. อุบลราชธานี	MK-2	10	ตลาดปลา อ. โขงเจียม	15° 19' 05" N; 105° 30' 10" E
9. พนมเปญ	MK-3	26	พนมเปญ ประเทศกัมพูชา	11° 34' 33" N; 104° 55' 36" E
10. ศพจ.ยโสธร	MKH-1	40	ศพจ.ยโสธร อ.มหาชัยชนะ	15° 29' 43" N; 104° 16' 29" E
11. ศพจ.อุบลราชธานี	MKH-2	64	ศพจ.อุบลราชธานี อ. เมือง	15° 22' 33" N; 104° 50' 30" E

หมายเหตุ CP = แม่น้ำเจ้าพระยา; MK = แม่น้ำโขง; H = โรงเพาะฟัก



ภาพที่ 1 แสดงจุดเก็บตัวอย่างปลาเทโพ

ตารางที่ 2 แสดงหมายเลข GenBank Accession ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ของปลาบึก ตำแหน่ง ลำดับเบสของไพรเมอร์ อุณหภูมิ Annealing ($^{\circ}\text{C}$) และขนาดผลผลิตพีซีอาร์ (bp) ทั้ง 5 ตำแหน่ง

หมายเลข GenBank Accession	ตำแหน่ง	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'→3')	T_A ($^{\circ}\text{C}$)	ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (bp)
AY364901	<i>Pg-2*</i>	F TGTGTCTAATCTTGTCCGTGCTG R TACTGTTGGACCAGACGTTCCCTC	60	249-311
AY364902	<i>Pg-3*</i>	F CCAGCCCACATTAGGTAGCATC R ACTAAAAGGCCTGACCCTTAGC	60	200-249
AY364903	<i>Pg-6*</i>	F CATCTCATGCCGTCATTACTGTG R AAAGTCCTAAAGGCTGCTTCAAC	60	249-311
AY364905	<i>Pg-13*</i>	F GTTTTCCATCCAGTTGTTTTCC R TAAGTCCATGTGGGTTTCCTCTG	60	200-270
AY364909	<i>Pg-20*</i>	F TCCCCTACTCCCACCCACTTAC R TATCTCTGATTTTGCACCACAGG	60	180-220

นำผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 3 μl มาแยกขนาดของอัลลิลบน 4.5% denaturing polyacrylamide gel ทำการแยกในบัฟเฟอร์ TBE โดยใช้เครื่อง sequencing gel (BioRad, USA) ผ่านกระแสไฟฟ้า 1500 V, 150 mA° , 60 W นาน 2.30-3 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบผลโดยการย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining ขนาดของอัลลิลจะเทียบกับ M13 sequence ladder (Promega, USA)

5. การทดสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (Mendelian inheritance)

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของแต่ละไพรเมอร์แล้ว ตรวจสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์ ไพรเมอร์ โดยนำไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ ได้แก่ *Pg-2** *Pg-3** *Pg-6** *Pg-13** และ *Pg-20** มาตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอจากพ่อ แม่ และลูกปลาเทโพ จำนวน 1 ครอบครัว จำนวนลูก 20 ตัว และทดสอบการถ่ายทอดของเครื่องหมายพันธุกรรมในรุ่นลูกด้วยวิธี Chi-square Goodness of fit (Sokal and Rohlf, 1981)

จากสูตร

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

โดย

O	คือ	ค่าที่ได้จากการทดลอง (observed value)
E	คือ	ค่าที่ได้จากทฤษฎี (expected value)
0.5	คือ	ค่าที่ใช้ปรับให้ค่า Chi-square ถูกต้องมากยิ่งขึ้น (correction factor) สำหรับตัวอย่างจำนวนน้อย

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกข้อมูลยีนไทป์ปลาเทโพในแต่ละตำแหน่งของประชากร จากนั้นนำมาคำนวณและวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร ซึ่งประกอบด้วยความถี่อัลลีล จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง Effective number of allele ค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตี (H_o) และค่าคาดหวังค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี (H_e) คำนวณโดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) ดังนี้

6.1 ความถี่ของอัลลีล (Allele frequency) ในแต่ละตำแหน่งของประชากร คำนวณได้จาก

$$p_i = \frac{2N_{ii} + \sum N_{ij}}{2N} \quad (\text{Halliburton, 2004})$$

เมื่อ	p_i	คือ	ความถี่ของอัลลีล A_i
	N_{ii}	คือ	จำนวนตัวอย่างที่มียีนไทป์แบบโฮโมไซโกต A_iA_i
	N_{ij}	คือ	จำนวนตัวอย่างที่มียีนไทป์แบบเฮตเทอโรไซโกต A_iA_j
	N	คือ	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

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

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

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

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

เมื่อ p_i คือ ความถี่ของอัลลีลที่ i

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

6.5 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี (Heterozygosity) (Nei, 1978) คำนวณได้จากสูตร

6.5.1 ค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตี (Observed heterozygosity, H_o)

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

6.5.2 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหมาย (Expected heterozygosity, H_e)

$$h_k = 2n(1 - \sum X_i^2)/2n-1$$

$$H_e = \sum h_k/r$$

เมื่อ

h_k คือ ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ตำแหน่ง k

X_i คือ ความถี่ของอัลลีล i ที่ตำแหน่ง k

n คือ จำนวนอัลลีลที่ตำแหน่ง k

r	คือ	จำนวนตำแหน่งที่ทำการศึกษา
H_0	คือ	ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีต่อตำแหน่ง

เปรียบเทียบค่า H_0 ในทุกคู่ของประชากร (Archie, 1985) และปรับระดับความน่าจะเป็นสำหรับการใช้ข้อมูลชุดเดิมวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้งด้วย Bonferroni correction (Rice, 1989)

6.6 การทดสอบสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

นำความถี่ยีนไทป์และความถี่อัลลีลของแต่ละตำแหน่งภายในประชากรมาทดสอบว่าเบี่ยงเบนไปจากสมมูลฮาร์ดี-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 1.2 (Goudet, 1995) และปรับระดับความน่าจะเป็นสำหรับการใช้ข้อมูลชุดเดิมวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้งด้วย Bonferroni correction (Rice, 1989) จากนั้นวิเคราะห์ null allele ในทุกตำแหน่งของประชากรและปรับยีนไทป์ในแต่ละตำแหน่งด้วยโปรแกรม Micro-Checker Version 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) และทดสอบสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กอีกครั้ง

6.7 การทดสอบ Genotypic disequilibrium

ทำการทดสอบว่ายีนไทป์ที่ตำแหน่งหนึ่งเป็นอิสระจากยีนไทป์ที่ตำแหน่งอื่นหรือไม่ 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 Bonferroni correction (Rice, 1989)

6.8 ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F Coefficients)

วิเคราะห์โครงสร้างประชากรย่อยของประชากรปลาเทโพในธรรมชาติทั้งแม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำโขงโดยใช้โปรแกรม FSTAT (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

โดย

$$F_{IS} = (H_S - H_O) / H_S$$

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

$$F_{IT} = (H_T - H_O) / H_T$$

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

6.9 การทดสอบ Genic differentiation

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

6.10 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) สำหรับการศึกษามากำหนด AMOVA ค่า F -statistics ที่ใช้ในการคำนวณ คือ

$$\begin{aligned} F_{ST} &= \text{อัตราส่วนความแปรปรวนระหว่างประชากรทั้งหมด (waterholes)} \\ F_{SC} &= \text{อัตราส่วนความแปรปรวนระหว่างประชากรภายในกลุ่ม (catchments)} \\ F_{CT} &= \text{อัตราส่วนความแปรปรวนระหว่างกลุ่มภายในตัวอย่างทั้งหมด} \end{aligned}$$

ทดสอบระดับนัยสำคัญทางสถิติโดยวิธี non-parametric permutations (Excoffier *et al.*, 1992) ด้วยโปรแกรม Arlequin (Schneider *et al.*, 2000)

6.11 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance)

นำค่าความถี่อัลลีลของประชากรปลาเทโพมาทำซ้ำข้อมูล 1,000 ครั้ง ด้วย SEQBOOT ข้อมูลที่ได้ นำมาคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยวิธี Cavalli-Sforza and Edwards (1967) ด้วย GENDIST โดยใช้โปรแกรม PHYLIP version 3.6 (Felsenstein, 1993) ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม โดยวิธีของ Cavalli-Sforza and Edwards (1967) chord distance คำนวณจากสูตร

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

โดยที่

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

เมื่อ

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

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

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

6.12 การทดสอบ Mantel's test

นำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณโดยวิธี Cavalli-Sforza and Edwards (1967) มาทดสอบสหสัมพันธ์ระหว่างค่าระยะห่างทางพันธุกรรมและระยะห่างทางภูมิศาสตร์ที่วัดความยาวตามแม่น้ำ โดยวิธี Mantel's Test (Mantel, 1967) ด้วยโปรแกรม TFPGA version 1.3 (Miller, 1997)

6.13 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรปลาเทโพ โดยนำความถี่อัลลีลมาทำซ้ำ 1,000 ครั้ง ใน SEQBOOT ผลข้อมูลที่ได้นำไปคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยวิธี Cavalli-Sforza and Edwards (1967) ใน GENDIST และนำค่าที่ได้ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยค่า bootstrap ของจุดแยก (node) ใช้การสุ่ม 1,000 ครั้ง ในการทำซ้ำข้อมูล ด้วย NEIGHBOR และ CONSENSE คำนวณด้วยโปรแกรม PHYLIP version 3.6 (Felsenstein, 1993) ทั้งนี้ในการสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพได้ตัดประชากรที่มีจำนวนตัวอย่างน้อยกว่า 10 ตัวอย่างออกไป ได้แก่ ประชากรจังหวัดพิษณุโลก, ปทุมธานี-1 และอุบลราชธานี คงเหลือประชากรที่ใช้ในการสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจำนวน 8 ประชากร

6.14 MDS (multidimensional scaling)

นำค่าเมตริกซ์ของระยะห่างทางพันธุกรรม (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967) มาจัดรูปแบบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรปลาเทโพด้วย nonmetric multidimensional scaling ตามวิธีการของ Lessa (1990) โดยใช้โปรแกรม SYSTAT (Wilkinson, 1992)

6.15 Assignment test

Assignment test ใช้คำนวณ likelihood ของยีนไทป์ในแต่ละตัวอย่างของประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติและจากโรงเพาะฟัก และทำการจัดกลุ่มตัวอย่างประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักใหม่ โดยใช้ประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติเป็นประชากรพื้นฐาน วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GENECLASS Version 2 (Cornuet *et al.*, 1999)

7. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. ระยะเวลาทำการทดลอง

ระยะเวลาเริ่มทำการทดลองเดือนมิถุนายน 2546 สิ้นสุดการทดลองในเดือนมีนาคม 2548

ผลการทดลอง

1. Cross-species amplification ของไมโครแซทเทลไลท์ในปลาเทโพ

จากการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ ไพรเมอร์ 5 คู่ ได้แก่ *Pg-2**, *Pg-3**, *Pg-6**, *Pg-13** และ *Pg-20** ที่พัฒนาจากปลาบึกพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาเทโพได้และพบสภาวะหลากหลายรูปแบบในทุกประชากร ส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR แสดงไว้ในตารางที่ 3 โดยที่ตำแหน่ง *Pg-2** พบจำนวนอัลลิล 8 อัลลิล (ขนาด 229-245) ตำแหน่ง *Pg-3** พบ 7 อัลลิล (ขนาด 189-217) ตำแหน่ง *Pg-6** พบ 22 อัลลิล (ขนาด 240-294) ตำแหน่ง *Pg-13** พบ 21 อัลลิล (ขนาด 232-278) และตำแหน่ง *Pg-20** พบ 15 อัลลิล (ขนาด 208-242)

ตารางที่ 3 แสดงสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR (ปริมาตร 10 μ l)

ไพรเมอร์	<i>Pg-2*</i>	<i>Pg-3*</i>	<i>Pg-6*</i>	<i>Pg-13*</i>	<i>Pg-20*</i>
ดีเอ็นเอต้นแบบ (ng)	20	20	20	20	20
MgCl ₂ (mM)	1.2	1.2	1.5	1.5	1.5
dNTPs (μ M)	100	100	100	100	100
PCR buffer	1X	1X	1X	1X	1X
F/R Primer (μ M)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
DNA polymerase (U)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Annealing Temperature ($^{\circ}$ C)	58	60	58	60	60

2. การทดสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (Mendelian inheritance)

จากการทดสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์อัลลิลในลูกปลาเทโพ จำนวน 20 ตัวอย่าง จาก 1 ครอบครัว และวิเคราะห์ Chi-square Goodness of fit พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมตามกฎของเมนเดล ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 5 ตำแหน่ง

ตำแหน่ง	อีโนไทป์		อัตราส่วน	อีโนไทป์ของลูก		χ^2
	พ่อ	แม่		อีโนไทป์	จำนวน	
<i>Pg-2*</i>	237/237	237/237	1	237/237	20	0.01 ^{ns}
<i>Pg-3*</i>	189/189	189/191	1:1	189/189	14	2.45 ^{ns}
				189/191	6	
<i>Pg-6*</i>	264/274	260/274	1:1:1:1	260/264	5	0.12 ^{ns}
				260/274	6	
				264/274	4	
				274/274	2	
<i>Pg-13*</i>	252/268	258/268	1:1:1:1	252/258	2	3.80 ^{ns}
				252/268	9	
				258/268	5	
				268/268	4	
<i>Pg-20*</i>	230/232	220/222	1:1:1:1	220/230	5	1.00 ^{ns}
				220/232	3	
				222/230	5	
				222/232	7	

หมายเหตุ ns คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$, $df = 1 = 3.84$, $P < 0.05$, $df = 3 = 7.82$)

3. ความถี่อัลลีลและ Private allele

พบ Private allele ซึ่งหมายถึง อัลลีลที่มีความเฉพาะในประชากรใดประชากรหนึ่ง ทั้งหมด 13 อัลลีล ใน 4 ตำแหน่ง คือ ประชากรจังหวัดพิษณุโลกพบ 2 อัลลีล ได้แก่ *Pg-2*231* และ *Pg-20*212*, จังหวัดชัยนาท พบ 1 อัลลีล ได้แก่ *Pg-6*274*, จังหวัดเชียงรายพบ 7 อัลลีล ได้แก่ *Pg-2*245*, *Pg-3*197*, *217*, *Pg-6*240*, *244*, *258* และ *Pg-20*242* จังหวัดอุบลราชธานีพบ 1 อัลลีล ได้แก่ *Pg-3*197* และพนมเปญพบ 2 อัลลีล ได้แก่ *Pg-2*229* และ *Pg-20*208* ความถี่อัลลีลของแต่ละตำแหน่งในแต่ละประชากร แสดงไว้ในตารางที่ 5 และรูปที่ 2-6

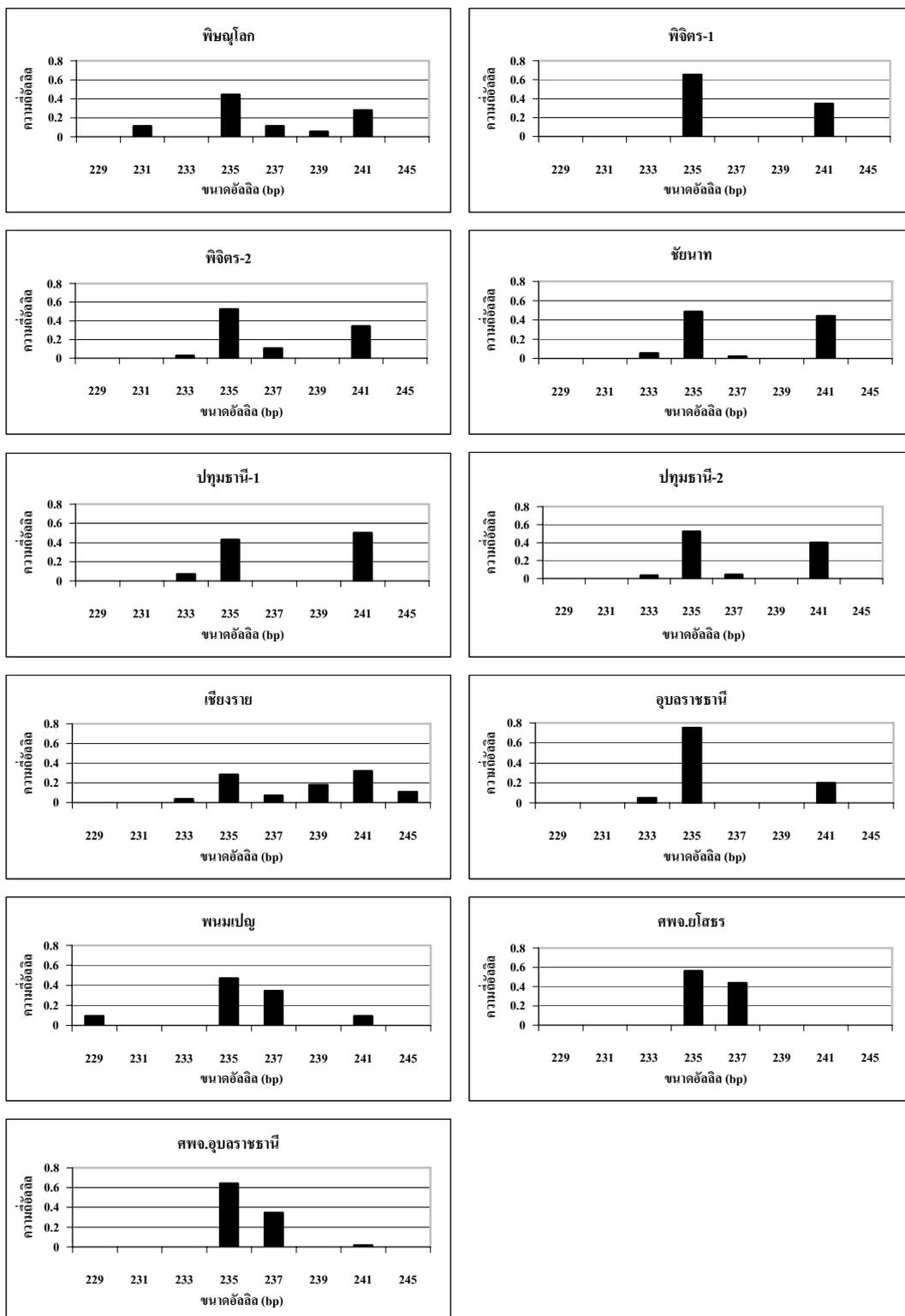
ตารางที่ 5 แสดงความถี่อัลลีลของไมโทคอนเดรียไลต์ 5 ตำแหน่ง ในประชากรปลาเทโพ

อัลลีล	CP-1	CP-2/1	CP-2/2	CP-3	CP-4/1	CP-4/2	MK-1	MK-2	MK-3	MKH-1	MKH-2
<i>Pg-2*</i>											
N	9	23	19	100	7	45	14	10	16	40	64
229	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.094	0.000	0.000
231	0.111	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
233	0.000	0.000	0.026	0.055	0.071	0.033	0.036	0.050	0.000	0.000	0.000
235	0.444	0.652	0.526	0.485	0.429	0.522	0.286	0.750	0.469	0.563	0.641
237	0.111	0.000	0.105	0.020	0.000	0.044	0.071	0.000	0.344	0.438	0.344
239	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.179	0.000	0.000	0.000	0.000
241	0.278	0.348	0.342	0.440	0.500	0.400	0.321	0.200	0.094	0.000	0.016
245	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.107	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Pg-3*</i>											
(N)	9	22	19	100	7	45	14	10	15	40	64
189	0.611	0.727	0.921	0.715	0.643	0.844	0.393	0.600	0.700	0.600	0.609
191	0.389	0.227	0.079	0.285	0.286	0.156	0.286	0.300	0.300	0.400	0.391
193	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000
197	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000

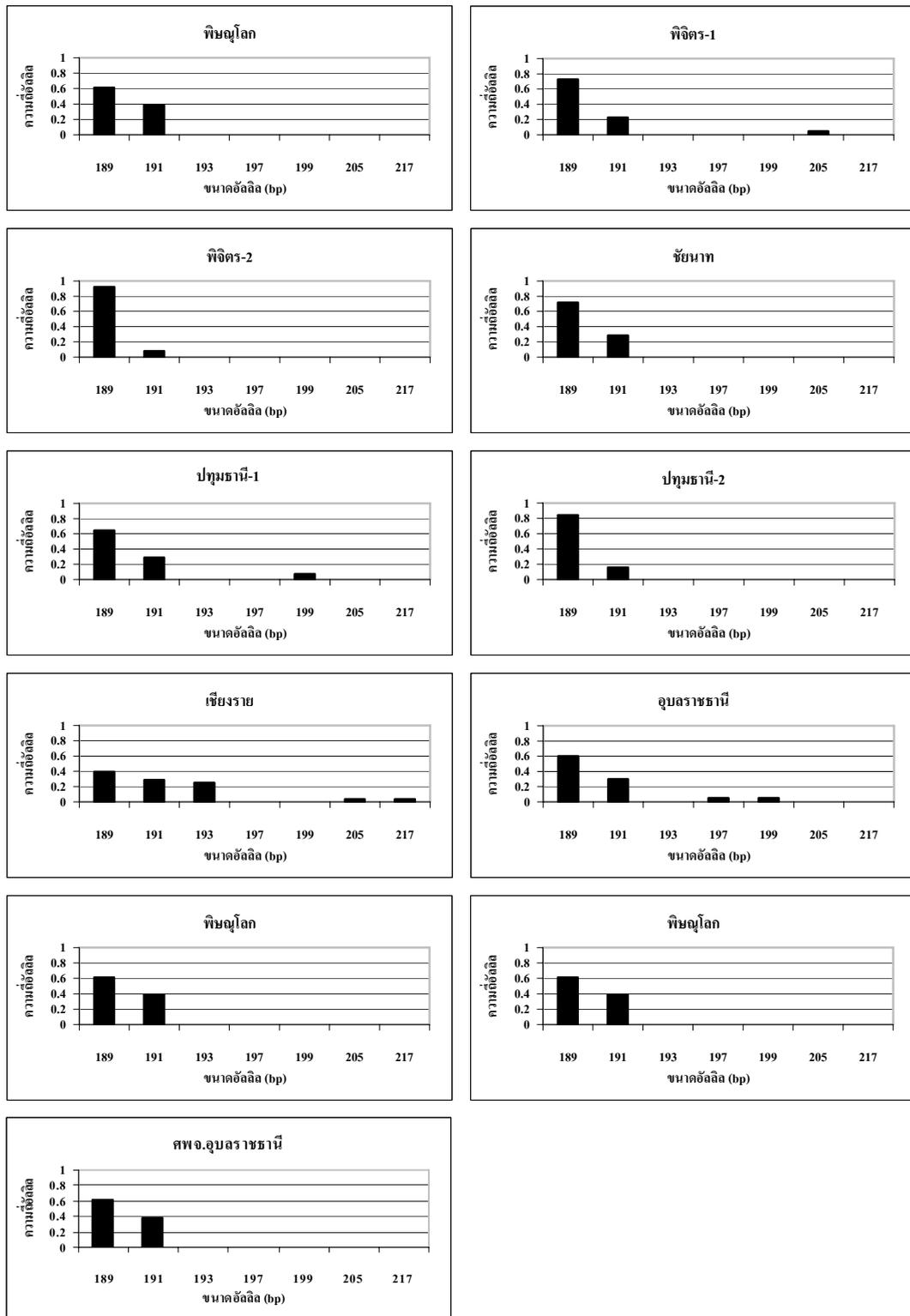
ตารางที่ 5 (ต่อ)

อัลลิท	CP-1	CP-2/1	CP-2/2	CP-3	CP-4/1	CP-4/2	MK-1	MK-2	MK-3	MKH-1	MKH-2
<i>Pg-20*</i>											
N	9	23	13	100	7	35	14	10	26	40	49
208	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.000	0.000
210	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000
212	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
214	0.000	0.000	0.077	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
216	0.278	0.217	0.269	0.280	0.357	0.429	0.143	0.350	0.038	0.000	0.000
218	0.167	0.109	0.192	0.055	0.000	0.086	0.036	0.150	0.019	0.000	0.000
220	0.222	0.217	0.231	0.260	0.286	0.271	0.036	0.350	0.192	0.288	0.276
222	0.222	0.391	0.154	0.315	0.071	0.129	0.107	0.100	0.058	0.250	0.122
224	0.000	0.000	0.038	0.020	0.000	0.043	0.107	0.000	0.038	0.000	0.000
226	0.000	0.043	0.038	0.060	0.214	0.029	0.036	0.050	0.404	0.125	0.204
228	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.058	0.000	0.000
230	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.107	0.000	0.000	0.000	0.000
232	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.071	0.000	0.115	0.338	0.398
234	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.214	0.000	0.019	0.000	0.000
242	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000

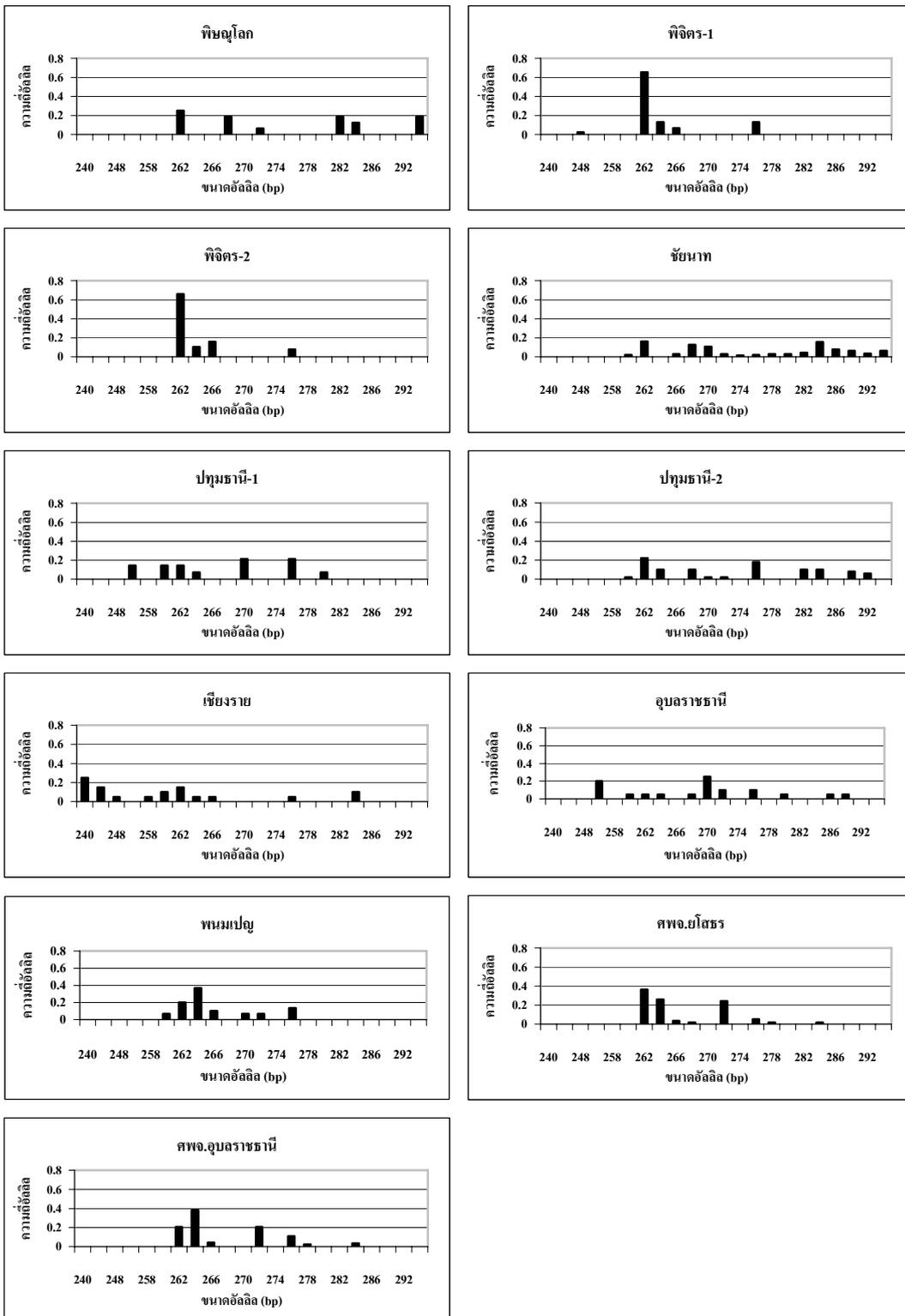
หมายเหตุ : N คือ จำนวนตัวอย่าง



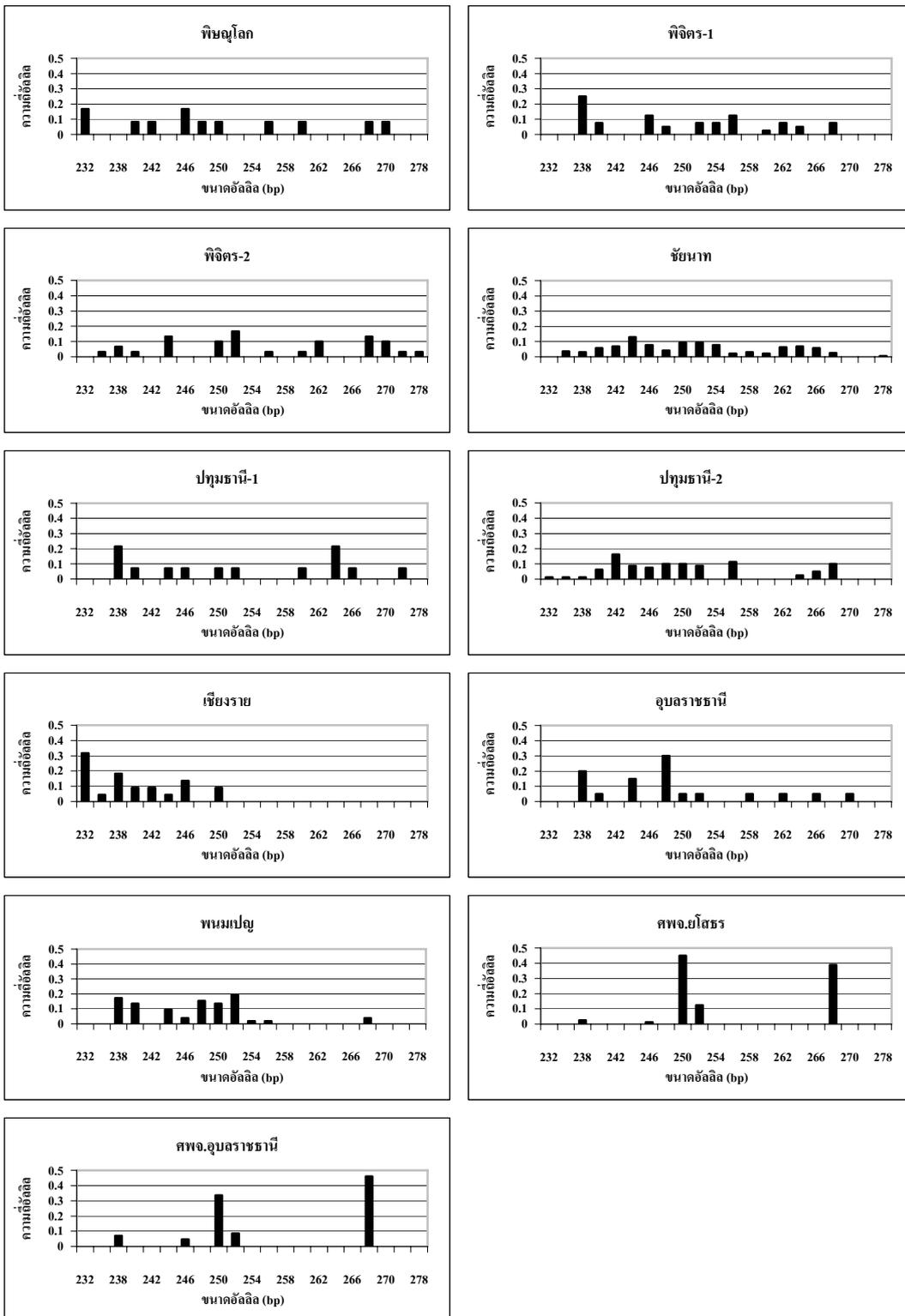
ภาพที่ 2 แสดงการกระจายความถี่ของไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง $Pg-2^*$ ในประชากรปลาเทโพ



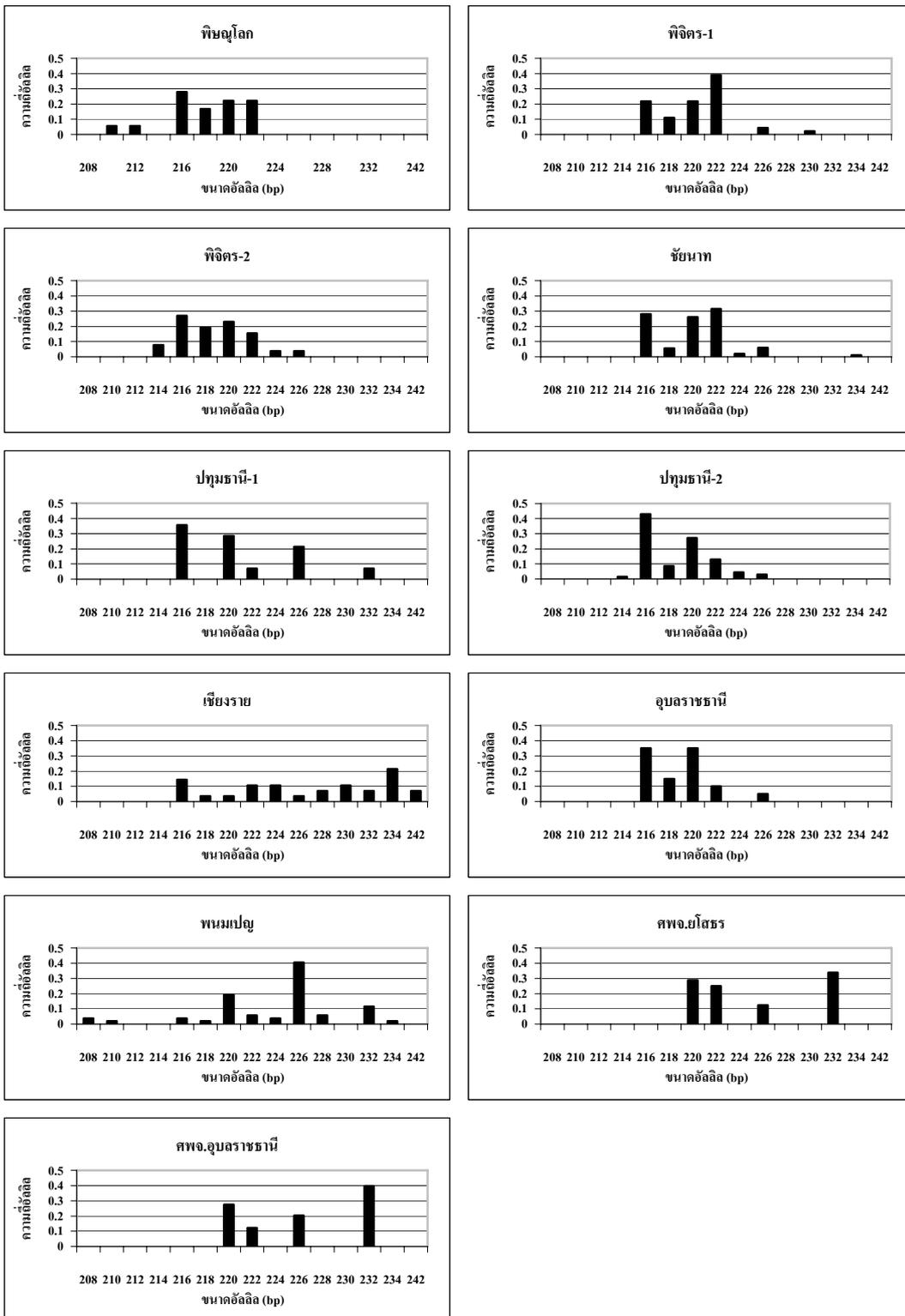
ภาพที่ 3 แสดงการกระจายความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง $Pg-3^*$ ในประชากรปลาเทโพ



ภาพที่ 4 แสดงการกระจายความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง *Pg-6** ในประชากรปลาเทโพ



ภาพที่ 5 แสดงการกระจายความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง *Pg-13** ในประชากรปลาเทโพ



ภาพที่ 6 แสดงการกระจายความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง Pg-20* ในประชากรปลาเทโพ

4. การทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

เมื่อทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในทุกตำแหน่งของประชากรปลาเทโพและปรับระดับความน่าจะเป็นด้วย Bonferroni correction ($P < 0.0006$) พบว่ามี 4 ประชากร ที่ไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ได้แก่ ประชากรจังหวัดชัยนาท ปทุมธานี-2 เชียงรายและพนมเปญ โดยตำแหน่ง $Pg-6^*$ พบไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กมากที่สุด ซึ่งสาเหตุหนึ่งอาจเกิดจาก null allele ดังนั้นจึงทำการปรับยีนไทป์ที่ตำแหน่งดังกล่าวและทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กอีกครั้ง พบว่าประชากรปลาเทโพที่นำมาศึกษาอยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในทุกประชากร และเมื่อพิจารณาในแต่ละตำแหน่ง พบว่าประชากรจังหวัดชัยนาทไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กที่ตำแหน่ง $Pg-6^*$ และ $Pg-13^*$ ($P < 0.0006$) และประชากรจังหวัดปทุมธานี-1 ไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กที่ตำแหน่ง $Pg-6^*$ ซึ่งตำแหน่งที่ไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กนี้ เบี่ยงเบนไปในทางที่มีโฮโมไซโกตมากกว่าคาดหมาย (F_{IS} เป็นบวก) (ตารางที่ 6 และ 7)

5. การทดสอบ Genotypic disequilibrium

จากการทดสอบ Genotypic disequilibrium ในประชากรปลาเทโพ 11 ประชากร ด้วยวิธี Markov chain ระหว่างตำแหน่งในแต่ละประชากร และปรับระดับความน่าจะเป็นด้วย Bonferroni correction ($P < 0.0005$) พบว่าการกระจายตัวของยีนไทป์ไม่เป็นอิสระต่อกัน (genotype disequilibrium) อย่างมีความแตกต่างทางสถิติ ในประชากรจังหวัดชัยนาทที่คู่ตำแหน่ง $Pg-6^*$ กับ $Pg-13^*$ ปทุมธานี-2 ที่สองคู่ตำแหน่งคือ $Pg-6^*$ กับ $Pg-20^*$ และ $Pg-13^*$ กับ $Pg-20^*$ และประชากรศพจ.อุบลราชธานีที่คู่ตำแหน่ง $Pg-6^*$ กับ $Pg-20^*$ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 6 แสดงการทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์กในประชากรปลาเทโพ 11 ประชากรก่อนปรับยีนโหนด

ประชากร	Pg-2*		Pg-3*		Pg-6*		Pg-13*		Pg-20*		ทุกตำแหน่ง	
	F_{IS}	P-value	F_{IS}	P-value								
CP-1	-0.219	0.9618	-0.600	1.0000	0.484	0.0082	0.153	0.1700	0.074	0.4545	0.046	0.3082
CP-2/1	-0.517	1.0000	-0.066	0.7609	0.049	0.4100	0.222	0.0091	-0.097	0.8736	-0.036	0.7264
CP-2/2	-0.214	0.9409	-0.059	1.0000	0.024	0.5273	0.067	0.3300	0.406*	0.0009	0.086	0.0727
CP-3	-0.211	0.9982	0.097	0.2209	0.385*	0.0009	0.132*	0.0009	0.069	0.1336	0.123*	0.0009
CP-4/1	-0.200	0.8582	-0.364	1.0000	0.700*	0.0009	-0.077	1.0000	-0.292	1.0000	0.016	0.4882
CP-4/2	-0.131	0.8855	-0.173	1.0000	0.537*	0.0009	0.216*	0.0009	0.278	0.0018	0.222*	0.0009
MK-1	0.010	0.5618	0.117	0.3291	0.419	0.0027	0.541*	0.0009	0.304	0.0018	0.283*	0.0009
MK-2	0.040	0.4727	-0.235	0.9255	0.122	0.2409	-0.032	0.8018	0.08	0.4691	0.008	0.5555
MK-3	0.430	0.0036	0.545	0.0091	0.589*	0.0009	0.170	0.0418	0.026	0.4673	0.320*	0.0009
MKH-1	-0.053	0.7373	-0.174	0.9500	0.358*	0.0009	-0.010	0.5773	0.249	0.0036	0.106	0.0109
MKH-2	-0.156	0.9055	-0.029	0.6900	0.397*	0.0009	-0.018	0.6236	0.048	0.3409	0.069	0.1000

หมายเหตุ: ค่า F_{IS} ที่กำกับด้วยดอกจัน (*) แสดงว่ามีความแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.0009$ (Bonferroni correction)

ตารางที่ 7 แสดงการทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์กในประชากรปลาเทโพ 11 ประชากรหลังปรับยีนไทป์ (เนื่องจากตรวจพบ null allele ที่ตำแหน่ง Pg-6*)

ประชากร	Pg-2*		Pg-3*		Pg-6*		Pg-13*		Pg-20*		ทุกตำแหน่ง	
	F_{IS}	P-value	F_{IS}	P-value								
CP-1	-0.219	0.9582	-0.600	1.0000	0.440	0.0173	0.153	0.1809	0.074	0.4291	0.039	0.2900
CP-2/1	-0.517	1.0000	-0.066	0.7600	0.049	0.4464	0.389	0.0118	-0.097	0.8864	-0.036	0.7418
CP-2/2	-0.214	0.9355	-0.059	1.0000	0.024	0.5418	0.067	0.3100	0.179	0.1491	0.028	0.3355
CP-3	-0.211	0.9945	0.097	0.2227	0.147*	0.0009	0.117*	0.0009	0.069	0.1391	0.060	0.0073
CP-4/1	-0.200	0.8627	-0.364	1.0000	0.700*	0.0009	-0.077	1.0000	-0.292	1.0000	0.016	0.5381
CP-4/2	-0.131	0.8900	-0.173	1.0000	0.190	0.0182	0.126	0.0191	0.096	0.2127	0.070	0.0291
MK-1	0.010	0.5982	0.117	0.3109	0.236	0.0500	0.482	0.0045	0.304	0.0045	0.239	0.0018
MK-2	0.040	0.4555	-0.235	0.8918	0.122	0.2555	-0.032	0.7791	0.080	0.4609	0.008	0.5309
MK-3	0.159	0.2609	0.239	0.3664	0.267	0.0391	0.170	0.0245	0.026	0.4755	0.167	0.0036
MKH-1	-0.156	0.9218	-0.029	0.6900	0.223	0.0282	-0.018	0.6382	0.048	0.3873	0.032	0.2482
MKH-2	-0.053	0.7064	-0.174	0.9418	0.118	0.0882	-0.010	0.5727	0.032	0.4191	-0.001	0.5027

หมายเหตุ : ค่า F_{IS} ที่กำกับด้วยดอกจัน (*) แสดงว่ามีความแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.0009$ (Bonferroni correction)

ตารางที่ 8 แสดงการทดสอบ Genotypic disequilibrium ในประชากรปลาเทโพ 11 ประชากร (*P*-value)

ตำแหน่ง	CP-1	CP-2/1	CP-2/2	CP-3	CP-4/1	CP-4/2	MK-1	MK-2	MK-3	MKH-1	MKH-2
<i>Pg-2*[*]-Pg-3*[*]</i>	0.5591	0.3217	0.0213	0.7887	0.0289	0.1789	0.8448	0.7919	0.0046	0.5539	0.4708
<i>Pg-2*[*]-Pg-6*[*]</i>	1.0000	0.7881	0.3655	0.2771	-	0.1524	1.0000	-	0.1141	0.9069	0.0135
<i>Pg-3*[*]-Pg-6*[*]</i>	0.7459	0.5209	0.3749	0.6571	-	0.5754	1.0000	-	0.0558	0.3860	0.6698
<i>Pg-2*[*]-Pg-13*[*]</i>	-	0.8437	1.0000	0.5091	1.0000	0.4939	0.5260	0.8532	1.0000	0.7050	0.1897
<i>Pg-3*[*]-Pg-13*[*]</i>	-	0.9831	0.6422	0.4115	1.0000	0.0441	1.0000	0.8562	1.0000	0.3408	0.5810
<i>Pg-6*[*]-Pg-13*[*]</i>	-	0.7467	0.2754	0.0000	-	0.0236	-	-	1.0000	0.8789	0.7784
<i>Pg-2*[*]-Pg-20*[*]</i>	0.6965	0.7985	0.6749	0.7937	1.0000	0.1540	1.0000	0.9256	0.6908	0.4430	0.0339
<i>Pg-3*[*]-Pg-20*[*]</i>	0.2900	1.0000	0.6915	0.6620	1.0000	0.0747	0.2066	0.4318	0.8930	0.2977	0.0604
<i>Pg-6*[*]-Pg-20*[*]</i>	1.0000	0.5261	0.7093	0.4247	-	0.0000	1.0000	-	1.0000	0.3000	0.0000
<i>Pg-13*[*]-Pg-20*[*]</i>	-	1.0000	-	0.3674	0.0964	0.0000	1.0000	0.2120	0.4898	0.5889	0.9092

หมายเหตุ : ค่าวิกฤต (critical value) ของค่า $P = 0.0005$ (Bonferroni correction)

- คือ ไม่มีข้อมูล

6. ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งในประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติ มีค่าอยู่ระหว่าง 5.4 ในประชากรจังหวัดพิจิตร-1 ถึง 9.4 ในประชากรจังหวัดชัยนาท โดยมีค่าเฉลี่ยจากทุกประชากรเท่ากับ 6.8 ± 4.0 ส่วนประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักทั้งสองมีอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งเท่ากัน โดยมีค่าเฉลี่ยจากทุกประชากรเท่ากับ 4.2 ± 2.1

ค่าเฉลี่ย Allelic richness ในประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติมีค่าอยู่ระหว่าง 4.0 ในประชากรจังหวัดพิจิตร-1 ถึง 6.1 ในประชากรจังหวัดชัยนาท โดยมีค่าเฉลี่ยจากทุกประชากรเท่ากับ 5.0 ± 2.4 ส่วนประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักทั้งสองมีค่าเฉลี่ย Allelic richness เท่ากับ 3.2 ± 1.1

ค่าเฉลี่ย Effective number of allele ในประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติมีค่าอยู่ระหว่าง 3.5 ในประชากรจังหวัดพิจิตร-1 ถึง 6.4 ในประชากรจังหวัดชัยนาท โดยมีค่าเฉลี่ยจากทุกประชากรเท่ากับ 4.7 ± 3.0 ส่วนประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักมีค่าเฉลี่ย Effective number of allele เท่ากับ 2.8 ในประชากรศพจ.ยโสธร และ 2.9 ในประชากรศพจ.อุบลราชธานี โดยมีค่าเฉลี่ยจากทุกประชากรเท่ากับ 2.8 ± 0.9

ค่าเสตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) ในประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติ มีค่าระหว่าง 0.596 ในประชากรจังหวัดพิจิตร-2 ถึง 0.756 ในประชากรจังหวัดพิษณุโลก ค่าเฉลี่ยจากทุกประชากรเท่ากับ 0.669 ± 0.181 ส่วนประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักมี (H_o) เท่ากับ 0.602 ในประชากรศพจ.ยโสธร และ 0.620 ในประชากรศพจ.อุบลราชธานี ในขณะที่ค่าเสตเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหมาย (H_e) ในประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติมีค่าเฉลี่ยจากทุกประชากรเท่ากับ 0.611 ± 0.077

ในประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักมีค่าระหว่าง 0.622 ในประชากรศพจ.ยโสธร และ 0.619 ในประชากรศพจ.อุบลราชธานี โดยมีค่าเฉลี่ยจากทุกประชากรเท่ากับ 0.621 ± 0.123 เมื่อเปรียบเทียบค่าเสตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตระหว่างประชากรปลาเทโพ พบว่าประชากรปลาเทโพส่วนใหญ่มีค่าเสตเทอโรไซโกซิตี ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นคู่ประชากรจังหวัดพิษณุโลกและศพจ.ยโสธร ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปลาเทโพแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปลาเทโพ 11 ประชากร จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง Allelic richness ค่าเฉลี่ย Effective number of allele ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) และจากการคาดหมาย (H_e)

ประชากร	ค่าเฉลี่ยตัวอย่าง	จำนวนอัลลีลเฉลี่ย	Allelic richness	ค่าเฉลี่ย Effective number of allele	ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตี	
	ต่อตำแหน่ง	ต่อตำแหน่ง			(H_o)	(H_e)
CP-1	8	5.8±2.9	5.5±2.9	4.9±2.7	0.756±0.150	0.783±0.177
CP-2/1	22	5.4±3.5	4.0±2.1	3.5±2.6	0.640±0.150	0.618±0.200
CP-2/2	17	6.0±4.3	4.4±2.5	4.1±3.4	0.596±0.273	0.612±0.304
CP-3	93.5	9.4±7.2	5.0±2.9	6.4±5.3	0.672±0.177	0.714±0.223
CP-4/1	7	5.6±3.0	5.2±2.6	4.3±2.4	0.743±0.293	0.753±0.176
CP-4/2	38	7.6±4.9	4.8±2.5	5.0±3.8	0.627±0.187	0.672±0.266
MK-1	12.5	8.0±2.6	6.1±1.7	5.7±2.1	0.645±0.122	0.839±0.079
MK-2	10	6.6±3.6	5.0±2.4	4.1±2.4	0.700±0.187	0.705±0.207
MK-3	19.5	6.8±3.8	4.7±1.9	4.1±2.1	0.599±0.172	0.716±0.175
ค่าเฉลี่ย		6.8±4.0	5.0±2.4	4.7±3.0	0.669±0.181	0.718±0.198
MKH-1	38	4.2±2.5	3.1±1.1	2.8±0.9	0.602±0.076	0.622±0.126
MKH-2	57.5	4.2±1.9	3.3±1.1	2.9±1.0	0.620±0.084	0.619±0.135
ค่าเฉลี่ย		4.2±2.1	3.2±1.1	2.8±0.9	0.611±0.077	0.621±0.123

7. ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient)

ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F_{IS} , F_{IT} และ F_{ST}) ของประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติแสดงไว้ในตารางที่ 10-12 ค่า F_{ST} เกือบทุกตำแหน่งของประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติเท่ากับ 0.062 และมีความแตกต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อแยกตามลุ่มน้ำพบว่าประชากรปลาเทโพจากลุ่มน้ำเจ้าพระยามีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.042 ประชากรปลาเทโพจากลุ่มน้ำโขงมีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.084 และค่า F_{ST} ทั้งสองแตกต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 10-12)

8. Genic differentiation

เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากรปลาเทโพทั้ง 8 ประชากร ด้วยวิธี Fisher's method ที่ทุกตำแหน่งและปรับระดับความน่าจะเป็นด้วย Bonferroni correction ($P = 0.0013$) พบว่าประชากรปลาเทโพส่วนใหญ่มีความแตกต่างระหว่างประชากร ยกเว้น คู่ประชากรจังหวัดพิจิตร-1 กับพิจิตร-2 และคู่ประชากรศพจ.ยโสธรกับศพจ.อุบลราชธานีที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 10 แสดงค่าสัมประสิทธิ์เอฟในแต่ละตำแหน่งของประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติทุกประชากร

ตำแหน่ง	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
<i>Pg-2*</i>	-0.171	0.044	-0.119
<i>Pg-3*</i>	0.046	0.062	0.106
<i>Pg-6*</i>	0.154	0.104	0.241
<i>Pg-13*</i>	0.150	0.028	0.174
<i>Pg-20*</i>	0.075	0.070	0.140
ทั้งหมด	0.068 ^{ns}	0.062*	0.127 ^{ns}
Bootstrapping ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95%	-0.054-0.141	0.038-0.090	-0.004-0.208

ตารางที่ 11 แสดงค่าสัมประสิทธิ์เอฟในแต่ละตำแหน่งของประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำเจ้าพระยา

ตำแหน่ง	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
<i>Pg-2*</i>	-0.222	0.005	-0.215
<i>Pg-3*</i>	0.019	0.036	0.054
<i>Pg-6*</i>	0.135	0.110	0.230
<i>Pg-13*</i>	0.127	0.022	0.146
<i>Pg-20*</i>	0.061	0.019	0.078
ทั้งหมด	0.045 ^{ns}	0.042*	0.085 ^{ns}
Bootstrapping ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95%	-0.092-0.120	0.014-0.082	-0.069-0.185

ตารางที่ 12 แสดงค่าสัมประสิทธิ์เอฟในแต่ละตำแหน่งของประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำโขง

ตำแหน่ง	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
<i>Pg-2*</i>	0.083	0.099	0.174
<i>Pg-3*</i>	0.165	0.089	0.239
<i>Pg-6*</i>	0.254	0.072	0.307
<i>Pg-13*</i>	0.261	0.063	0.308
<i>Pg-20*</i>	0.132	0.100	0.218
ทั้งหมด	0.184 ^{ns}	0.084*	0.252 ^{ns}
Bootstrapping ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95%	0.118-0.244	0.071-0.098	0.204-0.298

หมายเหตุ * แตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 13 ค่าความน่าจะเป็น (*P*-value) ของการทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากร (Genic differentiation) ปลาเทโพ 8 ประชากร (ค่าวิกฤติเท่ากับ 0.0013, Bonferroni correction)

ประชากร	CP-2/1	CP-2/2	CP-3	CP-4/2	MK-1	MK-3	MKH-1	MKH-2
CP-2/1	-							
CP-2/2	0.00042	-						
CP3	Highly sign.	Highly sign.	-					
CP-4/2	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	-				
MK-1	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.	-			
MK-3	Highly sign.	-						
MKH-1	Highly sign.	-						
MKH-2	Highly sign.	0.2386	-					

9. AMOVA (Analysis of molecular variance)

จากการทดสอบค่าความแปรปรวนของประชากรปลาเทโพโดยวิธี AMOVA เมื่อรวมแหล่งน้ำพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนระหว่างประชากรมีค่าเท่ากับ 2.48 และเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนภายในประชากรมีค่าเท่ากับ 97.52 จากการทดสอบทางสถิติ พบมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างประชากรและภายในประชากรปลาเทโพ

เมื่อทำการทดสอบความแปรปรวนแยกตามแม่น้ำพบว่าเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มมีค่าเท่ากับ 6.55 เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนระหว่างประชากรภายในกลุ่มมีค่าเท่ากับ -0.22 และเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนภายในประชากรมีค่าเท่ากับ 93.67 (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 แสดงค่าความแปรปรวนโดยการวิเคราะห์ AMOVA ระหว่างประชากรและภายในประชากรปลาเทโพจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 6 ประชากร

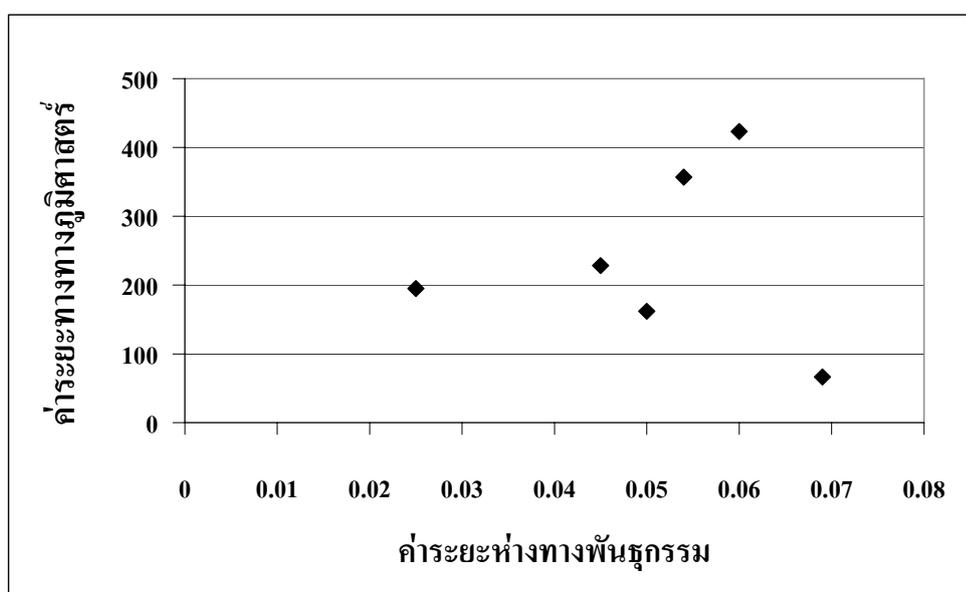
แหล่งความแปรปรวน	<i>df</i>	SS	Variance components	เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวน	<i>p</i> -value
1.) รวมแหล่งน้ำธรรมชาติ 9 ประชากร					
ระหว่างประชากร	5	3.631	0.00686 Va	2.48	0
ภายในประชากร	448	120.949	0.26997 Vb	97.52	0
รวม	453	124.579	0.27683		
2.) แม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำโขง					
ระหว่างกลุ่ม	1	2.721	0.01888 Va	6.55	0
ระหว่างประชากร					
ภายในกลุ่ม	4	0.91	-0.00063 Vb	-0.22	0
ภายในประชากร	448	120.949	0.26997 Vc	93.67	0
รวม	453	124.579	0.28823		

10. ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพทั้ง 8 ประชากร คำนวณโดยวิธีของ Cavalli-Sforza and Edward (1967) พบว่าประชากรปลาเทโพจากแหล่งน้ำธรรมชาติมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 0.059 โดยมีค่าระหว่าง 0.025 (ปทุมธานี-2 กับ ชัยนาท) ถึง 0.131 (เชียงรายนกับพิจิตร) ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.051 และประชากรจากแม่น้ำโขงมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.111 ส่วนประชากรศพจ.ยโสธรและประชากรศพจ.อุบลราชธานี มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.004 (ตารางที่ 15)

11. การทดสอบ Mantel's Test

จากการทดสอบ Mantel's test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าค่าสหสัมพันธ์ (r) ของความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางทางภูมิศาสตร์กับระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำเจ้าพระยา มีค่าเท่ากับ 0.0007 (ภาพที่ 7) และไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.1670$) ส่วนค่าสหสัมพันธ์ระหว่างระยะทางทางภูมิศาสตร์กับระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำโขง ไม่สามารถวิเคราะห์ได้เนื่องจากมีเพียงคู่ประชากรเดียว



ภาพที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางพันธุกรรมและระยะทางทางภูมิศาสตร์ของคู่ประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำเจ้าพระยา

ตารางที่ 15 แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (ด้านล่าง) และระยะทางทางภูมิศาสตร์ (กิโลเมตร) (ด้านบน) ของประชากรปลาเทโพ 8 ประชากร

ประชากร	CP-2/1	CP-2/2	CP-3	CP-4/2	MK-1	MK-3	MKH-1	MKH-2
CP-2/1		66.4	228.2	423.2	433.5	730.1	495.6	443.0
CP-2/2	0.069	-	161.8	356.8	479.0	695.7	483.2	432.1
CP-3	0.045	0.050	-	195.0	572.4	654.5	503.3	456.5
CP-4/2	0.060	0.054	0.025	-	703.6	548.3	480.5	443.3
MK-1	0.123	0.131	0.102	0.100	-	2078.3	1616.0	1680.1
MK-3	0.077	0.075	0.067	0.067	0.111	-	645.0	709.1
MKH-1	0.129	0.098	0.115	0.109	0.158	0.070	-	64.1
MKH-2	0.115	0.096	0.111	0.104	0.147	0.064	0.004	-

11. Assignment test

จากผลการวิเคราะห์พบว่าประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักทั้งสองถูกจัดกลุ่มอยู่ใน 3 ประชากร ได้แก่ ประชากรจังหวัดพิจิตร-1 พิจิตร-2 และพบมากที่สุดในการประชากรจากพนมเปญ โดยศพจ.ยโสธร พบ 72.5% และ ศพจ.อุบลราชธานีพบ 75% (ตารางที่ 16)

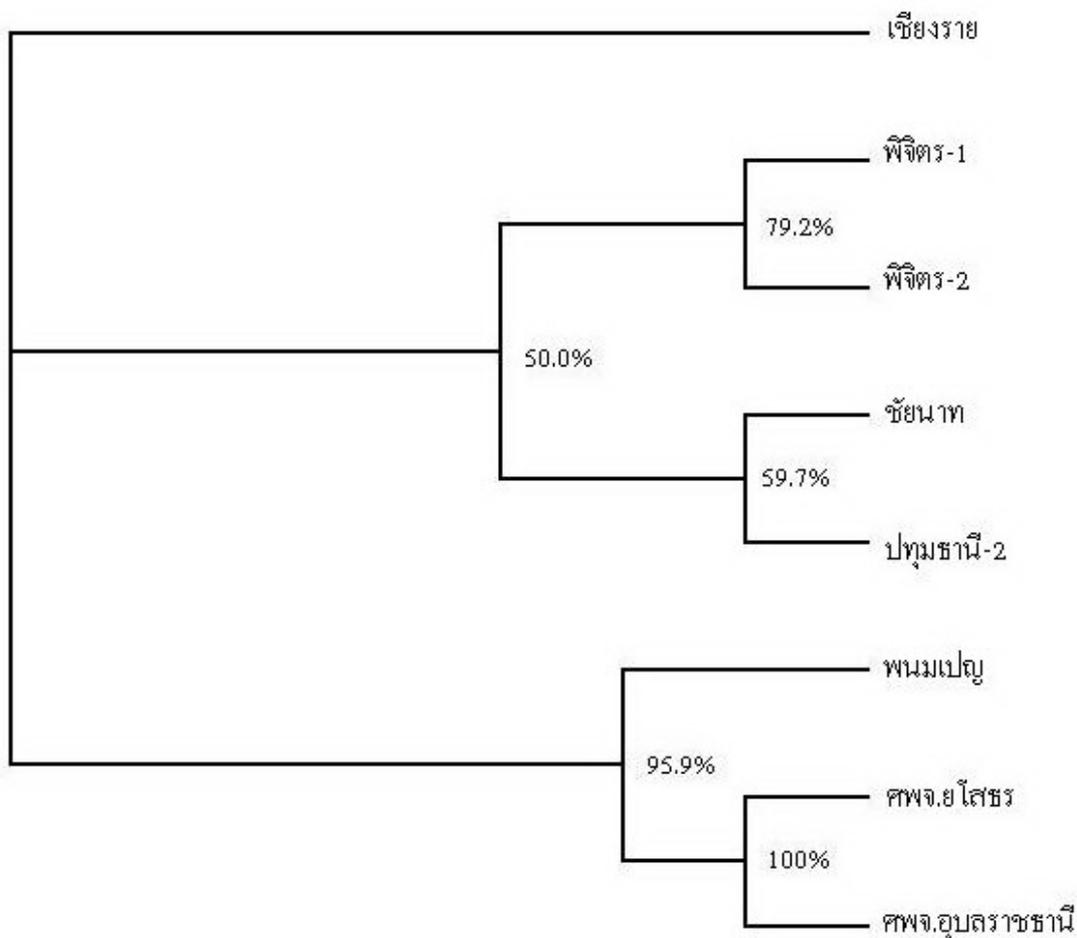
ตารางที่ 16 แสดงผล assignment test ของประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักทั้ง 2 ประชากร ด้วยวิธีการของ Bayesian

ประชากร	MKH-1	MKH-2
CP-2/1	2	6
CP-2/2	9	10
CP3	-	-
CP-4/2	-	-
MK-1	-	-
MK-3	29	48
จำนวน	40	64

13. แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพทุกประชากร จัดโดยใช้ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณวิธี Cavalli-Sforza and Edward's distance แสดงไว้ดังภาพที่ 8 จากภาพแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพทั้ง 8 ประชากร พบว่าแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม แยกตามกลุ่มแม่น้ำ โดยกลุ่มแรกเป็นกลุ่มจากแม่น้ำแม่น้ำเจ้าพระยาแยกออกเป็นสองกลุ่มย่อย มีค่าการทำซ้ำเท่ากับ 50% กลุ่มย่อยแรกประกอบด้วยประชากรจังหวัดพิจิตรทั้งสองประชากรจับคู่กันโดยมีค่าการทำซ้ำเท่ากับ 59.7% กลุ่มย่อยที่สองประกอบด้วยประชากรจังหวัดชัยนาทและปทุมธานี-2 ซึ่งจับคู่กันด้วยเปอร์เซ็นต์การทำซ้ำเท่ากับ 79.2% ส่วนกลุ่มที่สองเป็นกลุ่มจากแม่น้ำโขงซึ่งค่าการทำซ้ำในกลุ่มนี้มีค่าสูง ประกอบด้วย

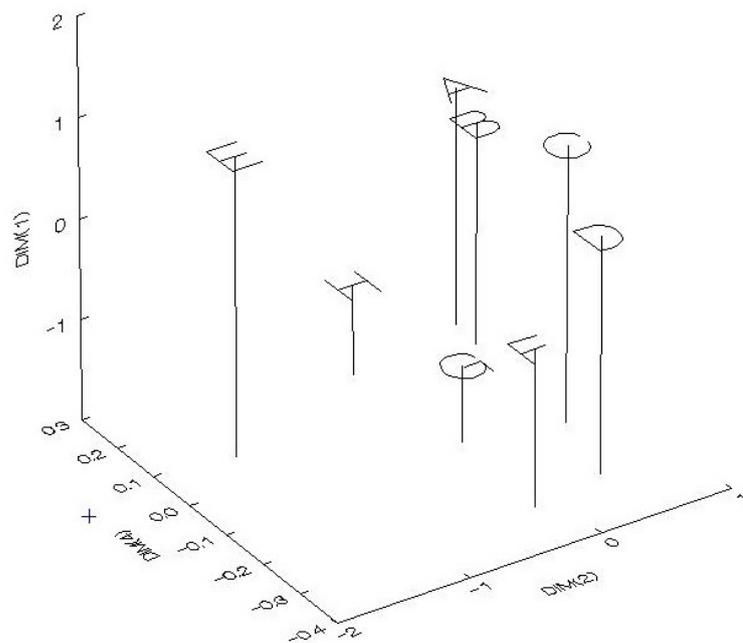
ประชากรจังหวัดพนมเปญ เชียงรายและประชากรโรงเพาะฟัก ปลาเทโพจากโรงเพาะฟักมีแหล่งที่มาจากกลุ่มน้ำโขงตอนล่าง และมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ ประชากรพนมเปญมากกว่าประชากรจังหวัดเชียงราย



ภาพที่ 8 แสดงแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพ 8 ประชากร (เปอร์เซ็นต์ที่แสดงบนจุดแยกคือค่าร้อยละของการทำซ้ำจากการสุ่ม 1,000 ครั้ง)

14. Multidimensional Scaling (MDS)

จากกราฟ MDS (รูปที่ 9) แสดงรูปแบบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สอดคล้องกับการจัดแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Neighbor joining โดย Dimension 2 (แกน X) และ Dimension 4 (แกน Y) แสดงให้เห็นว่าประชากรปลาเทโพที่นำมาศึกษาแบ่งออกตามลุ่มน้ำโดยกลุ่มแรกเป็นประชากรจากลุ่มน้ำเจ้าพระยา ซึ่งประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยประชากรจังหวัดพิจิตร-1 กับพิจิตร-2 และประชากรจังหวัดชัยนาทกับปทุมธานี-2 ในขณะที่กลุ่มที่สองเป็นประชากรจากลุ่มน้ำโขง ประกอบด้วยประชากรจังหวัดเชียงราย, พนมเปญ, ศพจ.ยโสธร และ ศพจ.อุบลราชธานี โดย Dimension 1 (แกน Z) แสดงถึงการรวมกลุ่มของประชากรและความแตกต่างของกลุ่มย่อยในประชากรปลาเทโพ ซึ่งจากการทำ MDS พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพสอดคล้องกับสภาพภูมิศาสตร์



ภาพที่ 9 Multidimensional scaling แสดงแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาเทโพทั้ง 8 ประชากร (A = พิจิตร-1, B = พิจิตร-2, C = ชัยนาท, D = ปทุมธานี-2, E = เชียงราย, F = พนมเปญ, G = ศพจ.ยโสธร และ H = ศพจ.อุบลราชธานี)

วิจารณ์ผลการทดลอง

Cross-species ของไมโครแซทเทลไลท์ในประชากรปลาเทโพ

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปลาเทโพทั้ง 11 ประชากร ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่พัฒนาจากปลาบึก ทั้งหมด 5 คู่ ได้แก่ *Pg-2**, *Pg-3**, *Pg-6**, *Pg-13** และ *Pg-20** พบว่าไพรเมอร์ที่นำมาใช้มีความหลากหลายของยีนในทุกตำแหน่งที่ศึกษา พบอัลลีลทั้งหมด 73 อัลลีล จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งมีค่าระหว่าง 7-22 อัลลีล โดยที่ตำแหน่ง *Pg-13** แสดงความหลากหลายของอัลลีลมากที่สุด พบ 22 อัลลีล โดยปกติแล้วการนำไพรเมอร์ที่พัฒนาจากปลาชนิดหนึ่ง มาใช้กับปลาต่างชนิดกันจะกังวลเกี่ยวกับเรื่องความหลากหลายของไพรเมอร์ เพราะในการคัดเลือกไพรเมอร์จะเลือกไพรเมอร์ที่พบสภาพหลากหลายของยีนกับปลาชนิดนั้นๆ แต่เมื่อนำไพรเมอร์นี้ไปใช้กับปลาชนิดอื่น โอกาสที่จะพบสภาพหลากหลายของยีนจะน้อยลง หรืออาจไม่พบสภาพหลากหลายของยีนเลยก็ได้ และโอกาสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ของปลาต่างชนิดกัน จะประสบความสำเร็จมากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับความแตกต่างทางวิวัฒนาการของปลาต่างชนิดนั้นๆ (Primmer *et al.*, 1996) จากการทดสอบการถ่ายทอดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมตามกฎของเมนเดล แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่พัฒนาจากปลาบึกทั้ง 5 คู่ นี้ มีการถ่ายทอดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมสอดคล้องกับค่าคาดหวังตามแบบการถ่ายทอดของเมนเดลในทุกไพรเมอร์ ซึ่งแสดงถึงลักษณะของเครื่องหมายพันธุกรรมที่ดี

สมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

ประชากรปลาเทโพที่นำมาศึกษาครั้งนี้พบอยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในทุกประชากร เมื่อพิจารณาในแต่ละตำแหน่งพบว่าส่วนใหญ่อยู่ในสมดุล ยกเว้นตำแหน่ง *Pg-6** และ *Pg-13** ของประชากรจังหวัดชัยนาทและตำแหน่ง *Pg-6** ของประชากรจังหวัดปทุมธานี-2 ที่ไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก โดยเบี่ยงเบนไปในทางที่มีโฮโมไซโกตมากกว่าที่คาดหวัง นอกจากนี้เมื่อพิจารณา genotypic disequilibrium พบว่าคู่ระหว่างตำแหน่ง 5 คู่ ไม่อยู่ในสมดุล สาเหตุอาจเกิดจากประชากรมีขนาดเล็ก หรือมีประชากรอื่นปะปนอยู่ (population admixture)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรของปลาเทโพ

จากผลการศึกษาประชากรปลาเทโพด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 5 ตำแหน่ง พบ private allele (อัลลิลที่พบเฉพาะในบางประชากร) ทั้งหมด 13 อัลลิล ได้แก่ ประชากรจังหวัด พิษณุโลก, ชัยนาท, เชียงราย, อุบลราชธานีและพนมเปญ จากการศึกษาพบว่าตำแหน่ง *Pg-2*231* และ *Pg-20*212* ของประชากรจังหวัดพิษณุโลก และตำแหน่ง *Pg-3*197* ของประชากร อุบลราชธานีอาจเป็น private allele ที่แท้จริง เนื่องจากทั้งสองประชากรมีจำนวนตัวอย่างน้อยแต่ พบอัลลิลที่เฉพาะในประชากร ซึ่ง private allele สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ จำเพาะต่อประชากรเป้าหมาย (population marker) เพื่อติดตามการถ่ายเททางพันธุกรรม (genetic flow) ซึ่งส่งผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในแต่ละประชากรไปจากเดิม (Slatkin, 1985)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบในปลา ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับลักษณะของแหล่งที่อยู่อาศัยและลักษณะการดำรงชีวิตของปลาชนิดนั้นๆ ในปลาทะเลส่วนใหญ่จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง ($A = 20.6$, $H_0 = 0.79$) มากกว่าในปลาน้ำจืด ($A = 7.5$, $H_0 = 0.46$) หรือปลาในกลุ่ม anadromous ($A = 11.3$, $H_0 = 0.68$) (DeWoody and Avise, 2000) ในประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติที่ศึกษาพบว่ามี ความหลากหลายทางพันธุกรรมปานกลาง ($A = 5.4-9.4$, $A_r = 4.0-6.1$, $H_0 = 0.669$) โดยมีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลา European grayling ($A = 4.8$, $A_r = 3.3$, $H_0 = 0.43$) (Gum *et al.*, 2003) และมีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลาใน ($A = 2.50-14.00$, $A_r = 2.49-8.66$, $H_0 = 0.632-0.905$) (Kohlmann *et al.*, 2003) และปลาสาวยซึ่งเป็นปลาในครอบครัว (Pangasidae) เดียวกันกับปลาเทโพ ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง ($A_r = 6.3-16.7$, $H_0 = 0.734$) (So *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง เนื่องจากตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ที่ศึกษาในปลาแต่ละชนิดนั้นต่างกัน และถึงแม้จะใช้ไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่งเดียวกัน ความหลากหลายของไพรเมอร์ที่ได้ก็จะแตกต่างกันไป เนื่องจากความหลากหลายของไพรเมอร์ที่พัฒนาจากปลาชนิดหนึ่งจะมีแนวโน้มที่จะลดลงในปลาชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (Ellegren *et al.*, 1995) ดังนั้น การเปรียบเทียบกันก็เพื่อเป็นเกณฑ์ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ศึกษานั้นเป็นอย่างไร ซึ่งจากการเปรียบเทียบจะเห็นได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปลาเทโพที่ศึกษาอยู่ในเกณฑ์ปานกลาง

ประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำเจ้าพระยามีความหลากหลายภายในประชากรค่อนข้างสูง ($A = 5.4-9.4$, $A_r = 4.0-5.5$, $H_0 = 0.596-0.756$) จากการศึกษาพบว่าประชากรจังหวัดพิษณุโลกและปทุมธานี-1 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง ($H_0 = 0.756$ และ 0.743) ในขณะที่จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งมีค่าปานกลาง สาเหตุอาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างของทั้งสองประชากรมีจำนวนน้อย ทำให้ได้จำนวนอัลลีลน้อยกว่าที่ควรจะเป็น แต่จะไม่ส่งผลต่อจำนวนและความถี่ของอัลลีลส่วนใหญ่ที่พบในประชากรนั้นๆ (Barroso *et al.*, 2005) สาเหตุที่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงภายในประชากรแม่น้ำเจ้าพระยานั้น มีผลมาจากสภาพภูมิศาสตร์ของแม่น้ำเจ้าพระยาเป็นแม่น้ำสายใหญ่ ในช่วงฤดูฝนระดับน้ำในแม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำสาขาจะเพิ่มสูงขึ้นและเชื่อมต่อกันเป็นแหล่งพื้นที่น้ำหลาก เอื้ออำนวยให้เป็นแหล่งเพาะพันธุ์และอนุบาลลูกปลา และนอกจากนี้แล้วแม่น้ำเจ้าพระยามีสิ่งกีดขวางทางสภาพภูมิศาสตร์ไม่มากนัก โดยเฉพาะแม่น้ำเจ้าพระยาตอนล่าง ทำให้ประชากรบริเวณนี้สามารถผสมพันธุ์ระหว่างประชากรได้ ส่งผลให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรมีค่าสูง (Na Nakorn *et al.*, 2004)

ในทำนองเดียวกัน ประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำโขงมีความหลากหลายภายในประชากรค่อนข้างสูง ($A = 6.6-8.0$, $A_r = 4.7-6.1$, $H_0 = 0.599-0.700$) เมื่อพิจารณาในแต่ละประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำโขง พบว่าประชากรจังหวัดอุบลราชธานีมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรสูงที่สุด ($A = 6.6$, $H_0 = 0.700$) ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงนี้เป็นผลมาจากลุ่มน้ำโขงมีระบบนิเวศขนาดใหญ่ ในฤดูฝนแม่น้ำโขงจะมีน้ำท่วมเป็นบริเวณกว้างทุกปี ซึ่งจะเป็แหล่งอาหาร แหล่งวางไข่ เป็นที่อนุบาลลูกปลาโดยปลาเทโพจะอพยพไปตอนบนของแม่น้ำในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคมและวางไข่ในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคมของทุกปี (Roberts, 1993) และไม่มีสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ทั้งจากธรรมชาติและจากมนุษย์ ทำให้ประชากรบริเวณนี้สามารถถ่ายเทพันธุกรรมระหว่างประชากรได้สูง (So *et al.*, 2006)

ส่วนประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง ต่ำกว่าประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติ ($A = 4.2$) ในขณะที่ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีของประชากรจากโรงเพาะฟัก ($H_0 = 0.602-0.620$) ไม่แตกต่างจากประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติ ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า ได้เกิด genetic drift ในประชากรโรงเพาะฟัก โดยการสูญเสียความหลากหลายของอัลลีล จะเป็นตัวชี้วัดที่ดีของการเกิด genetic drift (Allendorf and Phelps, 1980) ในขณะที่ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีอาจไม่สัมพันธ์กับการเกิดความเปลี่ยนแปลงดังกล่าว โดย genetic drift คงจะเกิดจากการที่นำพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติจำนวนไม่มากพามาใช้เป็นประชากรเริ่มต้น (founder) มีผลให้อัลลีลจำนวนหนึ่ง

สูญหายไป โดยเฉพาะอัลลีลที่หายาก (rare allele) จากนั้นก็จะเกิดการผสมเลือดชิดเนื่องจากมีขนาด effective population size ต่ำ โดยทั่วไประดับเสตเทอโรไซโกซิตีมักจะลดลงในระยะต่อมา เนื่องจากผลของการผสมเลือดชิด (Allendorf and Phelps, 1980)

จากการศึกษาในปลา Sea trout (*Salmo trutta*) ในประเทศโปแลนด์ พบว่าประชากรปลา sea trout ในโรงเพาะฟักมีจำนวนอัลลีลน้อยกว่าปลาจากธรรมชาติ แต่มีค่าเสตเทอโรไซโกซิตีที่ใกล้เคียงกับปลาจากธรรมชาติ (Was and Wenne, 2002) ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟัก สาเหตุอีกประการหนึ่งอาจเกิดจากรูปแบบการคัดเลือกพันธุ์ภายในโรงเพาะฟัก ทั้งการคัดเลือกพันธุ์โดยคุณลักษณะตัวเอง (mass selection) และการคัดเลือกพันธุ์โดยคุณลักษณะครอบครัว (family selection) จะส่งผลต่อการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรมในแง่ของความหลากหลายอัลลีลแต่ไม่มีผลต่อระดับเสตเทอโรไซโกซิตี แต่ในประชากรโรงเพาะฟักที่ศึกษานี้ไม่มีรายงานการคัดเลือกพันธุ์ ดังนั้นการคัดเลือกพันธุ์จึงอาจไม่ใช่สาเหตุของระดับเสตเทอโรไซโกซิตีที่มีอยู่นี้

การใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อยและขาดการจัดการแบบแผนการเพาะพันธุ์ที่ดี ย่อมส่งผลกระทบต่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรในโรงเพาะฟักได้ (Cross *et al.*, 1993; Norris *et al.*, 1999)

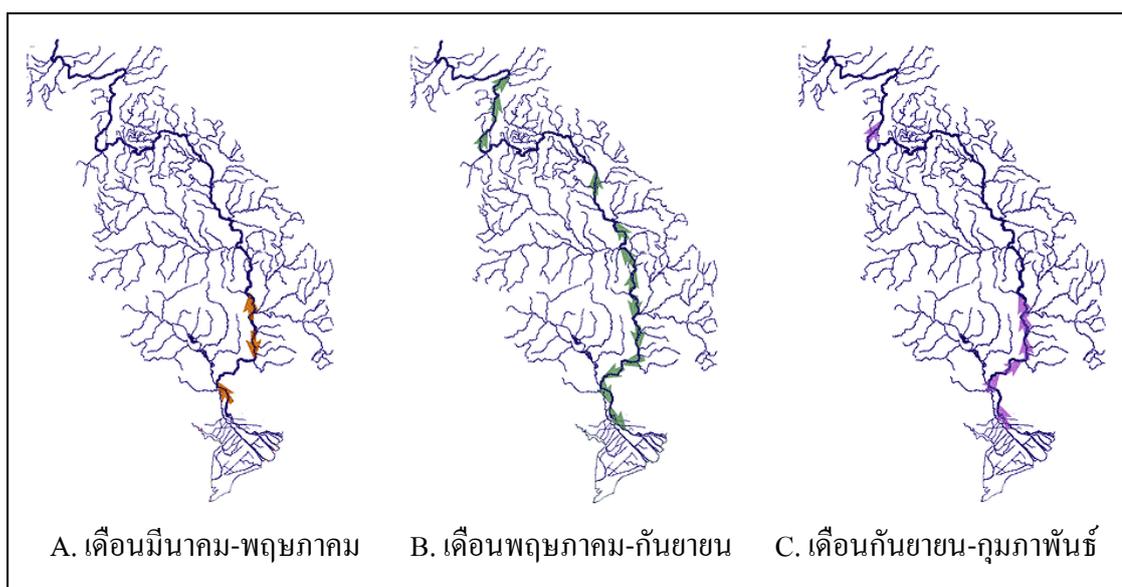
โครงสร้างทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

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 จากศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติทั้ง 6 ประชากร พบว่ามีค่าปานกลาง ค่าเฉลี่ย F_{ST} เท่ากับ 0.062 และแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าประชากรปลาเทโพที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อย ซึ่งระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพนี้มีค่าต่ำเมื่อเทียบกับปลาแม่น้ำ เช่น ปลา European grayling ($F_{ST} = 0.394$) (Gum *et al.*, 2003), cutthroat trout ($F_{ST} = 0.121$) (Wenburg *et al.*, 1998), brown trout ($F_{ST} = 0.279$) (Estoup *et al.*, 1998) bull trout ($F_{ST} = 0.659$) (Spruell *et al.*, 2003) และ jarabugo ($F_{ST} = 0.112$) (Salgueiro *et al.*, 2003) มีค่าใกล้เคียงกับ

ปลาซัลมอน (*Salmo salar*) ($F_{ST} = 0.057$) (Norris *et al.*, 1999), steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) ($F_{ST} = 0.05$) (Nielsen, 1999) และมีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลา 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 เนื่องจากการเก็บตัวอย่างอาจครอบคลุมระยะทางทางภูมิศาสตร์แตกต่างกัน

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ส่วนใหญ่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยประชากรปลาเทโพจากลุ่มน้ำเจ้าพระยาส่วนใหญ่มีพันธุกรรมแตกต่างกับประชากรจากลุ่มน้ำโขง เนื่องจากสภาพภูมิศาสตร์ของลุ่มน้ำทั้งสองสายนั้นแยกออกจากกันโดยสิ้นเชิง ทำให้ประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำทั้งสองไม่สามารถเข้ามาผสมกันได้ เมื่อพิจารณาแยกตามแม่น้ำพบว่าความแตกต่างของประชากรปลาเทโพภายในแม่น้ำเจ้าพระยา ($F_{ST} = 0.037$) มีค่าที่ต่ำกว่าประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำโขง ($F_{ST} = 0.078$) สาเหตุเพราะการเก็บตัวอย่างในแม่น้ำโขงครอบคลุมระยะทางไกลกว่า

ส่วนประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำโขงทุกประชากรมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกัน ซึ่งสอดคล้องกับการที่แต่ละประชากรอยู่ห่างกันมาก (รูปที่ 10) ทำให้โอกาสที่ปลาแต่ละประชากรจะอพยพมาผสมพันธุ์กันมีน้อยลง นอกจากนี้แล้วในแม่น้ำโขงยังมี Khone Fall ซึ่งเป็นน้ำตกกลางแม่น้ำอยู่บริเวณพรมแดนลาวกับเวียดนาม น้ำตกนี้เป็นอุปสรรคขัดขวางการอพยพของปลากลุ่ม Pangasiid บางชนิด เช่นปลาสาวยและปลาเทพา แต่มีรายงานจากการสอบถามชาวประมงว่าปลาเทโพสามารถอพยพผ่านน้ำตกแห่งนี้ได้ แต่จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าประชากรปลาเทโพมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าถึงแม้จะมีการอพยพผ่านได้ แต่ก็เกิดการถ่ายเทของยีนไม่มากพอ นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างของประชากรปลาเทโพจากศพจ.ยโสธรและศพจ.อุบลราชธานี



รูปที่ 10 แสดงการอพยพของปลาเทโพจากแม่น้ำโขง A. เดือนมีนาคม-พฤษภาคม,

B. เดือนพฤษภาคม-กันยายน, C. เดือนกันยายน-กุมภาพันธ์ (<http://www.mrcmekong.org>)

จากการวิเคราะห์ Mantel's test ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางพันธุกรรมและระยะทางความยาวของแม่น้ำของประชากรปลาเทโพจากลุ่มน้ำเจ้าพระยา แสดงว่าโครงสร้างทางพันธุกรรมในแต่ละลุ่มน้ำของประชากรปลาเทโพไม่ได้เป็นแบบ isolation-by-distance เนื่องจากปลาเทโพเป็นปลาที่มีการอพยพไปยังถิ่นวางไข่ และสามารถผสมพันธุ์กับประชากรอื่นที่มีแหล่งวางไข่ใกล้เคียงกัน ทำให้เกิดการถ่ายเทของยีนระหว่างประชากรและส่งผลให้ประชากรมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกัน ความแตกต่างของประชากรจึงขึ้นอยู่กับระยะทางทางภูมิศาสตร์และความถี่ในการอพยพกลับสู่ถิ่นของประชากร ซึ่งเป็นโครงสร้างทางพันธุกรรมแบบ Island model (Wright, 1978) และจากการวิเคราะห์ AMOVA แสดงว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพส่วนใหญ่เกิดขึ้นภายในแต่ละลุ่มน้ำ

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติ มีค่าระหว่าง 0.025 (ซีขนากับปทุมธานี-2) ถึง 0.131 (เชียงรายกับพิจิตร) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปลาแม่น้ำชนิดอื่น เช่น Atlantic sturgeon จากอเมริกาเหนือ ($D = 0.02-0.19$; King *et al.*, 2001) เป็นต้น เมื่อพิจารณาจากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพที่ศึกษานี้ พบว่าแบ่งตามลุ่มน้ำซึ่งสอดคล้องกับสภาพความเป็นจริงทางภูมิศาสตร์

จากแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์ MDS แสดงให้เห็นว่าประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักทั้งสองมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับประชากรพนมเปญ แสดงว่าประชากรเริ่มต้นของประชากรโรงเพาะฟักทั้งสองอาจมีแหล่งที่มาจากประชากรลุ่มน้ำโขงตอนล่าง และจากการทดสอบ Assignment ประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักทั้งสองกับประชากรจากธรรมชาติพบว่า มีแหล่งที่มาจากพนมเปญถึง 72.5-75%

การอนุรักษ์และการจัดการ

จากการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงข้อมูลระดับความหลากหลายทางพันธุกรรม ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติ ซึ่งข้อมูลนี้นับว่าสำคัญต่อการวางแผนการจัดการทรัพยากรและการจัด evolutionarily significant unit (ESU) โดย ESU นั้นเป็นการจัดหน่วยของประชากรที่มีการสืบพันธุ์แยกจากประชากรอื่นๆ (Waples, 1991) จากข้อมูลความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจะเห็นได้ว่า ประชากรปลาเทโพจากแหล่งน้ำธรรมชาติแบ่งออกเป็น 6 ESU ได้แก่ ประชากรจากลุ่มน้ำโขง 1) เชียงราย 2) พนมเปญ จากประชากรลุ่มน้ำเจ้าพระยาแบ่งออกเป็น 3) พิจิตร-1 4) พิจิตร-2 5) ชัยนาท และ 6) ปทุมธานี-2 ในการอนุรักษ์ประชากรปลาเทโพจากแต่ละแหล่งที่อยู่อาศัยจะต้องทำการจัดการไม่ให้ประชากรที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกันมาปะปนกัน และติดตามประชากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ เพราะการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม จะส่งผลกระทบต่อความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยังนำไปสู่การผสมเลือดชิด

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเทโพในประเทศไทย ด้วยเทคนิค ไมโครแซทเทลไลท์ สรุปได้ดังนี้

1. ไมโครแซทเทลไลท์ ไพรเมอร์ ที่พัฒนาจากปลาบึก ทั้ง 5 คู่ นี้ได้แก่ *Pg-2**, *Pg-3**, *Pg-6**, *Pg-13** และ *Pg-20** สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปลาเทโพได้เป็นอย่างดี มีความหลากหลายของยีนในทุกตำแหน่งที่ทำการศึกษาและอยู่ในสมคูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในทุกประชากร

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติ มีค่าปานกลาง โดยประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำเจ้าพระยามีค่าเท่ากับ $A = 5.4-9.4$; $A_e = 3.5-6.4$; $A_r = 4.0-5.5$; $H_o = 0.596 - 0.756$ และประชากรปลาเทโพจากแม่น้ำโขงมีค่าเท่ากับ $A = 6.6-8.0$; $A_e = 4.1-5.7$; $A_r = 4.7-6.1$; $H_o = 0.599 - 0.700$ โดยประชากรปลาเทโพจากธรรมชาติทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง เท่ากับ 6.8 ค่าเฉลี่ย Allelic richness เท่ากับ 5.0 ค่าเฉลี่ย Effective number of allele เท่ากับ 4.7 และค่าเฉลี่ยค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต เท่ากับ 0.669

3. ประชากรปลาเทโพส่วนใหญ่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ยกเว้นประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟัก ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาเทโพจากธรรมชาติอยู่ในระดับปานกลาง (F_{ST} เท่ากับ 0.062) แสดงว่าประชากรปลาเทโพมีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อย มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 0.059

4. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพที่ศึกษานี้ แบ่งแยกออกเป็น 2 กลุ่มตามแหล่งน้ำ คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มจากแม่น้ำเจ้าพระยา ประกอบด้วยประชากรจังหวัดพิจิตร ชัยนาทกับปทุมธานี-2 ส่วนกลุ่มที่สองเป็นกลุ่มจากแม่น้ำโขง ประกอบด้วยประชากรจังหวัดพนมเปญและประชากรจากโรงเพาะฟัก โดยประชากรจังหวัดชียงรายจัดแยกออกนอกกลุ่ม

5. ประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักที่นำมาศึกษานี้ มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับประชากรจากแม่น้ำโขงและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าประชากรปลาเทโพจากแหล่งน้ำธรรมชาติ แสดงให้เห็นว่าได้เกิด genetic drift ในประชากร โรงเพาะฟัก

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปลาเทโพจะเห็นได้ว่าอยู่ในเกณฑ์ปานกลาง แสดงว่าประชากรปลาเทโพมีขนาดค่อนข้างใหญ่ ซึ่งความหลากหลายระดับนี้ก็คือว่าเพียงพอต่อประชากรปลาเทโพในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมต่อไปได้ ส่วนแนวคิดในการอนุรักษ์ก็ยังเป็นสิ่งจำเป็นเนื่องจากสภาพแวดล้อมของถิ่นที่อยู่อาศัยของปลาเทโพนับวันยิ่งเลวร้ายลง ซึ่งแนวทางในการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมและขนาดของประชากร โดยการปล่อยปลาจากการเพาะเลี้ยงลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ (Re-stocking) นั้น อาจยังไม่จำเป็น เพราะอาจเกิดผลเสียมากกว่าผลดี เนื่องจากการทำ Re-stocking โดยไม่ได้เตรียมพันธุ์ปลาที่เฉพาะต่อประชากรที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้นๆ จะทำให้พันธุกรรมของประชากรปลาที่มีอยู่เดิมเปลี่ยนแปลงไป โดยอาจทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรลดลงและลดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ดังนั้น ในการปล่อยปลาจากการเพาะเลี้ยงลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ จึงควรคำนึงถึงลักษณะทางพันธุกรรมของปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติและพันธุ์ปลาที่จะนำมาปล่อย โดยหลีกเลี่ยงการปล่อยที่จะไปลดความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างประชากรที่มีอยู่เดิม (Moritz, 1999)

ประชากรปลาเทโพจากโรงเพาะฟักที่นำมาศึกษานี้มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับประชากรจากลุ่มน้ำโขงและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าประชากรปลาเทโพจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ดังนั้นประชากรจากโรงเพาะฟักที่ศึกษานี้ไม่เหมาะสมที่จะปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ นอกจากนี้จากความสนใจที่จะเลี้ยงปลาเทโพเชิงพาณิชย์ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องสร้างประชากรปลาที่ปรับตัวเข้ากับสภาพการเพาะเลี้ยง หรือเรียกว่าเป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการ domestication ประชากรจากโรงเพาะฟักในการศึกษานี้ มีความหลากหลายของอัลลีลต่ำกว่าปลาในธรรมชาติ หากนำมาทำการ domestication ต่อไปจะทำให้ได้ประชากรที่มีความหลากหลายต่ำ ซึ่งจะส่งผลเสียต่อลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ จึงควรนำพ่อแม่ปลาจากธรรมชาติ มาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพิ่มเติม เพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมและหลีกเลี่ยงการผสมเลือดชิดภายในประชากรโรงเพาะฟัก

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ชวลิต วิทยานนท์ และสมศักดิ์ รุ่งทองใบสุริย์. 2536. พรรณปลาสวายและสังกะวาด (วงศ์ Schibeidae และ Pangaiidae) ของประเทศไทย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 23/2538. กองประมงน้ำจืด กรมประมง. 82 หน้า.
- วันเพ็ญ มินกาญจน์. 2528. ปลาไทยในสถานแสดงพันธุ์ปลาน้ำจืด. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. กรมประมง. หน้า 59.
- วิสุทธิ ใบไม้. 2536. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- _____. 2540. พันธุศาสตร์กับความหลากหลายทางชีวภาพ. ในรายงานการสัมมนาวิชาการ พันธุศาสตร์ ครั้งที่ 10 เรื่อง พันธุศาสตร์กับการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมไทย วันที่ 19-21 มีนาคม 2540. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยร่วมกับสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. หน้า 13-18.
- ศุภรัตน์ ฉัตรจริยเวศน์. 2538. เทโพ..ปลาเศรษฐกิจตัวใหม่ของจังหวัดอุบลราชธานี. วารสารการประมง 48(1): หน้า 17-23.
- สถิติการประมงแห่งประเทศไทย. 2547. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- สมเกียรติ พงษ์ศิริจันทร์, สมศักดิ์ รุ่งทองใบสุริย์ และธีระชัย พงศ์จรรยากุล. 2544. การเพาะพันธุ์ปลาเทโพ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 15/2544. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดศรีสะเกษ. กองประมงน้ำจืด. กรมประมง. 43 หน้า.
- อุทัยรัตน์ ฌ นคร. 2543. . สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 203 หน้า.

- Aliah, R.S., M. Takagi, S.M. Dong, C.T. Teoh and N. Taniguchi. 1999. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio*. **Fish. Sci.** 65(2): 235-239.
- Allendorf, F.W. 1986. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. **Zoo Biol.** 5: 181-190.
- _____, S.R. Phelps. 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. **Trans. Am. Fish. Soc.** 109: 537-543.
- Archie, J.W. 1985. Statistical analysis of heterozygosity data: independent sample comparisons. **Evolution** 39 (3): 623-637.
- Ayala, F.J. 1982. **Population and Evolutionary Genetics: A Primer.** The Benjamin Cummings Pub. Co. Inc. California. pp 268.
- 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, Bryconinae) using microsatellites. **Aquaculture** 247: 51-65.
- Barua, S., M.S. Alam, Md.M.R. Khan and V. Simonsen. 2004. Genetic variation in four hatchery populations 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.

- Beaumont, M.A. and M.W. Bruford. 1999. **Microsatellites in conservation genetics**. In: Goldstein, D., C. Schlotterer, (Eds.), *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York, pp. 165–182.
- Bentzen, P., C.T. Taggart, D.E. Ruzzante and D. Cook. 1996. Microsatellite polymorphism and the population structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the northwest Atlantic. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 53: 2706-2721.
- Bernatchez, L., J.G. Rhydderch, F.W. Kircheis. 2002. Microsatellite gene diversity analysis in landlocked Arctic char from Main. **Trans. Am. Fish. Soc.** 131: 1106–1118.
- Cavalli-Sforza, L.L and A.W.F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedure. **Evolution** 21: 550-570.
- 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.
- Corujo, M., G. Blanco, E. azquez and J. A. Sanchez. 2004. Genetic structure of northwestern Spanish brown trout (*Salmo trutta* L.) populations differences between microsatellite and allozyme loci. **Hereditas** 141(3): 258-271.
- Cross, T.F., J. Bailey, G. Friars and F. O'Flynn. 1993. **Salmon in the sea and new enhancement strategies**. In: Mills, D. (Ed.), *Fishing News Books*, Oxford. 432 p.
- 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.
- Ellegren, H., C.R. Primmer and B.C. Sheldon. 1995. Microsatellite evolution: directionality or bias. **Nature Genetics** 11: 360–362.

- 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. 1983. **Introduction to Quantitative Genetics**. Second Ed. Longman Group Limited Publ. 340 p.
- Felsenstein, J. 1993. **PHYLIP** (phylogeny inference package) version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Frankham, R., J.D. Ballou and D.A. Briscoe. 2002. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University. 617 p.
- Galbusera, P., F. Volckaert, B. Hellemans and F. Ollevier. 1996. Isolation and characterisation of microsatellite markers in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Mol. Ecol.** 5: 703-705.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **J. Heredity**. 86: 485-486.
- 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. **Conservation Genetics** 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.
- Halliburton, R. 2004. **Introduction to Population Genetics**. Pearson Education International, New Jersey. pp 650.

- Hedrick, P.W. 2000. **Genetics of populations**. Boston, Mass : Jones and Bartlett, 553 p.
- Hogan, Z.S. and B.P. May. 2002. Twenty-seven new microsatellites for the migratory Asian catfish family Pangasiidae. **Mol. Ecol. Notes**. 2: 38-41.
- Hurlbert, S.H. 1971. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. **Ecology** 52: 577-586.
- Jarne, P. and P.J. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. **TREE**.11. 10: 424-429.
- Kamonrat, W. 1996. Spatial Genetic Structure of Thai Silver Barb *Puntius gonionotus* (Bleeker) Population in Thailand. Ph.D. Thesis, Dalhousie University, Halifax, Canada, 213 p.
- Kimura, M. and J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics** 49: 725-738.
- King, T.L., B.A. Lubinski and A.P. Spidle. 2001. Microsatellite DNA variation. in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) and cross-species amplification in the Acipenseridae. **Conservation Genetics**. 2: 103-119.
- 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. **Aquatic Living Resources** 16: 421-431.
- Lessa, E. 1990. Multidimensional analysis of geographic genetic structure. **Syst. Zoo.** 39 (3): 242-252.

- Liu, Z.J. and J.F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture** 238: 1-37.
- Mekong River Commission. 2005. Available Source: http://www.mrcmekong.org/programmes/fisheries/mig_pangasius_1.htm, October 8, 2006.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research** 27: 209-220.
- May, B. and C.C. Krueger. 1990. Use of allozyme data for population analysis. pp. 157-172. *In*. D.H. Whitmore (ed.), Electrophoretic and isoelectric focusing techniques in fisheries management. **CRC Press**.
- McConnell, S.K., P. O'Reilly, L. Hamilton, J.M. Wright and P. Bentzen. 1995. Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiation of North American and European populations. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 52: 1863-1872.
- Miller, M. 1997. **Tools for population genetic analices (TFPGA) 1.3**: A windows program for analysis of allozyme and molecular population genetic data. <http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm>.
- Moritz, C. 1999. Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. **Hereditas** 130 (3): 217-228.
- Morris, D.B., K.R. Richard and J. M. Wright. 1996. Microsatellites from rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 53: 120-126.

- Na-Nakorn, U., W. Kamonrat and T. Ngamsiri. 2004. Genetic diversity of walking catfish, *Clarias macrocephalus*, in Thailand and evidence of genetic introgression from farmed *C. gariepinus*. **Aquaculture** 240: 145-163.
- _____, 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 (4): 1174–1176.
- Neff, B.D., P.Fu, and M.R. Gross. 1999. Microsatellite evolution in sunfish (Centrarchidae) . **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 56: 1198–1205.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 23: 341-369.
- Ngamsiri, T., Y. Ohashi, N. Sukumasavin, M. Nakajima, U. Na-Nakorn and N. Taniguchi. 2006. Characterization of microsatellite DNA markers in a critically endangered species, Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas*. **Mol. Ecol. Notes**. 6 (2): 313–315.
- 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.
- O'Reilly, P. and J.M. Wright. 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. **J. Fish Biol.** 47: 29-55

- Pemberton, J.M., J. Slate, D.R. Bancroft and J.A. Barrett. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. **Mol. Ecol.** 4: 249-252.
- Pouyaud, L., G.G. Teugels and M. Legendre. 1999. Description of a new Pangasiid Catfish from Southeast Asia (Siluriformes). **Cybium** 23: 247-258.
- 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): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Heredity** 86: 248-9.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution** 43: 223-225.
- Roberts, T.R. and C. Vidthayanon. 1991. Systematic revision of the Asian catfish family Pangasiidae, with biological observations and descriptions of three new species. **Proc. Acad. Nat. Sci. Philad.** 143: 97-144.
- _____. 1993. Artisanal fisheries and fish ecology below the great waterfalls of the Mekong River in southern Laos. **Nat. Hist. Bull. Siam Soc.** 41:31-62.
- Salgueiro, P., G. Carvalho, M.J. Collares-Pereira and M.M. Coelho. 2003. Microsatellite analysis of genetic population structure of the endangered cyprinid *Anaocypris* in Portugal: implications for conservation. **Biol. Conser.** 109: 47-56.
- Schlotterer, C. and D. Tautz. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nuc. Acid Res.** 20: 211-215.

- Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. **ARLEQUIN** Version 2.000. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Slatkin, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution** 39 (1): 53-65.
- _____. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science** 236: 787-792.
- Smith, H.M. 1945. **The Fresh water Fish of Siam, or Thailand**. United States Government Printing Office, Washington. 622 pp.
- 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. 1981. **Biometry**, 2nd ed. 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. **Conservation Genetics** 4: 17-29.
- Taggart, J.B., R.A. Hynes, P.A. Prodohl and A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. **J. Fish. Biol.** 40: 963-965.
- Triantafyllidis, A., F. Krieg, C. Cottin, T.J. Abatzopoulos, C. Triantafyllidis, R. Guyomard. 2002. Genetic structure and phylogeography of European catfish (*Silurus glanis*) populations. **Mol. Ecol.** 11: 1039-1055.

- Usmani, S., S.G. Tan, S.S. Siraj and K. Yusoff. 2003. Population structure of the Southeast Asian river catfish *Mystus nemurus*. **Anim. Genet.** 34: 462–464.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills and P. Shipley. 2004. **MICRO-CHECKER**: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Mol. Ecol. Notes.** 4: 535–538.
- Waldbieser, G.C. and B.G. Bosworth. 1997. Cloning and characterization of microsatellite loci in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Anim. Genet.** 28: 295-298.
- Waples, R. S. 1991. Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp., and the definition of "species" under the Endangered Species Act. **Mar. Fish. Rev.** 53: 11-22.
- Waples, R. S. and P.E. Smouse. 1990. Gametic disequilibrium analysis as a means of identifying mixtures of salmon populations. **Am. Fish. Soc. Symp.** 7: 439-458.
- Was, A. and R. Wenne. 2002. Genetic differentiation between hatchery and wild sea trout (*Salmo trutta*) in the Southern Baltic at microsatellite loci. **Aquaculture** 204: 493-506.
- Waters, J.M., J.M. Epifanio, T. Gunter, and B.L. Brown. 2000. Homing behavior facilitates subtle genetic differentiation among river populations of *Alosa sapidissima*: microsatellites and mtDNA. **J. Fish Biol.** 56 (3): 622-636.
- Weber, J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n.(dC-dT)_n polymorphisms. **Genomics** 7: 517-524.
- Weir, B.S. and C.C. Cockerham. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** 38 (6): 1358-1370.

- Wenbug, 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.
- Wilkinson, L., M. Hill, J.P. Welna and G.K. Birkenbeuel. 1992. **SYSTAT**: Statistics, version 5.02 for Windows. SYSTAT Inc., Evanston, Illinois.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. **Genetics** 28: 114-138.
- Wright, J.M., 1993. DNA fingerprinting in fishes. In Hochachka, P.W. and T.P. Mommsen ed., Biochemistry and molecular biology of fishes **Elsevier** 2: 57-91.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. **Ann. Eugen.** 15: 313-354.
- Wright, S. 1978. **Evolution and the Genetics of Populations**. Vol. 4: Variability within and among Natural Populations. Chicago: University of Chisago Press.
- Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle. 1999. **POPGENE Version 1.31**, microsoft windows-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada.

ภาคผนวก

คำอธิบายสัญลักษณ์ คำย่อและอักษรย่อ

bp	= base pair
°C	= degree celcius
dH ₂ O	= deionized water
dNTPs	= deoxynucleoside triphosphate
EDTA	= ethylenediamine tetraacitic acid
HCl	= hydrochloric acid
M	= molar
MgCl ₂	= Magnesium Chloride
µg	= microgram (s) (10 ⁻⁶)
µl	= microliter (s)
µM	= micromolar
mA	= milliampere
mg	= milligram (s)
ml	= mililiter (s)
mm	= millimeter
mmol	= millimole (s) (10 ⁻³)
mM	= millimolar
M	= molar
ng	= nanogram (s) (10 ⁻⁹)
PCR	= Polymerase Chain Reaction
<i>Taq</i>	= <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	= Tris-Borate-EDTA buffer
TE	= Tris-EDTA buffer
TNES	= Tris-NaCl-EDTA-Sodium dodesylsulfate
3'	= carbon atom 3 of deoxyribose
5'	= carbon atom 5 of deoxyribose
%	= percent

การทำ Agarose gel electrophoresis (เสาวนีย์, 2536)

1. การเตรียมสารเคมี

1.1 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

1.2 Loading buffer

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

1.3 สีย้อม ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 µg/ml

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

2. วิธีการ

2.1 ประกอบถาดหล่อเจลเข้ากับ comb เพื่อให้เจลที่แข็งตัวมีช่อง (wells) ซึ่งใช้สำหรับหยอดตัวอย่าง DNA

2.2 ชั่ง agarose 0.42 กรัมลงใน flask เติบบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่าจนได้ปริมาตร 35 ml จะได้ agarose ความเข้มข้น 1.2%

2.3 ละลาย agarose โดยนำเข้าตู้ไมโครเวฟนานประมาณ 1 นาที เมื่อเดือดให้นำออกมาเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำเข้าตู้ไมโครเวฟอีกครั้ง ทำซ้ำดังกล่าวอีก 2-3 ครั้ง จนกว่า agarose ละลายจนสารละลายจะใส

2.4 ปล่อยสารละลายเจลทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุ่น นำไปเทลงบนถาดหล่อเจลโดยระวังมิให้มี ฟองอากาศเกิดขึ้น ทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัวและเย็น

2.5 ดึง comb ออกจากเจล ดึงแผ่นเจลขึ้น นำไปวางใน electrophoresis chamber โดยหันด้านที่มี ช่องหยอดตัวอย่างไปทางขั้วลบ

2.6 เติมบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่าลงใน electrophoresis chamber จนท่วมผิวหน้าเจลขึ้นมา 2 มิลลิเมตร

2.7 ผสม loading buffer กับตัวอย่าง DNA อัตราส่วน 2.5 ต่อ 7.5 μl (1 ช่อง well ใส่สารละลายได้ 10 μl) บนแผ่นพาราฟิน ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครไปเปตดูดตัวอย่างขึ้นลง แล้วนำไปหยอดลงในช่องบนเจล ส่วน DNA size marker ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ λ hindIII digest (Sigma, Germany) และ Phi χ (Promega, USA)

2. ปิดฝา electrophoresis chamber ต่อขั้วไฟฟ้า แล้วเปิดสวิทช์ปล่อยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 50 , 100 โวลต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าไหลจากขั้วลบไปหาขั้วบวก ตามความยาวของแผ่นเจล

2.9 สังเกตที่สีของ loading buffer เมื่อสีเคลื่อนที่ค่อนข้างไปทางด้านปลายของแผ่นเจล ให้หยุดปล่อยกระแสไฟฟ้า

2.10 นำแผ่นเจลออกไปย้อมสี โดยนำไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide นาน 15 นาที เมื่อครบกำหนดตัดแผ่นเจลขึ้นนำไปล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 10 นาที (ระวังมิให้ ethidium bromide ถูกร่างกาย)

2.11 นำแผ่นเจลมาส่องดูแถบ DNA ที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV ด้วย UV Transilluminator ถ่ายรูปแถบ DNA ที่เกิดขึ้นโดยใช้กล้องถ่ายภาพโพลาไรซ์ นำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์ผลต่อไป

Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

1. สารละลาย

1.1 40% acrylamide gel (19:1) (1,000 ml)

acrylamide gel	380	g.
bis- acrylamide	20	g.

1.2 4.5% acrylamide gel (1,000 ml)

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

1.3 4.5% denaturing acrylamide gel

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

2. การเตรียมกระจก

2.1 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

2.2 ประกอบแผ่นกระจกเข้ากับ chamber โดยคั่นด้วย spacer ซึ่งทำให้เกิดช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกและ chamber

2.3 เทสารละลายเจลลงในแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ โดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น แล้วสอด shark's tooth plate ทางด้านเรียบลงในสารละลายเจลที่อยู่ระหว่างกระจกให้ความลึกประมาณ 0.5 cm

2.4 ทิ้งเจลไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิด polymerization ไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง

3. การแยกขนาดแถบดีเอ็นเอ

3.1 ดึงซีหัวีออก และประกอบกระจกเข้ากับเครื่อง แล้วสอด shark's tooth plate ด้านปลายแหลมเข้าไปด้านบนของเจลให้ปลายแหลมของซีหัวีแตะที่ผิวเรียบของเจลพอดี

3.2 ผ่านกระแสไฟฟ้า 100 วัตต์ ในเจล นานประมาณ 15-30 นาที

3.3 ทำให้ผลผลิตพีซีอาร์เสียสภาพโดยให้ความร้อนที่ 95°C นานประมาณ 3 นาที และแช่บนน้ำแข็งทันที

3.4 ทำความสะอาดช่องหยอดตัวอย่างด้วย 10X TBE ก่อนหยอดตัวอย่าง จากนั้นหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 3.5 μ l ลงในช่องหยอดตัวอย่าง

3.5 ผ่านกระแสไฟฟ้า 60 วัตต์ ในเจลนานประมาณ 1-2 ชั่วโมง

3.6 ตรวจสอบผลการแยกแถบดีเอ็นเอด้วย staining ต่อไป

การย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining

1. สารเคมี

1.1 staining solution (1,000 ml)

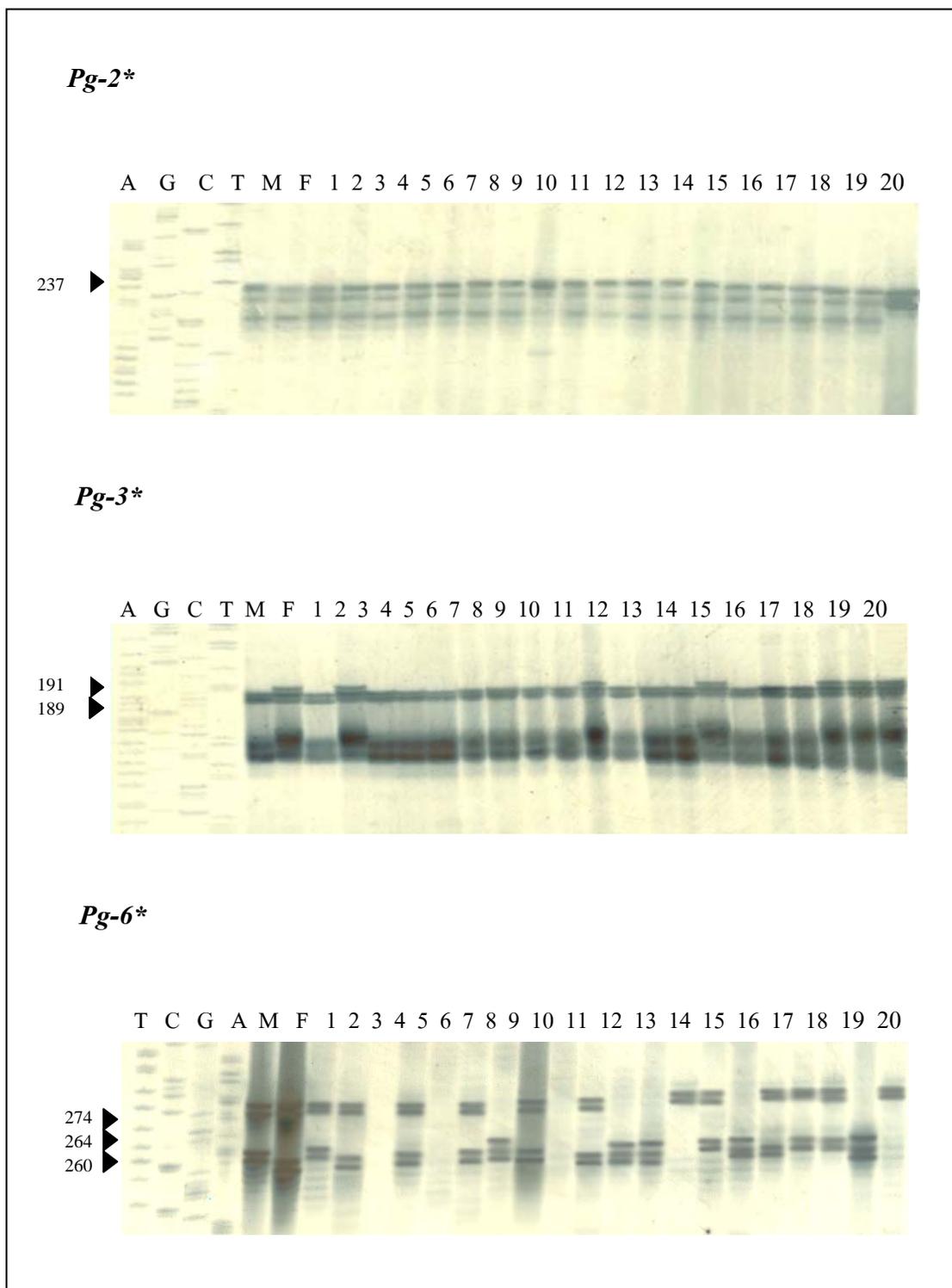
silver nitrate	1	g
3.7% formaldehyde	1.5	ml

1.2 developing solution (1,000 ml)

Anhydrous Na ₂ CO ₃	30	g
3.7% formaldehyde	1.5	ml
10 mg/ml Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O	200	μ l

2. วิธีการ

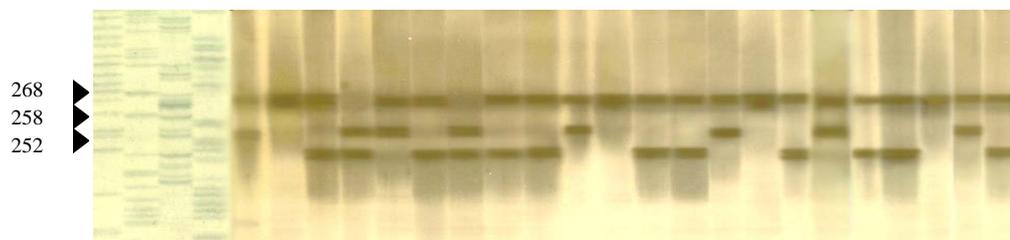
- 2.1 นำแผ่นกระจกวางลงในถาดสำหรับการย้อม โดยให้ด้านหน้าเจลหงายขึ้น
- 2.2 ตรึงชิ้นดีเอ็นเอบนแผ่นเจลด้วย 10% gracial acetic acid นาน 20 นาที โดยเขย่าถาดย้อมตลอดเวลา
- 2.3 ล้างถาดด้วยน้ำเปล่า 3 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที โดยเขย่าถาดย้อมตลอดเวลา
- 2.4 ย้อมเจลด้วย staining solution ปริมาณ 1 ลิตร นาน 30 นาที โดยเขย่าถาดย้อมตลอดเวลา
- 2.5 ล้างด้วยน้ำเปล่า 1 ครั้ง โดยให้น้ำผ่านเจลแล้วเททิ้งทันที โดยขั้นตอนนี้ไม่ควรทำเกิน 10 วินาที
- 2.6 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยแช่พานกระจกใน developing solution ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 ลิตร เขย่าจนเห็นแถบดีเอ็นเอ
- 2.7 จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution (10% gracial acetic acid ที่ใช้ในข้อ 2) นาน 2-3 นาที
- 2.8 ล้างด้วยน้ำเปล่าอีก 2 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที โดยเขย่าถาดย้อมตลอดเวลา ผึ่งกระจกให้แห้ง ก่อนนำกระจกไปอ่านผล



ภาพผนวกที่ 1 แสดงการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์ในครอบครัวปลาเทโพ (A, G, C, T = M13 sequence, M = พ่อปลาเทโพ, F = แม่ปลาเทโพ, 1-20 = ลูกปลาเทโพ)

Pg-13*

T C G A 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M F

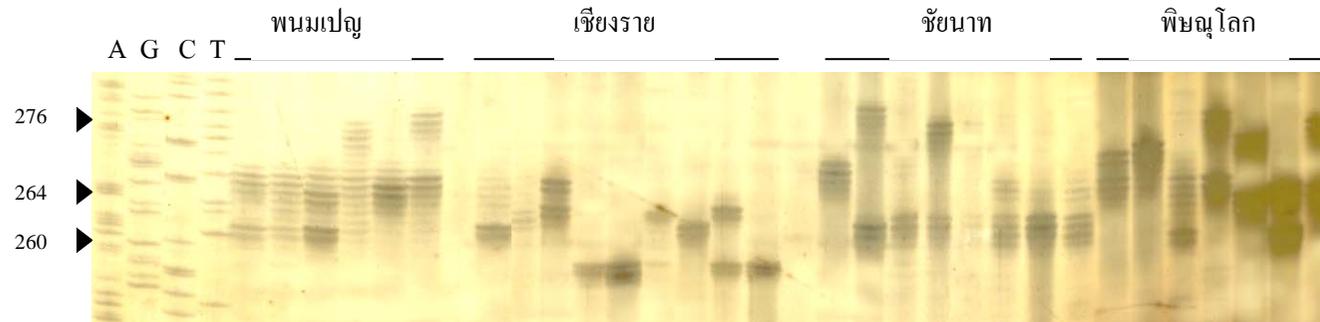
***Pg-20****

A G C T 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 F M

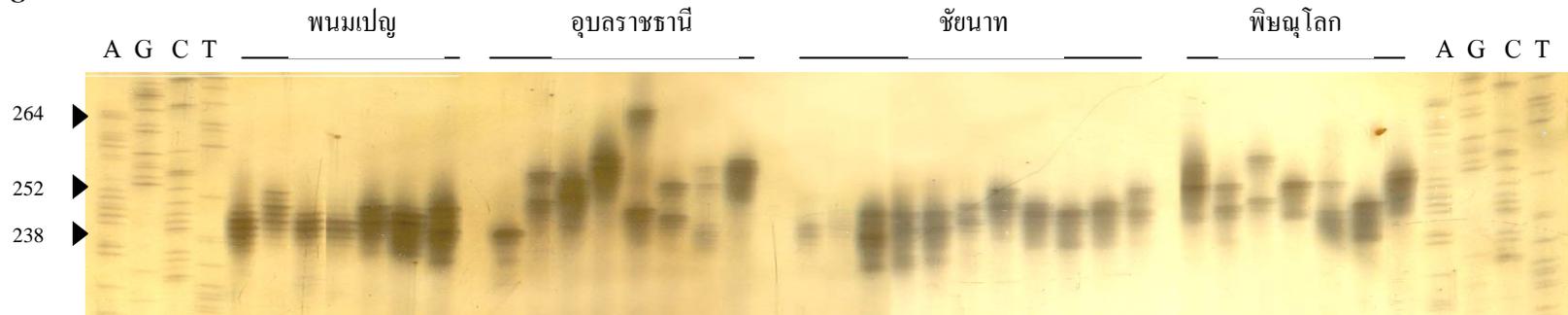


ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)

*Pg-6**



*Pg-13**



ภาพผนวกที่ 2 (ต่อ)

