



วิทยานิพนธ์

ความหลากหลายทางไมโครแซทเทลไลต์พันธุกรรม
ในประชากรกึ่งก้ามกรามจากโรงเพาะฟักและธรรมชาติ

**MICROSATELLITE GENETIC VARIATION OF HATCHERY
AND WILD POPULATIONS OF FRESHWATER PRAWN,
*Macrobrachium rosenbergii***

นางสาวกัญทิพย์ เจริญทวิ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายทางไมโครแซทเทลไลท์พันธุกรรมในประชากรกุ้งก้ามกราม
จากโรงเพาะฟักและธรรมชาติ

Microsatellite Genetic Variation of Hatchery and Wild Populations of Freshwater Prawn,
Macrobrachium rosenbergii

นามผู้วิจัย นางสาวกัณฐรีย์ เจริญทวี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุภาวดี พุ่มพวง, Ph.D.)

กรรมการ

(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุวิทย์ ธีญกิจจานุกิจ, Dr.Scient)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายทางไมโครแซทเทลไลท์พันธุกรรมในประชากรกึ่งก้ามกราม
จากโรงเพาะฟักและธรรมชาติ

Microsatellite Genetic Variation of Hatchery and Wild Populations of Freshwater Prawn,
Macrobrachium rosenbergii

โดย

นางสาวกัณฐิย์ เจริญทวี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2550

กัณห์ธีร์ เจริญทวี 2550: ความหลากหลายทางไมโครแซทเทลไลท์พันธุกรรมใน
ประชากรกึ่งก้ามกรามจากโรงเพาะฟักและธรรมชาติ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับ
บัณฑิตศึกษา ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุภาวดี พุ่มพวง, Ph.D.
66 หน้า

การเพาะเลี้ยงกึ่งก้ามกรามในประเทศประสบปัญหาผลผลิตต่ำแม้ว่าจะมีการขยายตัวของการเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในระยะเวลาไม่กี่ปีที่ผ่านมา โดยคาดว่าน่าจะมีสาเหตุจากความเสื่อมของพันธุกรรมและการผสมเลือดชิด ทำให้กึ่งจากโรงเพาะฟักมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง งานวิจัยนี้ได้ใช้ไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกึ่งก้ามกรามจากโรงเพาะฟัก 5 ประชากร และจากธรรมชาติ 2 ประชากร โดยเก็บตัวอย่างประชากรธรรมชาติจากแม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำกระบุรี เก็บตัวอย่างประชากรโรงเพาะฟักที่มีถิ่นกำเนิดจากแม่น้ำเจ้าพระยาจากจังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี และประเทศอินโดนีเซีย และเก็บตัวอย่างประชากรนำเข้าจากประเทศพม่าในฟาร์มเพาะเลี้ยงจังหวัดนครปฐม และประชากรที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์จากโรงเพาะฟักจังหวัดราชบุรี จากการศึกษาพบว่าประชากรธรรมชาติและโรงเพาะฟักทุกประชากรมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง โดยมีค่าเฉลี่ย allelic richness เท่ากับ 6.34-9.37 อัลลิลต่อตำแหน่ง ค่าคาดหมายเฮเทอโรไซโกตทุกตำแหน่งมีค่า 0.64-0.73 โดยพบว่าค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกตต่ำกว่าค่าคาดหมายเฮเทอโรไซโกตในทุกประชากร ยกเว้นประชากรนำเข้าจากประเทศพม่า ส่วนการเปรียบเทียบความแตกต่างของประชากร และค่า F_{ST} แสดงความแตกต่างของทุกประชากรอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อจัดความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกึ่งก้ามกรามด้วยแผนผัง UPGMA สามารถจัดได้ 4 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่หนึ่งประกอบด้วย 4 ประชากร คือประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยา และประชากรโรงเพาะฟักที่มีถิ่นกำเนิดจากแม่น้ำเจ้าพระยาทั้ง 3 ประชากร กลุ่มที่สอง คือประชากรแม่น้ำกระบุรี กลุ่มที่สาม คือประชากรนำเข้าจากประเทศพม่า และกลุ่มที่สี่ คือประชากรโรงเพาะฟักจังหวัดราชบุรีซึ่งมีพันธุกรรมที่ห่างไกลจากประชากรอื่นอย่างชัดเจน

Kancee Charoentawee 2007: Microsatellite Genetic Variation of Hatchery and Wild Populations of Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Supawadee Poompuang, Ph.D. 66 pages.

The culture of freshwater prawn in central Thailand has experienced low productivity despite the rapid expansion during the past several years. Deterioration of genetic variation and inbreeding depression were blamed for slow growth rate in farmed stocks. Six microsatellite DNA loci were used to assess genetic diversity from five hatchery stocks and two wild populations of freshwater prawn. Natural populations were collected from the ChaoPraya River and the Kraburi River. Two local hatchery populations originated from the ChaoPraya River were collected from the provinces of Nakhon Pathom and Suphan Buri. Another ChaoPraya originating samples were obtained from a hatchery in Indonesia. An introduced stock of Myanmar origin was sampled from a hatchery in Nakhon Pathom province and samples of a commercial strain of unknown origin were collected in Ratchaburi province. All hatchery and wild populations exhibited relatively high genetic variation and were similar with an average allelic richness varied from 6.34 to 9.37 and average expected heterozygosities at all loci of 0.64 to 0.73. Observed heterozygosities were lower than expected in most populations except that from a hatchery stock of Myanmar origin. Pair-wise comparisons and the F_{ST} values revealed significant genetic differentiation across all populations. The UPGMA dendrogram displayed genetic relationship of four different groups. One group consisted of four populations including those from the ChaoPraya River, two local hatcheries and a hatchery in Indonesia. The wild population from the Kraburi River and the hatchery population of Myanmar were in second and third groups respectively. The fourth group, the hatchery stock from Ratchaburi province was most genetically distant from the other groups.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุภาวดี พุ่มพวง ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้การสนับสนุน คำปรึกษา และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมทั้งขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุริยัน ธีฎกิจจานุกิจ กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และ ดร.วงศ์ปฐม กมลรัตน์ รวมทั้งรองศาสตราจารย์ธีระพล ศิริณฤมิตร ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำ แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรภายใต้โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่สนับสนุนทุนการศึกษา และขอขอบคุณโครงการเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้สนับสนุนงบประมาณในงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณ Dr.Hugo Volkaert อาจารย์ประจำศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ห้อง A312 ที่ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ภายในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งคุณศิริพร แจ่มสุทธีรวัฒน์ ที่ช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ในงานวิจัย และขอขอบคุณศรจิรรยา สุขมนโนมนต์ คุณเกตุณภัส ศรีไพโรจน์ ที่ช่วยสอนเทคนิค และวิธีการต่าง ๆ ในการทำงาน รวมทั้งเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง และห้องปฏิบัติการ A311 ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำงานตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องทุกท่านที่เป็นกำลังใจให้เสมอจนกระทั่งวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี ประโยชน์อันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอมอบแด่คุณพ่อ และคุณแม่ ผู้ซึ่งสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้าอย่างดีที่สุดเสมอมา

กัณห์กริช เจริญทวี

พฤษภาคม 2550

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
วิธีการ	13
ผลการทดลอง	21
วิจารณ์ผล	48
สรุปและข้อเสนอแนะ	52
สรุป	52
ข้อเสนอแนะ	53
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	54
ภาคผนวก	60
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	66

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชื่อย่อประชากร แหล่งที่เก็บตัวอย่าง และประวัติสายพันธุ์กึ่งก้ามกรามที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งจำนวนตัวอย่างกึ่งก้ามกรามที่ใช้ในการศึกษา	16
2	ลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์จำนวน 11 คู่	18
3	ลำดับเบสซ้ำ (core sequence) อุณหภูมิ annealing (T_A) จำนวนอัลลิล และผลผลิตของพีซีอาร์ (bp)	22
4	ยีนโทพของพ่อ แม่ และสัดส่วนยีนโทพของลูกกึ่งก้ามกราม จำนวน 2 ครอบครัว เพื่อศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์	23
5	จำนวนประชากร จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง (A) ค่าเฉลี่ยอัลลิลต่อตำแหน่ง ค่า Allelic richness (A_r) ค่าเฉลี่ยสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o) และค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี (H_e)	42
6	การทดสอบสมมูลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ซึ่งตัวเลขในตารางแสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ (P -value)	43
7	การทดสอบ Linkage disequilibrium	44
8	การทดสอบความแตกต่างของประชากร	45
9	ค่า pairwise F_{ST} (เหนือเส้นทแยงมุม) และค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Nei's genetic distance)	46
10	ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ F_{ST} ในไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่ง	46
ตารางผนวกที่		
1	ความถี่อัลลิลของไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่งในกึ่งก้ามกราม 7 ประชากร	63

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	แหล่งที่เก็บตัวอย่างของกิ้งก่ามกรามทั้ง 7 ประชากร
2	การถ่ายทอดไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ 6 ตำแหน่งในกิ้งก่ามกราม 2 ครอบครัว เปรียบเทียบขนาดกับ M13 sequence ladder (A G C T) (F = แม่กิ้งก่ามกราม, 1-20 = ลูกกิ้ง)
3	ความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 6 ตำแหน่งในประชากรกิ้งก่ามกราม
4	แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

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

**ความหลากหลายทางไมโครแซทเทลไลท์พันธุกรรมในประชากรกุ้งก้ามกราม
จากโรงเพาะฟักและธรรมชาติ**

**Microsatellite Genetic Variation of Hatchery and Wild Populations of
Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii***

คำนำ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ทั้งเพื่อการบริโภคในประเทศ และการส่งออก จากรายงานของกรมประมงในปี 2547 ผลผลิต กุ้งก้ามกราม มีปริมาณ 32,583 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 3,800 ล้านบาท แนวโน้มผลผลิตของ กุ้งก้ามกรามมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นทุกปี แต่ก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ ซึ่ง 80% ของผลผลิต ทั้งหมดมาจากการเลี้ยงในภาคตะวันตกของประเทศ ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี และ ราชบุรี และมีมูลค่าของผลผลิตประมาณ 3,000 ล้านบาท การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในภาคตะวันตกมี ศักยภาพสูงที่จะพัฒนาเป็นระดับเกษตรอุตสาหกรรม แต่อุปสรรคในการพัฒนากุ้งก้ามกรามให้เป็น สินค้าเกษตรอุตสาหกรรม คือผลผลิตมีปริมาณไม่สม่ำเสมอ นอกจากนั้นการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ในปัจจุบัน เกษตรกรตั้งข้อสังเกตว่ากุ้งก้ามกรามมีการเจริญเติบโตลดลง ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานที่ แน่ชัดว่าการเจริญเติบโตที่ลดลงนี้เกิดเนื่องจากสาเหตุใด ซึ่งเกษตรกรคาดว่าอาจเป็นผลจากการ ผสมเลือดชิดระหว่างพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ใช้ฟักเพาะทำให้เกิดการเสื่อมของพันธุกรรม หรืออาจ เป็นผลจากความเสื่อมโทรมของบ่อเลี้ยงและการจัดการฟาร์มที่ไม่ถูกต้อง อนึ่งการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ในภาคตะวันตกของประเทศไทยนั้น เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้ลูกกุ้งจากโรงเพาะฟักที่ผลิตจากสายพันธุ์ ท้องถิ่นที่มีแหล่งกำเนิดจากแม่น้ำเจ้าพระยา และโรงเพาะฟักบางแห่งได้นำพ่อแม่พันธุ์กุ้งสายพันธุ์ ต่างถิ่นจากประเทศเพื่อนบ้าน เช่น พม่า เพื่อแก้ปัญหากุ้งโตช้า

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นดัชนีบ่งชี้ ความหลากหลายของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับ การเจริญพันธุ์และการรอดตายในประชากร และศักยภาพของประชากรนั้น ๆ สำหรับการคัดพันธุ์ ลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น การเจริญเติบโตและความต้านทานโรค แม้ว่าการเพาะเลี้ยงกุ้ง ก้ามกรามในประเทศไทยได้ดำเนินมากกว่า 40 ปีแล้ว แต่ยังไม่มียารายงานถึงการศึกษาความหลากหลายทาง พันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามประชากรต่าง ๆ ที่ใช้ในโรงเพาะฟัก โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ใช้แพร่หลาย ในภาคตะวันตกของประเทศไทย

ไมโครแซทเทลไลต์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายของอัลลีลสูง มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการเฝ้าระวังและประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรโรงเพาะฟัก เพื่อป้องกันการเสื่อมของพันธุกรรมที่อาจเกิดจากการจัดการพ่อแม่พันธุ์ที่ไม่ถูกต้องหรือการผสมเลือดชิด การศึกษาความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์ในกิ้งก่าGRAMสายพันธุ์ต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม และแบบแผนความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรกิ้งก่าGRAMในประเทศไทย เพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์หรือประชากรที่เหมาะสมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ และการเพาะเลี้ยงกิ้งก่าGRAM ในภาคตะวันตกอย่างยั่งยืนต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกิ้งก่ามรกตจากโรงเพาะฟัก
5 ประชากร และจากธรรมชาติ 2 ประชากร โดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ 6 ตำแหน่ง

การตรวจเอกสาร

ชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกราม กุ้งนาง หรือกุ้งหลวง เป็นสัตว์ที่อยู่ในครอบครัว Palaemonidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Macrobrachium rosenbergii* และชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า Giant freshwater prawn กุ้งก้ามกรามมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตอินโดแปซิฟิก มีการแพร่กระจายทั่วไปตามแหล่งน้ำจืดที่มีอาณาเขตติดต่อกับทะเล แหล่งน้ำกร่อยบริเวณปากแม่น้ำ ลำคลองและทะเลสาบ โดยเฉพาะในประเทศไทย เวียดนาม เขมร ไทย พม่า มาเลเซีย ปากีสถาน อินเดีย ศรีลังกา อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ในประเทศไทย เชิดชาย และธีรพันธ์ (2517) พบว่ากุ้งก้ามกรามมีการแพร่กระจายเกือบทั่วทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะในเขตแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำบางปะกง แม่น้ำแม่กลอง แม่น้ำจันทบุรี แม่น้ำตราด แม่น้ำปัตตานีและทะเลสาบสงขลา ยกเว้นในภาคอีสาน ส่วนในภาคเหนือพบเพียงแห่งเดียว คือ แม่น้ำเมย จังหวัดตาก ซึ่งเป็นสาขาย่อยของแม่น้ำสาละวิน ประเทศพม่า ทำให้สันนิษฐานว่ากุ้งก้ามกรามที่จับได้จากแม่น้ำเมยเป็นกุ้งที่อพยพมาจากพม่า

การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแต่เดิมนั้นต้องอาศัยกุ้งที่จับได้จากธรรมชาติ ซึ่งมีปริมาณไม่เพียงพอ ดังนั้นกรมประมงจึงเริ่มดำเนินการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามตั้งแต่ปี พ.ศ. 2504 และมีการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเรื่อยมา จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2512 สามารถเพาะเลี้ยงและอนุบาลลูกกุ้งวัยอ่อนได้ ในปี พ.ศ. 2523 กรมประมงได้ตั้งเป้าหมายในการส่งเสริม และขยายการเพาะเลี้ยง ลูกกุ้งก้ามกราม ให้แพร่หลายมากขึ้น ซึ่งนับว่าการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามได้พัฒนาขึ้นมากทั้งในภาครัฐบาล และภาคเอกชน (ประจวบ, 2527) อย่างไรก็ตาม ปริมาณกุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำธรรมชาตินั้นลดปริมาณลงอย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาเพียงไม่นาน เนื่องจากสาเหตุต่าง ๆ เช่น การทำประมงที่มากเกินไป หรือปัญหาจากมลภาวะเป็นพิษต่าง ๆ กรมประมงจึงมีนโยบายการเพาะเลี้ยงลูกกุ้งก้ามกราม รวมทั้งการปล่อยลูกกุ้งลงในแหล่งน้ำธรรมชาติ และสัตว์น้ำชนิดอื่นทุกปี เช่น ในปี พ.ศ. 2547 มีการปล่อยลูกกุ้งก้ามกรามลงในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วประเทศจำนวน 536 ล้านตัว (กรมประมง, 2547)

ในปัจจุบันการเพาะพันธุ์กุ้งก้ามกรามนั้นใช้วิธีรวบรวมแม่กุ้งไข่แก่ (สีเทาดำ หรือน้ำตาลดำ) จากฟาร์มเลี้ยงมาเพาะในโรงเพาะฟักขนาดกลางโดยไม่มีการคัดพันธุ์ ลูกกุ้งจะฟักเป็นตัวประมาณ 5 วัน วิธีนี้มีข้อดี คือ ไม่เสียค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ แต่จะมีแม่กุ้งที่มีไข่แก่เพียง 5-10 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนแม่กุ้งทั้งหมด ดังนั้นถ้าต้องการแม่กุ้งที่มีไข่แก่จำนวนมากจึงต้องรวบรวมจากบ่อเลี้ยงที่มีพื้นที่มาก อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสีย คือ อาจเกิดปัญหาการผสมเลือดชิด

เนื่องจากลูกที่ได้ อาจเกิดจากการผสมพันธุ์ของพ่อแม่ที่มีสายเลือดเดียวกันได้มาก (บุรณัตร์, 2547) ส่วนวิธีการเลี้ยงนั้นจะเป็นแบบทยอยจับ เนื่องจากกึ่งกำกรามีการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน เกษตรกรจะคัดเอากุ้งที่มีขนาดใหญ่ออกมาขายก่อน จากนั้นเลี้ยงต่อไปอีกจนกุ้งที่เหลือมีขนาดโตขึ้น (ชลอ, 2547) กึ่งกำกรามีการเลี้ยงมาเป็นเวลานาน โดยเฉพาะพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันตก แต่ส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงเพื่อบริโภคภายในประเทศประมาณ 70% มีเพียง 30% เท่านั้นเพื่อการส่งออก ทั้ง ๆ ที่ความต้องการกึ่งกำกรามีการส่งออกมีจำนวนมาก แต่ด้วยการเลี้ยงที่ยังไม่มีการพัฒนาทางวิชาการมากนัก การเลี้ยงกึ่งกำกรามีแบบดั้งเดิมทำให้เกิดปัญหาต่าง ๆ มากมาย จนทำให้กุ้งส่วนใหญ่มีคุณภาพไม่ได้มาตรฐานการส่งออก ขณะเดียวกันยังพบปัญหาที่กุ้งที่เลี้ยงโตไม่เท่ากัน กุ้งกินกันเอง และกุ้งเป็นโรคมามากขึ้น กุ้งที่เลี้ยงได้มีขนาดเล็กทำให้ผลผลิตลดลง เป็นต้น

ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (microsatellite DNA)

ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ หมายถึง ส่วนของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสซ้ำจำนวน 1-6 นิวคลีโอไทด์ มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 2 ซ้ำขึ้นไปไม่เกิน 100 ซ้ำ และแต่ละชุดซ้ำเรียงต่อกันอยู่ในทิศทางเดียวกันตลอด (tandem repeat) พบกระจายทั่วไปในจีโนม และมีความแปรปรวนในระดับสูง

ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ แบ่งได้ตามจำนวนซ้ำ (repeat) มี 3 แบบคือ Perfect repeat เป็นไมโครแซทเทลไลท์ที่มีชุดซ้ำเพียงแบบเดียวติดต่อกัน เช่น (CT)₂₀, (GAT)₂₀ ถ้ามีเบสอื่นแทรกอยู่ภายในทำให้ไม่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำ เรียกว่า Imperfect repeat เช่น (CT)₂₀AG(CT)₂₅ และสุดท้ายเป็นไมโครแซทเทลไลท์ที่ประกอบด้วยชุดซ้ำที่มากกว่า 1 ชุดติดต่อกัน (compound repeat) เช่น (CT)₂₀(GA)₂₀, (CAG)₂₀(AG)₂₀ เป็นต้น (Goldstein, 2001) ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีลำดับเบสซ้ำนี้แตกต่างกัน คาดว่าเกิดจากการเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์และ เนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำนี้เอง จึงมีชื่อเรียกว่า Simple Sequence Repeat (SSR), Short Tandem Repeat (STR), Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) และ Sequence Tagged Microsatellite Site (STMS)

ปัจจุบันมีการใช้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ในการศึกษาแผนที่จีโนม แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่ลูก (parentage assignment) เป็นต้น ข้อดีของการใช้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ คือเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างสูง เนื่องจากสามารถบอกให้ทราบถึง

สภาพ่วมร่วมกันของยีน (co-dominant) วิธีนี้สามารถทำได้ง่ายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งต้องการปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย ผลที่ได้สามารถนำไปวิเคราะห์ได้ และสามารถทำซ้ำโดยผลที่ได้ไม่เปลี่ยนแปลง พบกระจายทั่วไปในจีโนม ทั้งในระหว่างยีนและภายในยีน อีกทั้งไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ สามารถนำไปใช้ได้โดยทั่วไป เพียงแค่ทราบลำดับเบสของไพรเมอร์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม หมายถึง ความผันแปรของยีน หรือหน่วยของพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง ทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรเกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน (recombination) และการรวมตัวกันใหม่ (rearrangement) ของยีน หรือโครโมโซม ในระหว่างการแบ่งตัวแบบไมโอซิส รวมทั้งการกลายพันธุ์ (mutation) ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเกิดขึ้นเมื่อสมาชิกในประชากรมีการแยกตัวออกจากประชากรเดิมเริ่มแยกกลุ่มผสมพันธุ์ ลดการถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างประชากร ทำให้ความถี่ของอัลลีลเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งถ้ามีการถ่ายเทของยีนมาก ประชากรก็มีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ถ้ามีการถ่ายเทของยีนน้อย หรือไม่มีเลยประชากรก็จะแตกต่างกันมากจนในระยะเวลาหนึ่งประชากรที่แยกจากกันจะมีวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างประชากร

พันธุศาสตร์ประชากร เป็นการศึกษาที่ว่าด้วยการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนที่เกิดขึ้นกับประชากรอื่นเนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น รวมถึงการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร ซึ่งหมายถึงแบบแผนความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากน้อยเพียงใด การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนอกจากจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนแล้วยังมีความสำคัญต่อการเกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกัน ซึ่งประชากร หมายถึง กลุ่มของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอยู่ร่วมกัน และมีการผสมพันธุ์กันภายในประชากร ดังนั้นประชากรจึงเป็นแหล่งรวมของยีน หรือยีนโพลีมอร์ฟิซึมต่าง ๆ ของประชากร การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นพันธุศาสตร์ประชากร โดยตั้งอยู่บนพื้นฐานของทฤษฎีสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) ที่ว่า “ประชากรที่มีขนาดใหญ่ มีการผสมพันธุ์แบบสุ่ม ไม่มีการกลายพันธุ์ ไม่มีการคัดเลือก และไม่มีการอพยพย้ายถิ่นในประชากรนั้น ความถี่ของยีนและความถี่ของยีนโพลีมอร์ฟิซึมจะคงที่ในทุกชั่วอายุ”

ค่าที่บอกลถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรที่ศึกษาได้จากข้อมูลการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนได้จากค่าต่าง ๆ ดังนี้ (Hedrick, 1985; Petit *et al.*, 1998)

1. จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (A) และ คำนวณค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่ง โดยนับจำนวนอัลลีลทุกตำแหน่ง แล้วนำมาหารด้วยจำนวนตำแหน่งทั้งหมดที่ศึกษา

2. ค่า Allelic richness (A_r) เป็นค่าที่บอกลถึงจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่เป็นอิสระจากจำนวนตัวอย่าง จึงสามารถใช้ค่านี้เปรียบเทียบได้ในกรณีจำนวนตัวอย่างมีไม่เท่ากัน ซึ่งขึ้นอยู่กับโอกาสที่จะพบอัลลีลใดอัลลีลหนึ่ง โดยตั้งอยู่บนพื้นฐานของจำนวนตัวอย่างที่น้อยที่สุดในประชากร (Leberg, 2002; Kalinowski, 2004, 2005) ดังนั้นเราจึงใช้ค่า allelic richness เพื่อแสดงถึงจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งได้ดีกว่าค่าจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (A) และค่า effective number of allele (A_e) คำนวณได้จากสูตร

$$A_r = \sum_{i=1}^n \left[1 - \frac{\binom{2N - N_i}{2n}}{\binom{2N}{2n}} \right]$$

เมื่อ	n	=	จำนวนตัวอย่างที่น้อยที่สุดในประชากรที่ศึกษา
	N	=	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด
	N_i	=	จำนวนอัลลีลที่ตำแหน่ง i

4. ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) หมายถึง ค่าที่แสดงถึงความถี่ของเฮเทอโรไซโกตต่อยีน 1 ตำแหน่งที่ทำการศึกษา ประกอบด้วยค่าจากการค่าสังเกต (H_o หรือ observed heterozygosity) และค่าคาดหมาย (H_e หรือ expected heterozygosity) ซึ่ง H_o หมายถึง ความถี่ของเฮเทอโรไซกัสในไทป์เฉลี่ยต่อตำแหน่ง ที่คำนวณจากข้อมูลการทดลอง และค่า H_e หมายถึง ความถี่ของเฮเทอโรไซกัสในไทป์เฉลี่ยต่อตำแหน่ง ที่ได้จากการคำนวณ โดยอาศัยหลักที่ว่าประชากรนั้นอยู่ในสภาพสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

ค่าแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร สามารถนำมาใช้แสดงความแตกต่างระหว่างประชากรและโครงสร้างประชากรได้ ดังนี้

1. Linkage disequilibrium หรือ Gametic disequilibrium เป็นการทดสอบว่ายีนไทป์ที่ตำแหน่งหนึ่งเป็นอิสระจากยีนไทป์ที่อีกตำแหน่งหรือไม่ ด้วยการทดสอบความถี่อัลลีลซึ่งมีหลักการว่า ในประชากรที่มีการผสมพันธุ์แบบสุ่ม ยีนหรืออัลลีลทั้งหมดนั้นสามารถรวมตัวกันได้ อย่างอิสระในเซลล์สืบพันธุ์ (Hedrick, 2005)

2. Population differentiation เป็นการศึกษาความแตกต่างของประชากร โดยใช้การกระจายตัวของอัลลีลในแต่ละประชากรเป็นตัวทดสอบ

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

4. ค่าสัมประสิทธิ์ F (F -coefficients) เป็นค่าที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของอัลลีลภายในประชากร ซึ่งสามารถบอกได้ว่าประชากรนั้นมีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อยหรือไม่ (Nei, 1977) ซึ่งคำนวณได้จากค่าเฮเทอโรไซโกซิตี ดังนี้

F_{ST} หมายถึง ค่าที่วัดระดับความแตกต่างของความถี่อัลลีลในประชากรต่าง ๆ เพื่อศึกษาว่าประชากรมีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อยหรือไม่

F_{IS} และ F_{IT} หมายถึง ค่าที่บอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรย่อย และประชากรทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งจะมีทั้งค่าบวกและค่าลบ โดยที่ค่าบวกหมายความว่า ค่าเฮเทอโรไซโกตน้อยกว่าที่ควรจะเป็น เมื่อประชากรนั้นอยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก เกิดขึ้นเนื่องจากการผสมเลือดชิด หรือมีการปะปนกันของประชากรที่มีความถี่อัลลีลต่างกัน (Wahlund effect) เป็นต้น และมีค่าเฮเทอโรไซโกตมากกว่าที่ควรจะเป็นเมื่อ F_{IS} มีค่าเป็นลบ เนื่องจากประชากรเริ่มต้นน้อย (founder effect) หรือประชากรผ่านสภาวะคอขวด (bottleneck) คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$F_{ST} = \frac{\bar{H}_T - \bar{H}_S}{\bar{H}_T}$$

$$F_{IS} = \frac{\bar{H}_S - \bar{H}_O}{\bar{H}_S}$$

$$F_{IT} = \frac{\bar{H}_T - \bar{H}_O}{\bar{H}_T}$$

เมื่อ $\bar{H}_S$ = ค่าเฉลี่ย H_e (expected heterozygosity) ทุกตำแหน่งของ
ประชากรย่อย
 $\bar{H}_T$ = ค่าเฉลี่ย H_e ทุกตำแหน่งในทุกประชากร
 $\bar{H}_O$ = ค่าเฉลี่ย H_o (observed heterozygosity) ทุกตำแหน่งของ
ประชากรย่อย

5. Pairwise F_{st} เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่อัลลีลในทุกคู่ประชากร และใช้
สนับสนุนการทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากร

การสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมเกิดขึ้นได้เนื่องจากสาเหตุต่าง ๆ ดังนี้
(Krishnamurthy, 2003; Hedrick, 2005)

1. ผลของประชากรเริ่มต้น (Founder effect) เกิดขึ้นเนื่องจากประชากรที่มีส่วนร่วมในการ
สร้างประชากรในรุ่นต่อมา ไม่ได้เป็นตัวแทนของยีนหรืออัลลีลที่มีอยู่ในประชากรเดิมทั้งหมด
(gene pool) ส่งผลให้ความถี่ของยีนในประชากรรุ่นถัดไปแตกต่างจากประชากรเดิม

2. การเกิดสภาวะคอขวด (Demographic bottlenecks) เกิดขึ้นเมื่อประชากรประสบกับ
สภาวะที่ไม่เหมาะสมอย่างรุนแรง ทำให้ประชากรลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ประชากรที่มี
ชีวิตรอดและสามารถสืบพันธุ์ได้น้อยลง ทำให้ประชากรในรุ่นถัดมามีความหลากหลายทาง
พันธุกรรมลดลง

3. การขาดช่วงทางพันธุกรรม (Genetic drift) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีน
หรืออัลลีลแบบไม่มีทิศทางแน่นอน มักเกิดขึ้นกับประชากรขนาดเล็ก ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากเกิด
สภาวะคอขวด ทำให้จำนวนของโฮโมไซโกตเพิ่มมากขึ้น หรือทำให้เกิดการสูญหายของอัลลีล

บางอัลลีลไป โดยเฉพาะการสูญหายของอัลลีลหายากที่มีความถี่ต่ำ (rare allele) จะมีโอกาสเกิดขึ้นมาก ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อประชากรในรุ่นถัดมา

4. การผสมเลือดชิด (Inbreeding) เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างพ่อแม่ที่มีความสัมพันธ์กันทางเครือญาติ ในประชากรขนาดเล็กมีโอกาสเกิดการผสมเลือดชิดมากกว่าประชากรขนาดใหญ่ การที่ประชากรมีลักษณะด้อยลงเนื่องจากการผสมเลือดชิดนี้ เรียกว่า อินบรีดดิ้งดีเพรสชัน (Inbreeding depression) ทำให้ลักษณะที่ไม่ดีปรากฏออกมา เช่น อัตราการเจริญเติบโตลดลง อ่อนแอต่อโรค และอัตราการรอดต่ำ เป็นต้น เนื่องมาจากยีนในสภาพโฮโมไซโกตเพิ่มขึ้น

5. การคัดพันธุ์ (Selection) เกิดขึ้นได้ทั้งจากมนุษย์ และจากธรรมชาติ การคัดพันธุ์โดยมนุษย์ คือ การคัดเลือกเพื่อยกระดับค่าเฉลี่ยของลักษณะที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ในประชากรรุ่นต่อมา ส่วนการคัดพันธุ์จากธรรมชาติเกิดขึ้นเนื่องจากบางยีนในไทป์มีความสามารถในการอยู่รอดลดลงเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ ส่งผลให้ความถี่ของยีนนั้น ๆ ลดลงในรุ่นต่อมาได้

6. การกลายพันธุ์ (Mutation) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม ยีน หรือโครโมโซมที่ทำให้ความถี่ของอัลลีลเปลี่ยนแปลง และสามารถถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง เป็นขั้นตอนที่นำไปสู่กระบวนการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต แต่อย่างไรก็ตามการกลายมีผลน้อยต่อความแตกต่างของประชากร เนื่องจากการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีโอกาสดำรง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกิ้งก่ามกราคม

แม้ว่ากิ้งก่ามกราคมเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยมาเป็นระยะเวลานาน แต่การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมยังมีค่อนข้างน้อย เช่น การใช้ไอโซไซม์ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรกิ้งก่ามกราคมจากธรรมชาติในจังหวัด ฉะเชิงเทรา สงขลา และสุราษฎร์ธานี โดย ศรีรัตน์ และ พนม (2541) พบว่ากิ้งก่ามกราคมทั้ง 3 ประชากร มีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีค่อนข้างต่ำ (0.030-0.031) และไม่มีความแตกต่างระหว่างประชากร ต่อมามีการนำเครื่องหมายไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกิ้งก่ามกราคมจากธรรมชาติ 18 ประชากร โดยเก็บตัวอย่างกิ้งก่าจากประเทศต่าง ๆ ในเอเชียใต้จนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 16S rRNA mtDNA สามารถแบ่งประชากรได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มฝั่งตะวันออก (Eastern form) ได้แก่ตัวอย่างจากประเทศฟิลิปปินส์ และออสเตรเลีย และกลุ่มฝั่งตะวันตก (Western form) ได้แก่ตัวอย่างจากแม่น้ำโขง ประเทศ-

เวียดนาม แม่น้ำกระบุรี ประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย โดยใช้ Huxley's line เป็นเส้นแบ่งเขต พบว่ากุ้งทั้ง 2 กลุ่มมีค่าความแตกต่างประมาณ 6.2 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความแตกต่างภายในประชากรมีค่าค่อนข้างน้อยประมาณ 0.9 เปอร์เซ็นต์ (de Bruyn *et al.*, 2004)

เมื่อการใช้ไอโซไซม์ และไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของประชากรกึ่งก้ามกรามได้ หรือให้ความแตกต่างค่อนข้างน้อย ดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีการพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่ง ของประชากรกึ่งก้ามกรามประเทศออสเตรเลีย (Eastern form) พบว่ามีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 12-18 อัลลีล และมีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีอยู่ระหว่าง 0.66-0.90 แต่เมื่อนำไมโครแซทเทลไลต์ไปทดสอบกับกุ้ง Western form (ประเทศไทย เวียดนาม มาเลเซีย และอินโดนีเซีย) พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แสดงให้เห็นว่ากุ้งทั้งสองแหล่งนั้นมีพันธุกรรมที่แตกต่างกันมาก ไมโครแซทเทลไลต์ที่ได้จาก Eastern form ไม่ได้เป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ ในกึ่งก้ามกรามทั้งสองแหล่ง (Chand *et al.*, 2005) ต่อมา Chareontawee *et al.* (2006) ได้พัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ 10 ตำแหน่ง สำหรับกึ่งก้ามกรามในประเทศไทย ซึ่งเป็น Western form พบว่ามีจำนวนอัลลีล 5-17 อัลลีล และมีค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตีตั้งแต่ 0.27-0.83

การสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์น้ำจากโรงเพาะฟัก

ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีประโยชน์ในการเฝ้าระวังและติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของประชากรจากโรงเพาะฟัก เนื่องมาจากวิธีปฏิบัติภายในโรงเพาะฟักที่ส่งผลให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง เช่น การศึกษาในปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) พบว่าค่าความหลากหลายของอัลลีลของปลาจากโรงเพาะฟักในประเทศนอร์เวย์ และไอร์แลนด์น้อยกว่าปลาจากธรรมชาติ เป็นผลเนื่องมาจากประชากรเริ่มต้นน้อยเกินไป (founder effect) และเกิดจากการคัดพันธุ์ มากกว่าการที่ประชากรทั้งสองแยกจากกันตามสภาพภูมิศาสตร์ (Norris *et al.*, 1999) เช่นเดียวกับ การศึกษาในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ประเทศฟิลิปปินส์ที่พบว่าประชากรโรงเพาะฟักมีจำนวนอัลลีลน้อยกว่าประชากรธรรมชาติ เนื่องจากประชากรเริ่มต้นและการคัดพันธุ์เช่นเดียวกัน (Xu *et al.*, 2001) รวมทั้งปลา Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) ที่พบว่าจำนวนอัลลีล และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีของรุ่นลูกต่ำกว่าความหลากหลายของประชากรรุ่นพ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าอัลลีลหายากหายไปด้วย เนื่องจากจำนวนพ่อแม่พันธุ์ที่นำมาผลิตลูกจริง ๆ นั้น น้อยกว่าจำนวนพ่อแม่พันธุ์ทั้งหมด (Hara and Sekino, 2003) และผลของประชากรเริ่มต้นที่มีจำนวนน้อยก็มีผลทำให้สายพันธุ์จากโรงเพาะฟักของปลา Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) ในประเทศแคนาดา มีความหลากหลายของอัลลีลลดลงเช่นเดียวกัน เมื่อ

เปรียบเทียบกับประชากรธรรมชาติ เช่นเดียวกับในปลา Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) พบว่า ปลาจากโรงเพาะฟักมีความหลากหลายของอัลลีลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับปลาธรรมชาติ เนื่องมาจากประชากรเริ่มต้นที่นำมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ของประชากรรุ่นถัดไปในสายพันธุ์โรงเพาะฟักนั้นมีจำนวนน้อยเกินไป (Pampoulie *et al.*, 2006)

หลังจากการเริ่มสร้างประชากรใหม่แล้ว ในระยะต่อมาหากจำนวนพ่อแม่พันธุ์ลดลง หรือที่เรียกว่าเกิดภาวะคอขวด (bottleneck) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟักจะลดลงเช่นเดียวกับการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปลาไน (*Cyprinus caprio* L.) จากโรงเพาะฟักของประเทศเช็ก พบว่ามีค่าเฉลี่ยอัลลีล (4.2) น้อยกว่าสายพันธุ์โรงเพาะฟักจากประเทศฝรั่งเศส (6.2) เนื่องมาจากทั้งสองประชากรมีการจัดการพ่อแม่พันธุ์ต่างกัน เช่น มีการแลกเปลี่ยนพ่อแม่พันธุ์ของโรงเพาะฟักในประเทศฝรั่งเศส ทำให้ความหลากหลายของอัลลีลสูงกว่าในประชากรจากประเทศเช็ก (Desvignes *et al.*, 2001) เช่นเดียวกับ การศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลา Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) จากโรงเพาะฟักก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติพบว่ามีค่า Allelic richness น้อยกว่าปลาจากธรรมชาติ ซึ่งมีสาเหตุมาจากวิธีปฏิบัติในการผสมพันธุ์ปลาทำให้เกิดภาวะคอขวด ส่งผลให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง (Machado-Schiaffino *et al.*, 2007) และในการสร้างประชากรเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ของกุ้ง *Litopenaeus stylirostris* ในประเทศแถบอเมริกาใต้ พบว่ากุ้งจากโรงเพาะฟักมีจำนวนอัลลีลลดลงเมื่อเทียบกับประชากรธรรมชาติ เนื่องจากจำนวนพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ในแต่ละรุ่นนั้นมีจำนวนน้อย ทำให้เกิดการผสมเลือดชิด แต่อย่างไรก็ตาม การสร้างประชากรนั้นเลือกใช้ประชากรจากโรงเพาะฟัก (Goyard *et al.*, 2003) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Ditlecadet *et al.* (2006) ในปลา Arctic charr สองสายพันธุ์จากโรงเพาะฟัก พบว่าทั้งสองแห่งมีความหลากหลายของอัลลีลลดลงเมื่อเทียบกับปลาจากธรรมชาติ ทั้งนี้คาดว่าเกิดจากวิธีปฏิบัติในการผสมพันธุ์ ของประชากรเริ่มต้นที่มีการใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อย ทำให้เกิดการผสมเลือดชิดในประชากรรุ่นถัดมาได้ และในปลา gilthead sea bream (*Sparus aurata*) ก็เช่นเดียวกัน พบว่าวิธีปฏิบัติในการผสมพันธุ์ ทำให้ความหลากหลายของอัลลีลลดลงเมื่อเทียบกับประชากรธรรมชาติ เนื่องจากเกิดภาวะคอขวด (Alarcon *et al.*, 2004) นอกจากนี้การศึกษานี้ของ Alam and Islam (2005) ในปลากะโห้ (*Catla catla*) ในประเทศบังกลาเทศ พบว่าประชากรโรงเพาะฟักมีความหลากหลายของอัลลีลน้อยกว่าประชากรจากธรรมชาติ ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการจัดการภายในโรงเพาะฟัก ทำให้เกิดการผสมเลือดชิด และการขาดช่วงทางพันธุกรรม แต่ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีไม่แตกต่างกัน

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกราม

เก็บตัวอย่างขำวำยน้ำของกุ้งก้ามกรำม จำนวน 7 ปรำชกร ประกอบด้วย ปรำชกรจำก ธรรมชาติ 2 ปรำชกร คือ แม่น้ำเจ้าพระยำ จำนวน 36 ตัว และแม่น้ำกระบุรี 28 ตัว และปรำชกร จำกโรงเพำะฟัก 5 ปรำชกร ประกอบด้วย รวมโชคฟาร์ม จำนวน 50 ตัว ลมโชคฟาร์ม 46 ตัว ขวัญเมื่องฟาร์ม 60 ตัว เกษตรสมบุรณ์ฟาร์ม 49 ตัว และปรำชกรโรงเพำะฟักจำกประเทศ อินโดนีเซีย จำนวน 27 ตัว รวมทั้งหมด 305 ตัวอย่าง ซึ่งแหล่งที่มำ และจำนวนตัวอย่างของกุ้ง ก้ามกรำมแสดงในตำรำงที่ 1 รวมทั้งแผนที่แสดงบริเวณที่เก็บตัวอย่างในภำพที่ 1 โดยเก็บรักษา ตัวอย่างในเอธานอล 95% ก่อนนำมำสกัดดีเอ็นเอ

2. วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจำกขำวำยน้ำของกุ้งก้ามกรำม ด้วยวิธี Proteinase K/Phenol-Chloroform ซึ่ง คัดแปลงจำกวิธีของ Taggart *et al.* (1992) ใช้ตัวอย่างขำวำยน้ำของกุ้งก้ามกรำมปริมาตร 2-5 กรัมม ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml เติม TNES-Urea (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 7.5, 0.5% SDS, 4M Urea) จำนวน 500 μ l และเติม Proteinase K 4 μ l (20 mg/ml) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 μ g/ml ผสมสารละลายให้เข้ากันเบำ ๆ บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้ข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง) จำกนั้นสกัดดีเอ็นเอในขั้นแรก ด้วยการเติม phenol 500 μ l (pH 8) ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมำเบำ ๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลำ 10 นาที และใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสด้านบน (aqueous phase) ใส่หลอดขนาด 1.5 ml ขั้นที่สองเติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25:24:1 จำนวน 500 μ l ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมำเบำ ๆ จำกนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลำ 10 นาที และใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสด้านบน (aqueous phase) ใส่หลอดขนาด 1.5 ml ขั้นสุดท้าย เติม chloroform:isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 จำนวน 500 μ l ผสมสารละลายให้เข้ากันโดย พลิกหลอดไปมำเบำ ๆ จำกนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลำ 10 นาที และใช้ ไมโครปิเปตดูดส่วนใสด้านบน (aqueous phase) ใส่หลอดขนาด 1.5 ml จำกนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอธานอล 95% ที่เย็นจัด จำนวน 2 เท่าของปริมาตรตัวอย่างที่ได้ พลิกหลอดไปมำเบำ ๆ จนเห็น ตะกอนสีขาวขุ่นของดีเอ็นเอตกตะกอนออกมา ถ้ำยยังไม่เห็นตะกอนดีเอ็นเอให้นำไปเก็บไว้ที่ -20°C นำน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลำ 20 นาที แล้วเทสารละลายส่วน

ใส่ทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเออีก 2 ครั้ง ด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 0.5-1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วเติม TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.2, 1mM EDTA pH 8.0) ปริมาณ 50-100 μ l แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6-24 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอละลาย

3. การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1% เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ DNA) ปริมาณ 100, 300 และ 500 ng แล้วคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบกับความเข้มแสงของดีเอ็นเอมาตรฐานกับตัวอย่างของกึ่ง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) โดยอาศัยหลักการที่ว่าโครงสร้างของดีเอ็นเอจะดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตได้ที่มีความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) ซึ่งในสถานะที่ดีเอ็นเอเกลียวคู่ความเข้มข้น 50 μ g/ml จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร (A_{260}) เท่ากับ 1 ซึ่งความเข้มข้นของดีเอ็นเอคำนวณได้จากสูตร

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

การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยหาอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ แต่ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปน และถ้าค่าที่ได้น้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอ จากนั้นนำดีเอ็นเอมาละลายน้ำกลั่น (deionized H_2O) ให้ได้ความเข้มข้น 5 ng/ μ l

4. การทดสอบไพรเมอร์

ทดสอบระดับความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 11 คู่ (Chareontawee *et al.*, 2006) กับตัวอย่างกึ่งกัมกรามเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในตารางที่ 2 โดยในปฏิกิริยา 10 μ l จะประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA Template) 10 ng, 1X PCR Buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 200 μ M dNTPs, 0.5 pmol Forward/Reverse Primers, 0.1 U Taq DNA Polymerase และ deionized H_2O นำปฏิกิริยาไปเข้าเครื่องพีซีอาร์ (PCT-100TM Programmable Thermal Controller) โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิและเวลาดังนี้ 94^oC นาน 3 นาที 1 รอบ, 94^oC 30 วินาที, 60^oC 40 วินาที, 72^oC 50 วินาที ทั้งหมดจำนวน 35 รอบ และที่ 72^oC 7 นาที จำนวน 1 รอบ

เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาเช็กผลดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% จากนั้นเติม loading buffer (0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol, 0.5 M EDTA pH 8 และ 98% formamide) จำนวน 5 μ l และแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล 5% ที่ทำให้เสียสภาพ (denaturing polyacrylamide gel ที่ประกอบด้วย 40% acrylamide 19:1, 5X TBE และ 7 M urea) ในบัฟเฟอร์ 1X TBE ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิส (BioRad) ขนาด 38 x 50 cm ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 60 วัตต์ นาน 3 ชั่วโมง ซึ่งก่อนหน้านั้นทำให้เจลเสียสภาพ ด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 100 วัตต์ นาน 30 นาที และตรวจสอบผลด้วยวิธี silver staining จากนั้นเทียบขนาดดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M13 sequence ladder) บนกระຈก หลังจากทิ้งให้แห้งประมาณ 5 ชั่วโมง

5. การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์

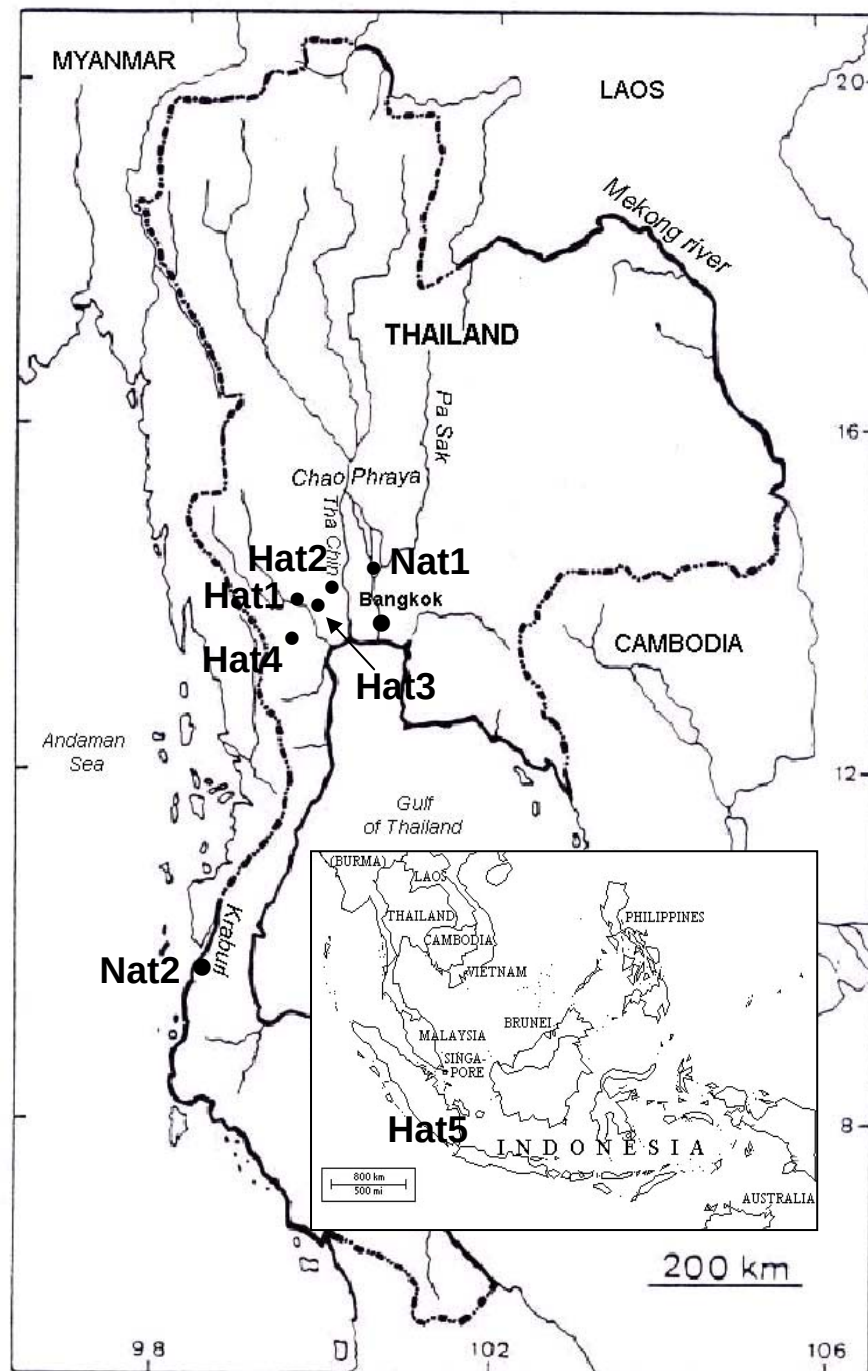
ตรวจสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์ที่เพิ่มปริมาณได้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทดสอบในกึ่งกัมกรามจำนวน 2 ครอบครัว โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ และการแยกผลผลิตพีซีอาร์ใน 5% โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส ตามวิธีการในข้อ 4 จากนั้นทดสอบสัดส่วนของยีนไทป์ที่ได้จากลูกด้วยวิธีไคสแควร์ (Chi-square Goodness of Fit Test) ที่มีการปรับค่าไคสแควร์เพื่อความถูกต้องมากขึ้น (Sokal and Rohlf, 1969) ดังสูตร

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

เมื่อ	O	=	ค่าที่ได้จากการทดลอง (observed value)
	E	=	ค่าทางทฤษฎี (expected value)
	0.5	=	ค่าที่ใช้ปรับค่าไคสแควร์ให้ถูกต้องยิ่งขึ้น กรณีตัวอย่างมีน้อย

ตารางที่ 1 ชื่อย่อประชากร แหล่งที่เก็บตัวอย่าง และประวัติสายพันธุ์กิ้งก่ามกรามที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งจำนวนตัวอย่างกิ้งก่ามกรามที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่าง	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ประวัติสายพันธุ์	จำนวนตัวอย่าง
Nat 1	แม่น้ำเจ้าพระยา จ.พระนครศรีอยุธยา	ประชากรธรรมชาติ	36
Nat 2	แม่น้ำกระบุรี จ.ระนอง	ประชากรธรรมชาติ	28
Hat 1	รวมโชคฟาร์ม อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	สายพันธุ์พื้นเมือง	50
Hat 2	ลมโชคฟาร์ม อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	สายพันธุ์พื้นเมือง	46
Hat 3	ขวัญเมืองฟาร์ม อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	กิ้งจากตะมะยะ จ.จันทบุรี ประเทศพม่า ประชากรรุ่นที่ 2	60
Hat 4	เกษตรสมบูรณ์ฟาร์ม อ.บางแพ จ.ราชบุรี	กิ้งปรับปรุงพันธุ์ CPF	49
Hat 5	ประเทศอินโดนีเซีย	กิ้งจากฟาร์มเพาะเลี้ยง	36
รวม			305



ภาพที่ 1 แหล่งที่เก็บตัวอย่างของกิ้งก่ามกรมทั้ง 7 ประชากร

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์จำนวน 11 คู่

ตำแหน่ง	GenBank Accession Number	Primer sequences (5' -----> 3')	T _A (°C)
<i>Mbr-1</i>	DQ019863	F: CCC ACC ATC AAT TCT CAC TTA CC R: TCC TTT TCA CAT CGT TTC CAG TC	60
<i>Mbr-2</i>	DQ019864	F: TTC CCG ACC AAT TTC TCT TTC TC R: GGC AAA AAT GAT CTT GGA TTC AC	60
<i>Mbr-3</i>	DQ019865	F: CAA CTC TAT GTT TCG GCA TTT GG R: GGC AAA AAT GAT CTT GGA TTC AC	60
<i>Mbr-4</i>	DQ019866	F: CCA CCT ACC GTA CAT TCC CAA AC R: CGG GGC GAC TTT TAG TAT CGA C	60
<i>Mbr-5</i>	DQ019867	F: CAA GGC TCG TGT CTC TTG TTT C R: GCT TGT ACT TGT TCA GCT TTT GC	60
<i>Mbr-6</i>	DQ019868	F: GGT CAC AGG ATG TCT CAG AGG TG R: CAC GCC TTG TAG CAA CCA TTC	60
<i>Mbr-7</i>	DQ019869	F: ATA AAA GAG TCG CCA AAT GAG CA R: ATT GGG AAT TGT TGA CCT CCA AG	60
<i>Mbr-8</i>	DQ019870	F: AAC CAG CCG ACT TAG ACT GTG C R: CGC CAT TTG CGT CTA TCT CTT AC	60
<i>Mbr-9</i>	DQ019871	F: ATG ACG ATG ATG AGG AAT GAA GC R: TTT CAG GCT ATA TCA AGC AAC AG	60
<i>Mbr-10</i>	DQ019872	F: GTA TTG AGA ACA AAG GCG CAC AG R: ATC TCT TTC CAA AAC AGG GCA CA	60
<i>Mbr-11</i>	DQ019873	F: TTG TTT GCT TGT TTA GTG TCA AGG R: CTC CAA AAC CGA AAA ATC CTC AC	60

6. การศึกษาความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในประชากรกึ่งก้ามกราม

นำตัวอย่างดีเอ็นเอกึ่งก้ามกรามจากโรงเพาะฟัก 5 ประชากร คือ รวมโชคฟาร์ม (Hat 1) ลมโชยฟาร์ม (Hat2) ขวัญเมืองฟาร์ม (Hat 3) เกษตรสมบูรณ์ฟาร์ม (Hat 4) และประเทศอินโดนีเซีย (Hat 5) และประชากรธรรมชาติ 2 ประชากร คือ ประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยา (Nat 1) และแม่น้ำกระบุรี (Nat 2) ในตารางที่ 1 มาทดสอบความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์โดยใช้โปรแกรมที่มีการถ่ายทอดพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์ ตามวิธีการในข้อที่ 5 ใช้สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นหาขนาดของไมโครแซทเทลไลท์ในประชากรกึ่งก้ามกรามทั้ง 7 ประชากร โดยการแยกบน 5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ตามวิธีการข้อ 4

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

7.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ POPGENE v.1.32 (Yeh *et al.*, 2000) คำนวณจำนวนอัลลิลและค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง ค่าสังเกตและค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o และ H_e) และใช้โปรแกรม FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet, 2002; updated from Goudet, 1995) คำนวณค่า Allelic richness (A_r) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัลลิล และค่า A_r ด้วยวิธี t -test และค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o) ทั้ง 7 ประชากรด้วย t -test (Archie, 1985) ใช้โปรแกรม GENEPOP v.3.4 (Raymond and Rousset, 1995)

ทดสอบการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กด้วยโปรแกรม Arlequin v. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ (P -value) ซึ่งประมาณค่าโดยวิธี Markov chain (Markov chain = 100,000 และ Dememorization = 1000) โดยโอกาสที่จะเกิดเหตุการณ์ใดเหตุการณ์หนึ่งจะเพิ่มขึ้นไปเรื่อย ๆ ตามความถี่ของเหตุการณ์นั้น และเนื่องจากการวิเคราะห์มีการใช้ข้อมูลที่ไม่เป็นอิสระต่อกันในแต่ละการทดสอบ (multiple test) จึงปรับค่าระดับนัยสำคัญทางสถิติด้วย Bonferroni correction (Rice, 1989) ทดสอบ Linkage disequilibrium เปรียบเทียบในแต่ละคู่ของไมโครแซทเทลไลท์ในประชากรที่ศึกษา ด้วยวิธี Markov chain (Dememorization = 1000, Batches = 100 และ Iteration per batch = 1000) และปรับความน่าจะเป็นด้วย Bonferroni correction

7.2 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ GENEPOP ทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลีลระหว่างประชากรโดยเปรียบเทียบในแต่ละคู่ประชากร และประมาณค่าด้วยวิธี Markov chain (Dememorization=1000, Batches=100 และ Iteration per batch=1000) และปรับความน่าจะเป็นด้วย Bonferroni correction จากนั้นทดสอบค่ารวมทุกตำแหน่งของยีนในประชากรตามวิธีของ Fisher คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ F_{ST} และทดสอบค่าเฉลี่ย F_{ST} ด้วยวิธี Bootstrapping ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% โดยใช้โปรแกรม FSTAT เพื่อศึกษาว่าประชากรมีการแบ่งแยกออกเป็นประชากรย่อยหรือไม่

คำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของคู่ประชากรตามวิธีของ Nei (1978) พร้อมทั้งคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยใช้ Pairwise F_{ST} ด้วยโปรแกรม Arlequin v. 3.11 (Permutation = 1000 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05) และจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของ Nei (D_A) นำสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Dendrogram) ด้วยวิธี UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) (Sneath and Sokal, 1973) โดยใช้โปรแกรม TPGFA version 1.3 (Miller, 1997)

ผลการทดลอง

1. การทดสอบไพรเมอร์

จากการทดสอบไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์ 11 คู่พบว่า 10 คู่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ส่วนตำแหน่ง *Mbr-6* ไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์

2. การทดสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (Mendelian inheritance)

ผลการทดสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมทั้ง 10 คู่ไพรเมอร์ ในกึ่งก้ามกรามจำนวน 2 ครอบครัว ๆ ละ 20 ตัว ซึ่งไพรเมอร์ 6 คู่สามารถเพิ่มปริมาณ และมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสอดคล้องกับกฎของเมนเดล (ตารางที่ 3) โดยพบว่า ที่ตำแหน่ง *Mbr-5*, *Mbr-7*, *Mbr-8* และ *Mbr-10* มีการถ่ายทอดอัลลีลเป็นไปตามกฎของเมนเดลทั้ง 2 ครอบครัว ส่วนตำแหน่งที่มีการถ่ายทอดอัลลีลเป็นไปตามกฎของเมนเดลเพียง 1 ครอบครัว คือ ตำแหน่ง *Mbr1* ครอบครัวที่ 1 และตำแหน่ง *Mbr2* ครอบครัวที่ 2 การทดสอบการถ่ายทอดไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์ไคสแควร์ (Chi-square Goodness of Fit Test)

อนึ่งการศึกษการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในครั้งนี้ ไม่ได้ศึกษาอีโนไทป์ของพ่อ เนื่องจากไม่ได้จับคู่ผสมพันธุ์กันในห้องปฏิบัติการ แต่นำกึ่งเพศเมียที่ผสมพันธุ์เรียบร้อยแล้วมาปล่อยให้วางไข่ ทั้งนี้เพราะในขณะนั้นมีโรคระบาดในกึ่งก้ามกราม จึงจำเป็นต้องตรวจโรคและใช้พ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดโรคเท่านั้น จากการตรวจไม่สามารถหาพ่อพันธุ์ที่ปลอดโรคได้ แต่สามารถหาแม่กึ่งที่มีไข่แก่ติดท้องที่ปลอดโรคได้ จึงได้ข้อมูลอีโนไทป์จากแม่เท่านั้น ส่วนอีโนไทป์ของพ่อ ได้จากการคาดเดาจากการเปรียบเทียบอีโนไทป์ของแม่และลูก อีโนไทป์ของพ่อ แม่ และลูก 20 ตัว จำนวน 2 ครอบครัว แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ลำดับเบสซ้ำ (core sequence) อุณหภูมิ annealing (T_A) จำนวนอัลลิล และผลผลิตพีซีอาร์ (bp)

ตำแหน่ง	ลำดับเบสซ้ำ	T_A (°C)	จำนวนอัลลิล	ผลผลิตพีซีอาร์ (bp)
<i>Mbr-1</i>	(GA) ₂₄	60	10	264-310
<i>Mbr-2</i>	(GT) ₂₂	60	13	298-340
<i>Mbr-3</i>	(AG) ₁₄	62	-	-
<i>Mbr-4</i>	(GT) ₂₉	62	-	-
<i>Mbr-5</i>	(AG) ₂₅	62	27	276-330
<i>Mbr-6</i>	(GCA) ₁₃	60	-	-
<i>Mbr-7</i>	(TGC) ₆	62	7	265-283
<i>Mbr-8</i>	(AGC) ₆ (AG) ₅ AA(AG) ₄	62	8	251-272
<i>Mbr-9</i>	(TG) ₅ (AG) ₁₇	60	-	-
<i>Mbr-10</i>	(ATG) ₃ A(ATG) ₄	60	11	228-273
<i>Mbr-11</i>	(AG) ₃₁	60	-	-

ตารางที่ 4 ยีนไทป์ของพ่อ แม่ และสัดส่วนยีนไทป์ของลูกกึ่งก้ำมกราม จำนวน 2 ครอบครัว
เพื่อศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์

ตำแหน่ง	ครอบครัว	ยีนไทป์			ยีนไทป์ของลูก			χ^2
		พ่อ	แม่	อัตราส่วน	ยีนไทป์	จำนวนที่พบ	จำนวนทั้งหมด	
<i>Mbr-1</i>	1	274/278	282/290	1:1:1:1	274/282	1 (4.75)	19	3.0 ^{ns}
					274/290	5 (4.75)		
					278/282	7 (4.75)		
					278/290	6 (4.75)		
	2	266/294	266/300	1:1:1:1	266/266	3(5)	20	8.2 [*]
					266/294	0(5)		
					266/300	8(5)		
					294/300	9(5)		
<i>Mbr-2</i>	1	306/340	306/340	1:2:1	306/306	12 (5)	20	10.92 [*]
					306/340	6 (10)		
					340/340	2 (5)		
	2	306/340	306/306	1:1	306/306	11 (10)	20	0.05 ^{ns}
					306/340	9 (10)		
<i>Mbr-4</i>	1	250/300	250/254	1:1:1:1	250/254	4 (5)	20	1.0 ^{ns}
					250/300	7 (5)		
					250/254	3 (5)		
					254/300	6 (5)		
	2	254/272	272/316	1:1:1:1	254/316	7(5)	20	1.0 ^{ns}
					254/null	6(5)		
					272/null	3(5)		
					null/null	4(5)		

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตำแหน่ง	ครอบครัว	อีโนไทป์			อีโนไทป์ของลูก			χ^2
		พ่อ	แม่	อัตราส่วน	อีโนไทป์	จำนวนที่พบ	จำนวนทั้งหมด	
<i>Mbr-5</i>	1	318/318	310/318	1:1	310/318	12 (10)	20	0.45 ^{ns}
					318/318	8 (10)		
	2	286/316	300/318	1:1:1:1	286/300	3(5)	20	1.0 ^{ns}
					286/318	7(5)		
					300/316	4(5)		
					316/318	6(5)		
<i>Mbr-7</i>	1	277/280	277/280	1:2:1	277/277	1(5)	20	4.925 ^{ns}
					277/280	10(10)		
					280/280	9(5)		
	2	268/277	277/277	1:1	268/277	10(10)	20	-
					277/277	10(10)		
<i>Mbr-8</i>	1	257/266	257/266	1:2:1	257/257	4 (5)	20	5.325 ^{ns}
					257/266	6 (10)		
					266/266	10 (5)		
	2	260/266	263/266	1:1:1:1	260/263	7 (4.5)	18	2.22 ^{ns}
					260/266	3 (4.5)		
					263/266	2 (4.5)		
					266/266	6 (4.5)		

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตำแหน่ง	ครอบครัว	อีโนไทพ์			อีโนไทพ์ของลูก			χ^2
		พ่อ	แม่	อัตราส่วน	อีโนไทพ์	จำนวนที่พบ	จำนวนทั้งหมด	
<i>Mbr-10</i>	1	246/261	237/258	1:1:1:1	237/246	6 (4.75)	19	1.631 ^{ns}
					237/261	4 (4.75)		
					246/258	6 (4.75)		
					258/261	3 (4.75)		
	2	252/258	246/249	1:1:1:1	246/252	6 (4.75)	20	1.737 ^{ns}
					246/258	6 (4.75)		
					249/252	6 (4.75)		
					249/258	6 (4.75)		

* คือ ผลการทดสอบมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

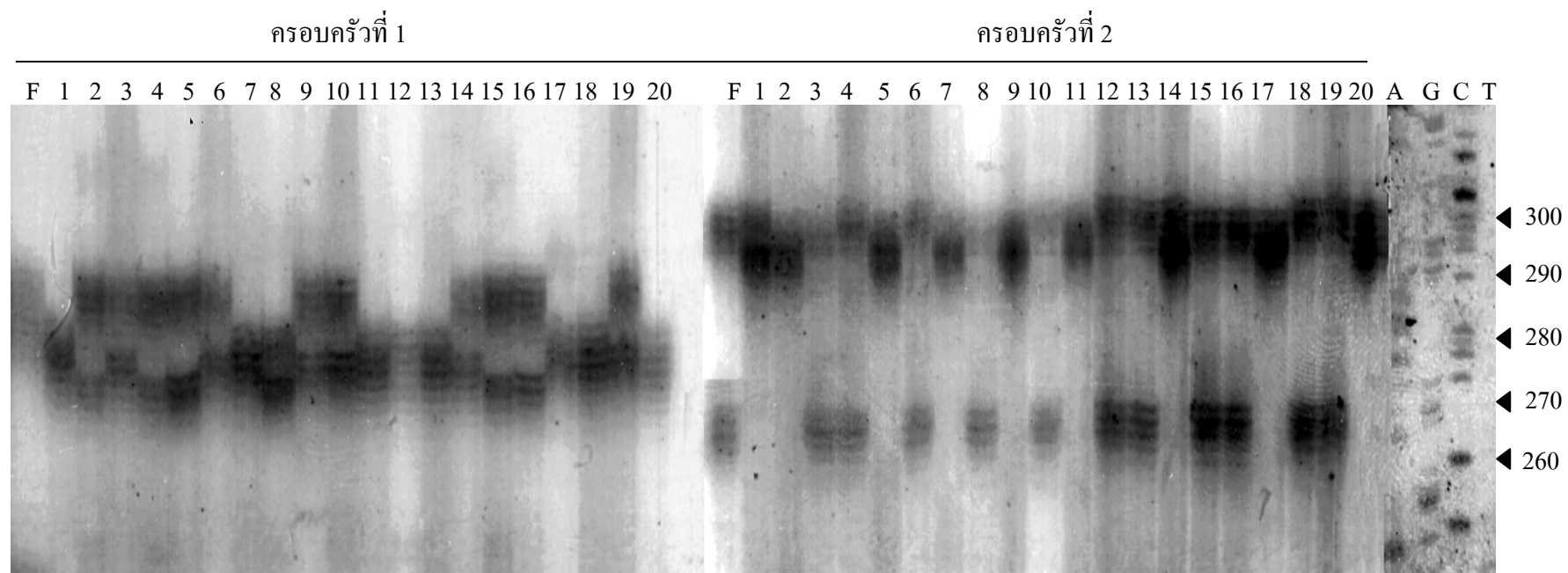
^{ns} คือ ผลการทดสอบไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

$P < 0.05$, $df = 1$, $\chi^2 = 3.84$

$P < 0.05$, $df = 2$, $\chi^2 = 5.99$

$P < 0.05$, $df = 3$, $\chi^2 = 7.82$

Mbr-1

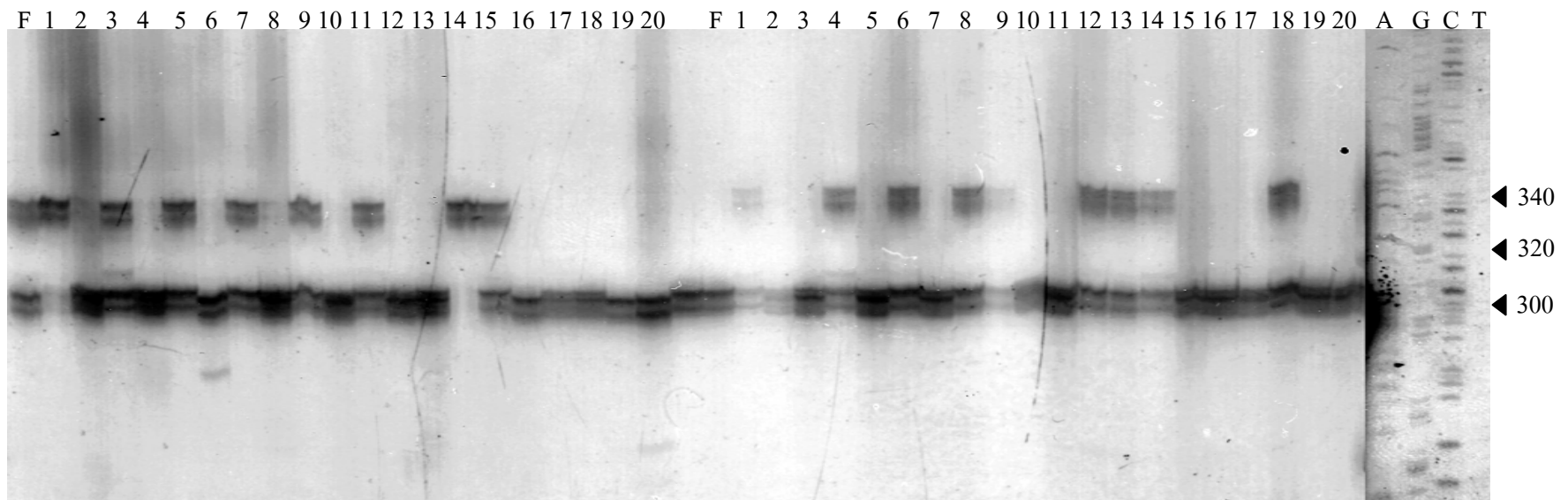


ภาพที่ 2 การถ่ายทอดไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ 6 ตำแหน่งในกิ้งก่ามกราม 2 ครอบครัว เปรียบเทียบกับขนาด กับ M13 sequence ladder (A G C T)
(F = แม่กิ้งก่ามกราม, 1-20 = ลูกกิ้ง)

Mbr-2

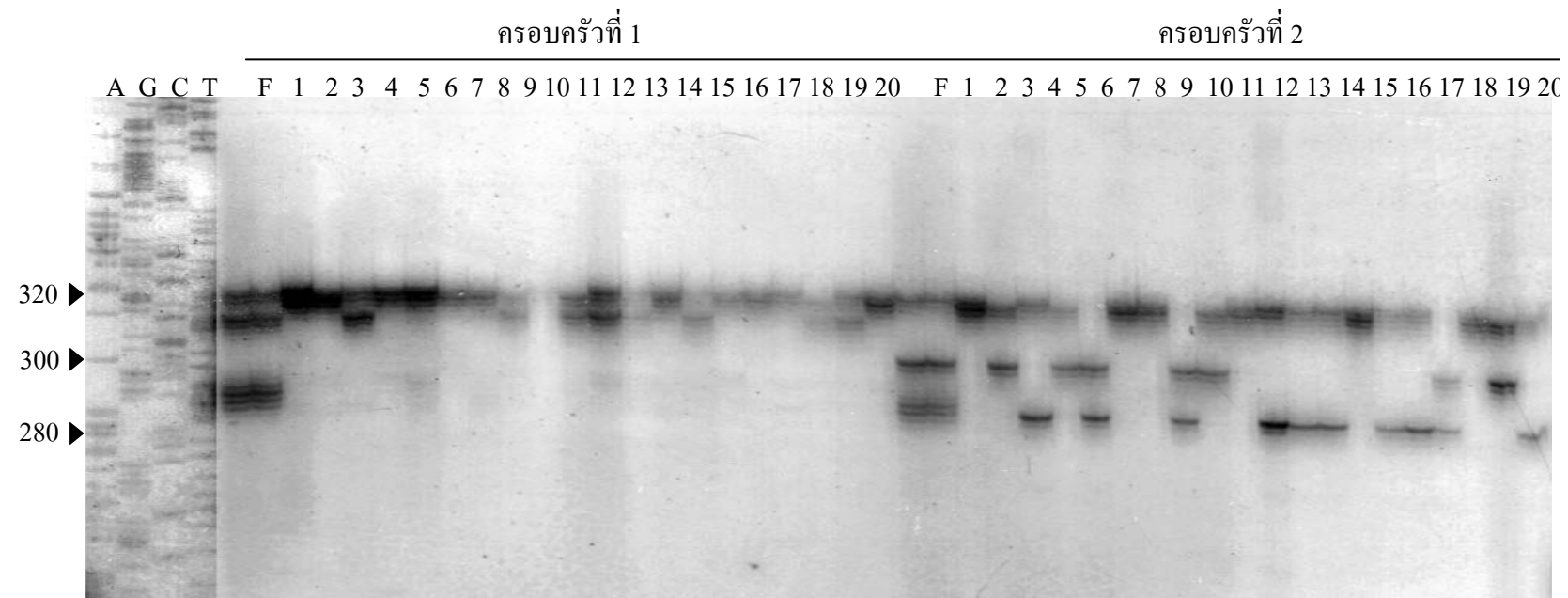
ครอบครัวที่ 1

ครอบครัวที่ 2



ภาพที่ 2 (ต่อ)

Mbr-5

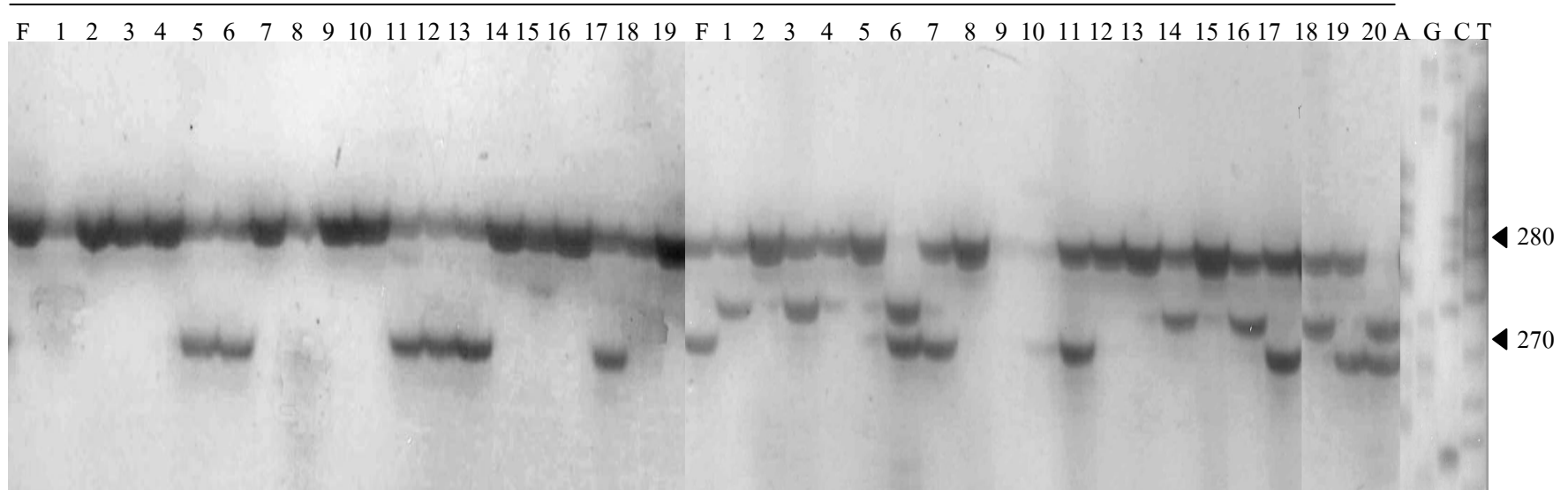


ภาพที่ 2 (ต่อ)

Mbr-7

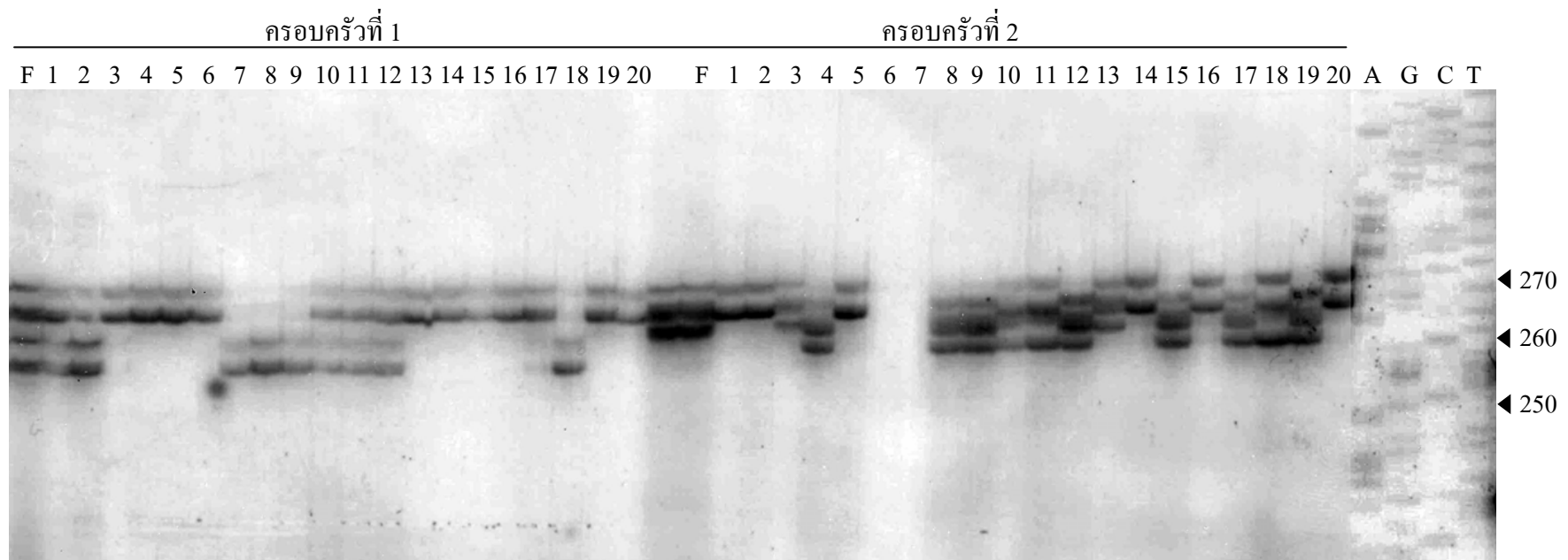
กรอบครัวที่ 1

กรอบความรู้ที่ 2



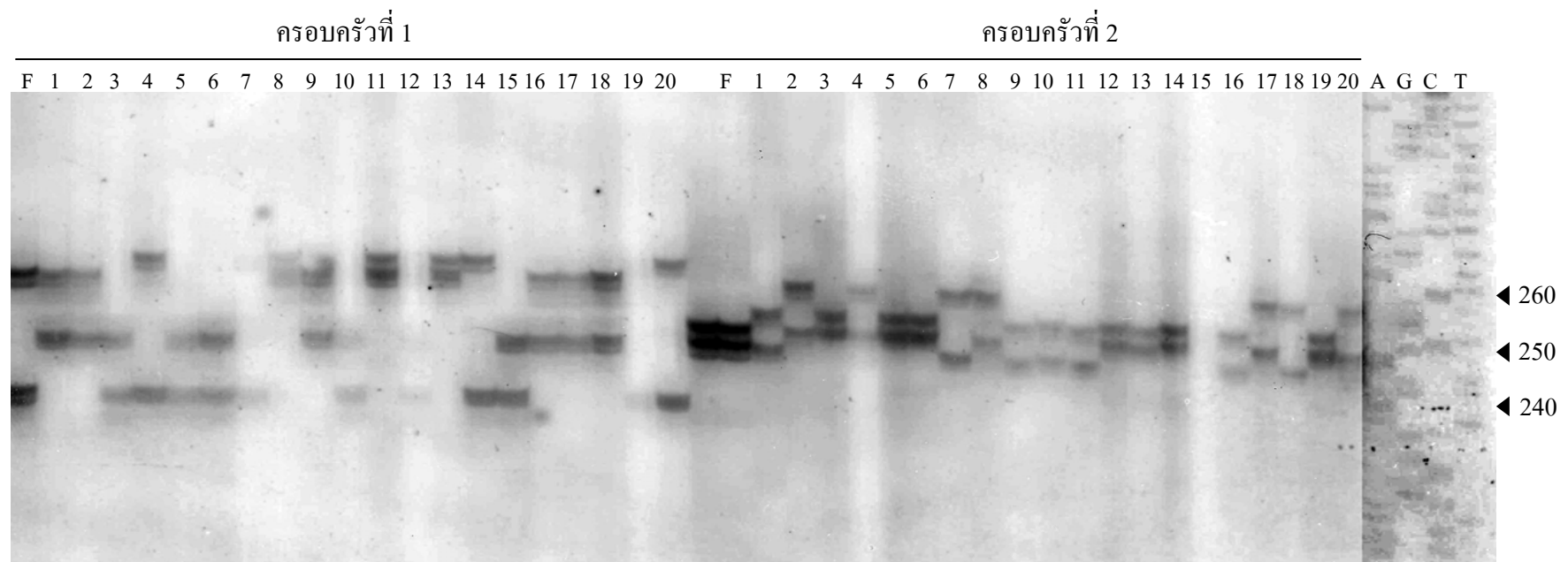
ภาพที่ 2 (ต่อ)

Mbr-8



ภาพที่ 2 (ต่อ)

Mbr-10



ภาพที่ 2 (ต่อ)

3. การศึกษาความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอในกิ้งก่ากรม

การวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอในกิ้งก่ากรมจำนวน 7 ประชากรโดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอจำนวน 6 ตำแหน่ง คือ *Mbr-1*, *Mbr-2*, *Mbr-5*, *Mbr-7*, *Mbr-8* และ *Mbr-10* ได้ผลดังนี้

3.1 จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง

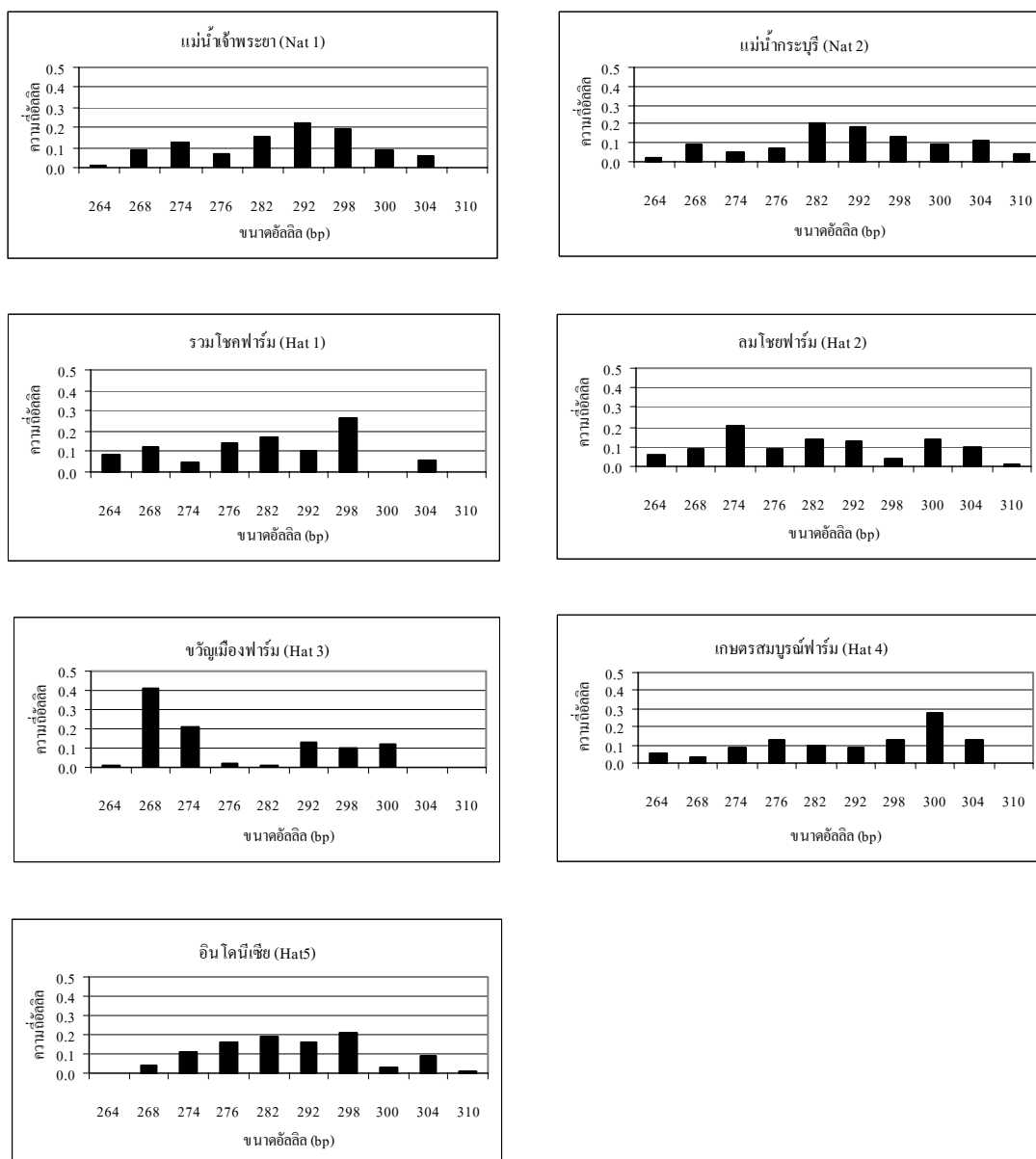
จากตัวอย่างกิ้งก่ากรม 7 ประชากร จำนวน 305 ตัวอย่าง พบว่าที่ตำแหน่ง *Mbr-1* มีจำนวนอัลลีลทั้งสิ้น 10 อัลลีล โดยมีขนาด 264-310 bp ไมโครแซทเทลไลต์ ตำแหน่ง *Mbr-2* มีจำนวนอัลลีล 13 อัลลีล ขนาด 298-340 bp ตำแหน่ง *Mbr-5* มี 27 อัลลีล ขนาด 276-330 bp ตำแหน่ง *Mbr-7* มี 7 อัลลีล ขนาด 265-283 bp ตำแหน่ง *Mbr-8* มี 8 อัลลีล ขนาด 251-272 bp และตำแหน่ง *Mbr-10* มี 11 อัลลีล ขนาด 228-273 bp ซึ่งความถี่ของแต่ละอัลลีลที่พบในทุกตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์แสดงไว้ในภาพที่ 3

3.2 จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (A)

จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งในแต่ละประชากร มีดังนี้ (ตารางที่ 5) ประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยา (Nat 1) มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งเท่ากับ 9.50 ± 4.85 แม่น้ำกระบุรี (Nat 2) เท่ากับ 9.00 ± 5.73 รวมโชคฟาร์ม (Hat 1) เท่ากับ 9.83 ± 4.88 ลมโชยฟาร์ม (Hat 2) เท่ากับ 10.67 ± 5.35 ขวัญเมืองฟาร์ม (Hat 3) เท่ากับ 7.50 ± 3.02 เกษตรสมบูรณ์ฟาร์ม (Hat 4) เท่ากับ 9.33 ± 4.50 และกึ่งประเทศอินโดนีเซีย (Hat 5) มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งเท่ากับ 9.67 ± 4.93

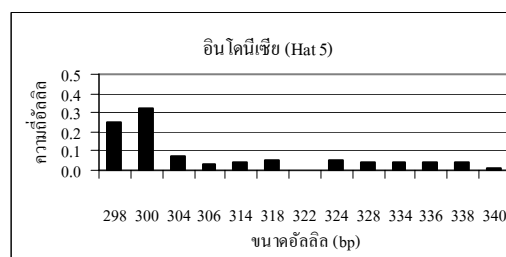
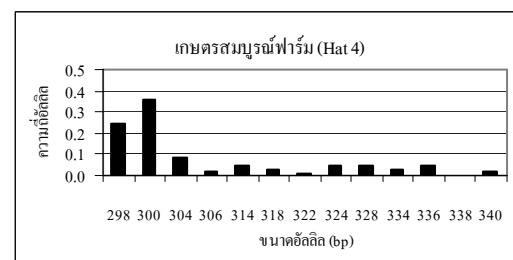
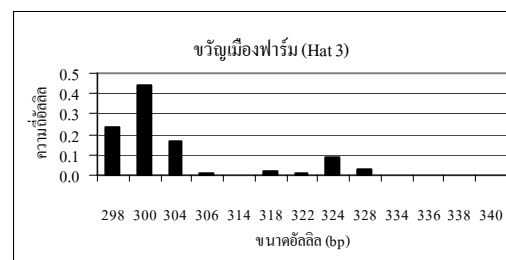
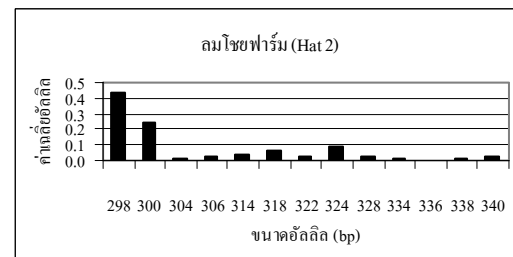
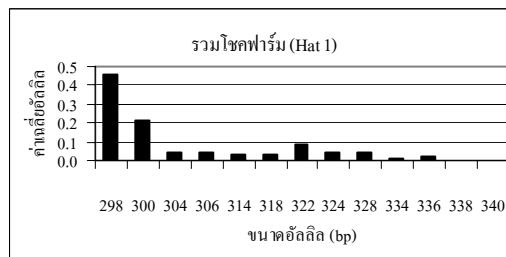
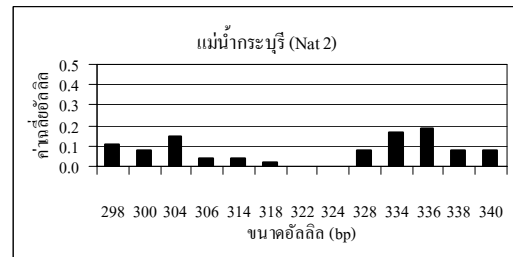
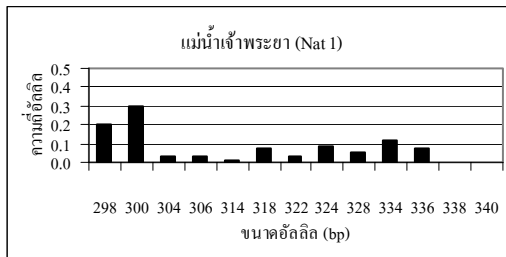
3.3 Allelic richness (A_r)

ค่าเฉลี่ย Allelic richness ของแต่ละประชากรมีดังนี้ แม่น้ำเจ้าพระยา (Nat 1) มีค่าเฉลี่ย Allelic richness เท่ากับ 8.96 ± 4.38 แม่น้ำกระบุรี (Nat 2) เท่ากับ 8.99 ± 5.74 รวมโชคฟาร์ม (Hat 1) เท่ากับ 8.82 ± 4.55 ลมโชยฟาร์ม (Hat 2) เท่ากับ 9.37 ± 4.41 ขวัญเมืองฟาร์ม (Hat 3) เท่ากับ 6.34 ± 2.68 เกษตรสมบูรณ์ฟาร์ม (Hat 4) เท่ากับ 8.51 ± 3.99 และประชากรจากประเทศอินโดนีเซีย (Hat 5) เท่ากับ 9.12 ± 4.47 โดยมีค่าเฉลี่ยจากทุกประชากรเท่ากับ 8.59 ในตารางที่ 5

Mbr-1

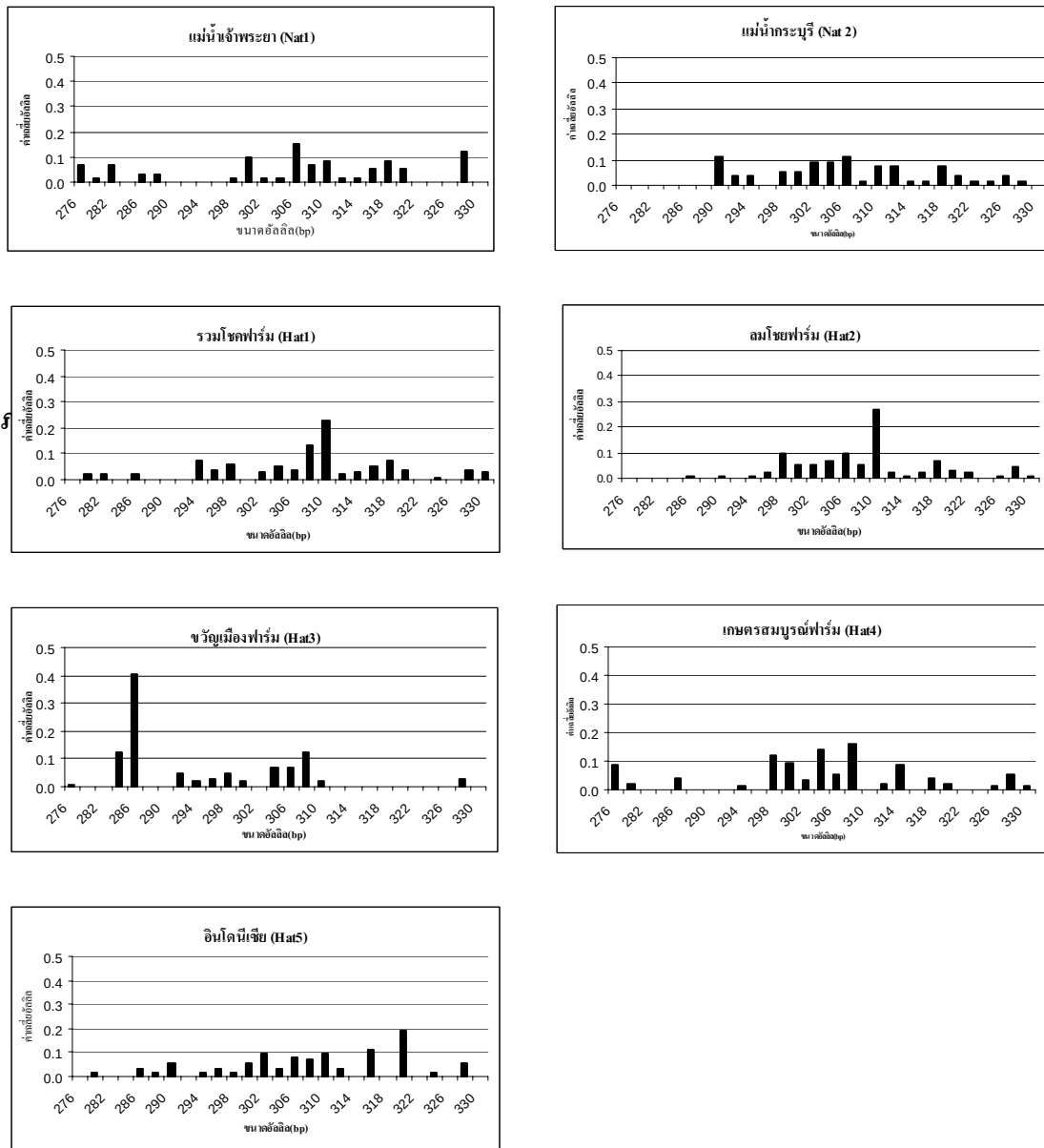
ภาพที่ 3 ความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 6 ตำแหน่งในประชากรกิ้งก่ามกราม

Mbr-2

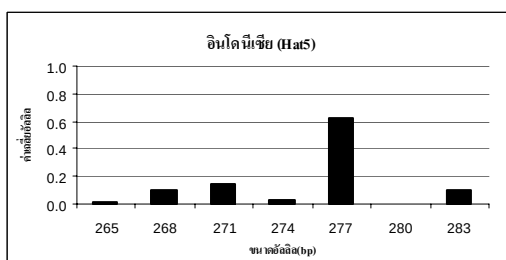
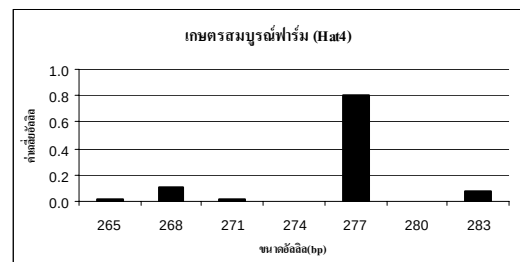
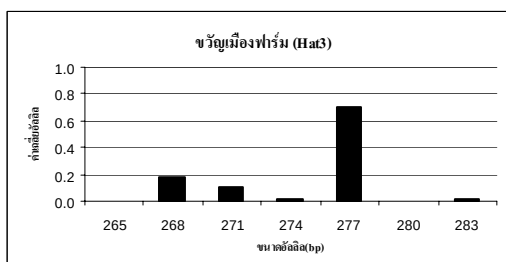
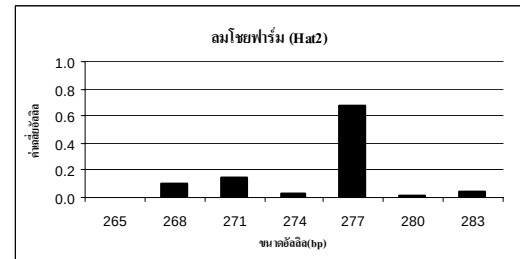
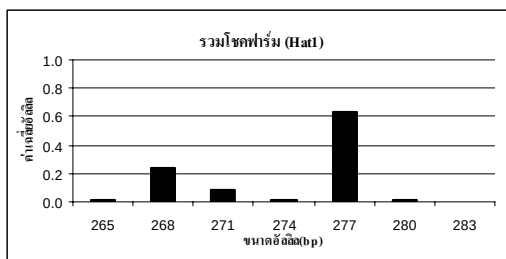
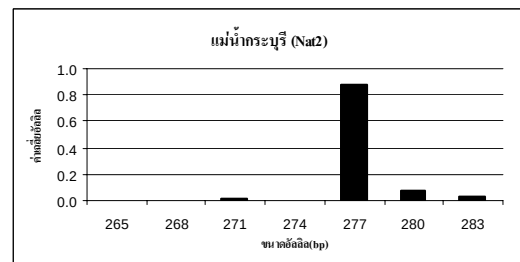
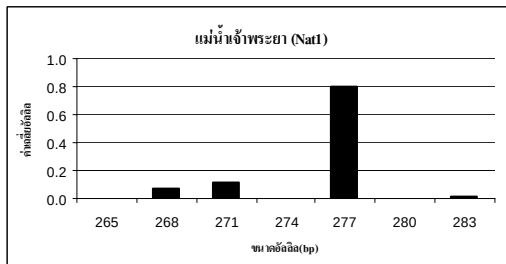


ภาพที่ 3 (ต่อ)

Mbr-5

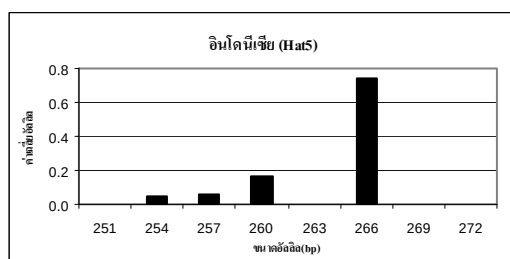
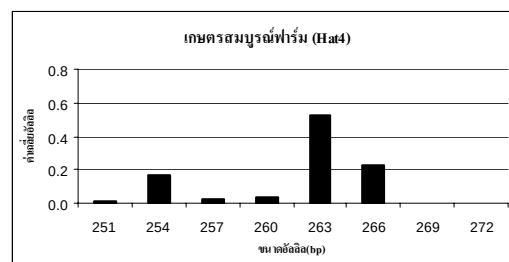
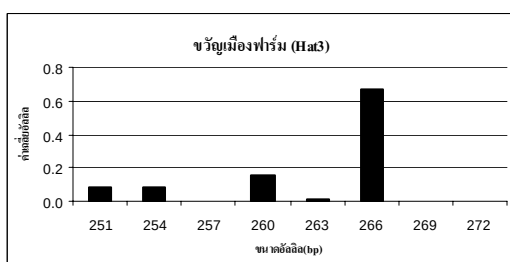
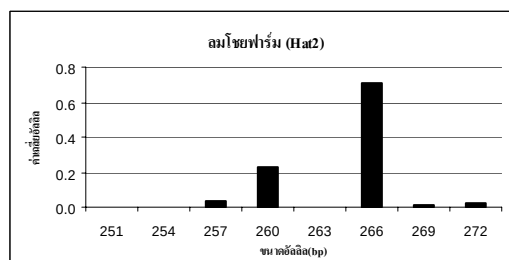
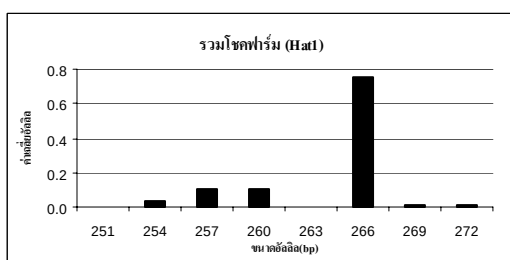
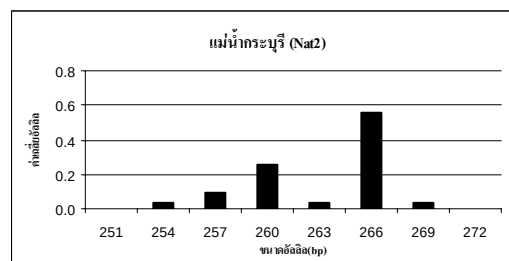
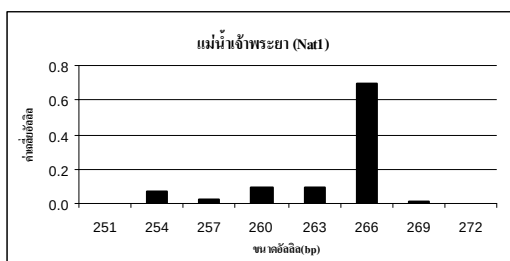


ภาพที่ 3 (ต่อ)

Mbr-7

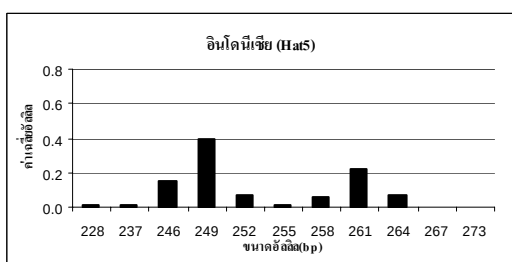
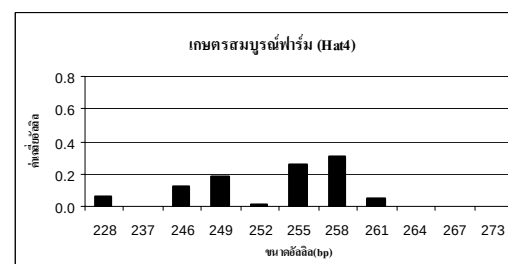
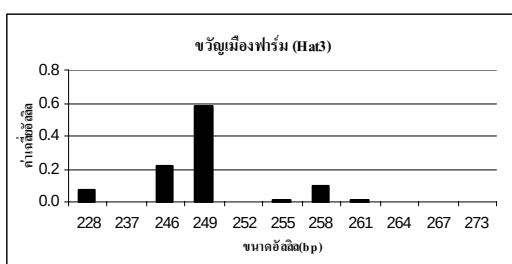
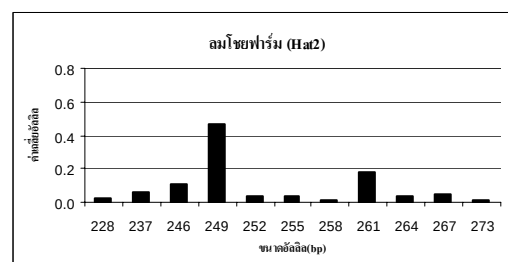
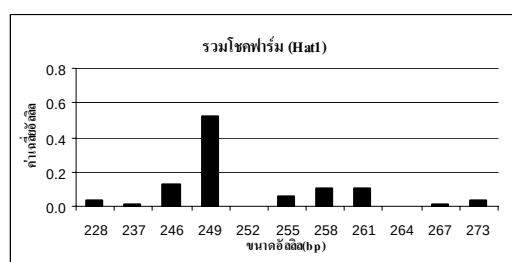
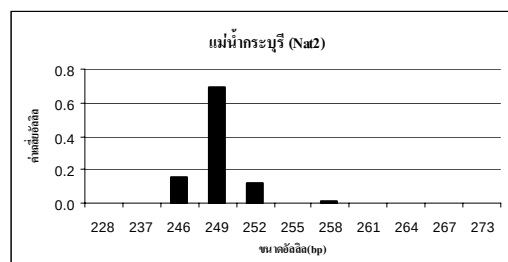
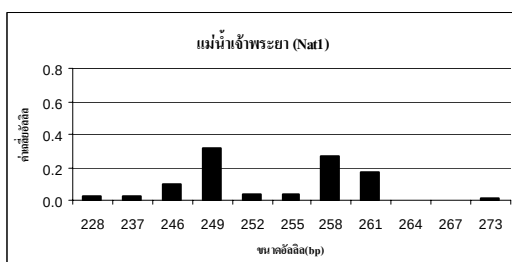
ภาพที่ 3 (ต่อ)

Mbr-8



ภาพที่ 3 (ต่อ)

Mbr-10



ภาพที่ 3 (ต่อ)

3.4 ค่าสังเกต และค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี

ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o) มีค่าระหว่าง 0.57-0.67 ส่วนค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี (H_e) มีค่าระหว่าง 0.64-0.73 ซึ่งจากค่า F_{is} พบว่าทุกประชากรมีค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตีต่ำกว่าค่าคาดหวัง ยกเว้นประชากรจากขวัญเมืองฟาร์ม (Hat 3) มีค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตีสูงกว่าค่าคาดหวัง (ตารางที่ 5)

3.5 การทดสอบ Hardy-Weinberg Equilibrium

การทดสอบการเข้าสู่สมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (ตารางที่ 6) โดยพิจารณาแยกในแต่ละตำแหน่ง พบว่า ตำแหน่งที่ *Mbr-7* อยู่ในสมดุลทุกประชากร ส่วนตำแหน่ง *Mbr-1* มีประชากรที่ไม่อยู่ในสมดุล คือ Nat 1, Hat 1, Hat 2, Hat 3 และ Hat 5 ตำแหน่ง *Mbr-2* คือ Nat 1, Nat 2, Hat 1, Hat 3 และ Hat 4 ตำแหน่งที่ *Mbr-5* คือ Nat 2, Hat 1, Hat 2 และ Hat 4 ตำแหน่งที่ *Mbr-8* และ *Mbr-10* คือ Hat 4 และ Hat 3 ตามลำดับ จากข้อมูลพบว่าตำแหน่ง *Mbr-1*, *Mbr-2* และ *Mbr-5* ไม่อยู่ในสมดุลจำนวน 5, 5 และ 4 ประชากร ตามลำดับ จากที่ศึกษาทั้งหมด 7 ประชากร

เมื่อพิจารณาในแต่ละประชากร พบว่า ประชากร Nat 1 เบี่ยงเบนจากสมดุล 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง *Mbr-1* และ *Mbr-2* ประชากร Nat 2 จำนวน 2 ประชากร คือ *Mbr-2* และ *Mbr-5* ประชากร Hat 1 จำนวน 3 ประชากร คือ *Mbr-1*, *Mbr-2* และ *Mbr-5* ประชากร Hat 2 และ Hat 5 เบี่ยงเบนจากสมดุลเพียงตำแหน่งเดียว คือ *Mbr-1* เช่นเดียวกัน ประชากร Hat 3 จำนวน 4 ตำแหน่ง คือ *Mbr-1*, *Mbr-2*, *Mbr-5* และ *Mbr-10* สุดท้ายคือประชากร Hat 4 เบี่ยงเบนจากสมดุล 3 ตำแหน่ง คือ *Mbr-2*, *Mbr-5* และ *Mbr-8* ผลการทดสอบสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของแต่ละประชากรพิจารณาจากทุกตำแหน่ง พบว่าทุกประชากรไม่อยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

3.6 การทดสอบ Linkage disequilibrium

ในการทดสอบ linkage disequilibrium พบความเกี่ยวพันในระหว่างไมโครแซทเทลไลต์ 2 ตำแหน่ง ในประชากรจำนวน 4 ประชากร ได้แก่ ประชากรแม่น้ำเจ้าพระยา (Nat 1) ระหว่างคู่ของ *Mbr1-Mbr7* ประชากรรวมโชคฟาร์ม (Hat 1) ระหว่างคู่ของ *Mbr1-Mbr2* และประชากรจากเกษตรสมบูรณ์ฟาร์ม (Hat 4) ระหว่างคู่ของ *Mbr5-Mbr8* และ *Mbr8-Mbr10* ส่วนประชากรขวัญเมืองฟาร์ม (Hat 3) พบความเกี่ยวพันของไมโครแซทเทลไลต์ทั้งหมด 10 คู่ (*Mbr1-Mbr2*,

Mbr1-Mbr5, *Mbr1-Mbr7*, *Mbr1-Mbr8*, *Mbr2-Mbr8*, *Mbr5-Mbr8*, *Mbr7-Mbr8*, *Mbr1-Mbr10*, *Mbr5-Mbr10* และคู่ *Mbr8-Mbr10*) จากการศึกษานิโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด 15 คู่ (ตารางที่ 7)

3.7 การทดสอบความแตกต่างของประชากร

ในการทดสอบความแตกต่างของประชากรด้วยวิธี Markov chain จำนวน 21 คู่ ประชากรและปรับระดับความน่าจะเป็นด้วย Bonferroni correction ($P < 0.0024$) พบว่าคู่ประชากรที่มีความแตกต่างที่ไมโครแซทเทลไลท์ทุกตำแหน่ง คือ แม่น้ำกระบือ (Nat2) – ขวัญเมืองฟาร์ม (Hat3) เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากรด้วย Fisher's method ที่ทุกตำแหน่ง พบว่ามีความแตกต่างในระหว่างประชากรทุกคู่ประชากร (ตารางที่ 8)

3.8 การทดสอบ Pairwise F_{ST}

ค่า Pairwise F_{ST} ในตารางที่ 9 พบว่าประชากรที่ศึกษามีความแตกต่างกันทุกคู่ประชากร เมื่อปรับระดับความน่าจะเป็นด้วย Bonferroni correction ($P < 0.0024$)

3.9 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance)

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของ Nei (1978) แสดงในตารางที่ 9 มีค่าระหว่าง 0.0081-0.0869 ซึ่งพบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากโรงเพาะฟักด้วยกัน มีค่า 0.0102-0.0948 ระหว่างประชากรธรรมชาติ คือ แม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำกระบือ (Nat 1-Nat 2) มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.0318 และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างโรงเพาะฟักกับประชากรธรรมชาติ มีค่าระหว่าง 0.0081-0.0869 อย่างไรก็ตามพบว่าประชากรธรรมชาติจากแม่น้ำเจ้าพระยา กับโรงเพาะฟักประเทศอินโดนีเซีย (Nat 1-Hat 5) มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.0081 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรธรรมชาติด้วยกัน (Nat 1-Nat 2) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0318

3.10 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

การสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงด้วยวิธี UPGMA (ภาพที่ 4) พบว่า ประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยา (Nat 1) และประเทศอินโดนีเซีย (Hat 5) มีพันธุกรรมคล้ายคลึงกันมากที่สุด (bootstrap = 60%) ส่วนประชากรสายพันธุ์พื้นเมือง (รวมโชคฟาร์มและ

ลมโชยฟาร์ม) มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันแต่น้อยกว่าความสัมพันธ์ระหว่างคู่แรก (bootstrap = 56%) อย่างไรก็ตาม ทั้งสองคู่ประชากรจับกันเป็นกลุ่มเดียวด้วยค่า bootstrap 74% ส่วนประชากรจากแม่น้ำกระบุรี (Nat 2) ประชากรจากขวัญเมืองฟาร์ม (Hat 3) และเกษตรสมบูรณ์ฟาร์ม (Hat 4) มีพันธุกรรมที่ห่างไกลจากประชากรอื่น ๆ และไม่รวมกลุ่มกับประชากรใด

3.11 ค่าสัมประสิทธิ์ F_{ST}

ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ F_{ST} เฉลี่ยทุกตำแหน่งเท่ากับ 0.0621 ซึ่งจากการทดสอบค่าเฉลี่ย F_{ST} ด้วยวิธี Bootstrapping ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% พบว่าค่าเฉลี่ย F_{ST} มีค่าสูงกว่า 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (CI = 0.0415-0.0917) และแสดงว่าประชากรที่นำมาศึกษานี้มีการแบ่งเป็นประชากรย่อย (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 5 จำนวนประชากร จำนวนตัวอย่าง จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง (A) ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง ค่า Allelic richness (A_r) ค่าเฉลี่ยสังเกต-
เฮเทอโรไซโกซิตี (H_o) และค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี (H_e)

ประชากร	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง (A)						ค่าเฉลี่ย A ($\pm$ SD)	Allelic richness (R_s)						ค่าเฉลี่ย R_s ($\pm$ SD)	ค่าเฉลี่ย		F_{IS}^*
		$Mbr-1$	$Mbr-2$	$Mbr-5$	$Mbr-7$	$Mbr-8$	$Mbr-10$		$Mbr-1$	$Mbr-2$	$Mbr-5$	$Mbr-7$	$Mbr-8$	$Mbr-10$		H_o	H_e	
Nat 1	36	9	11	18	4	6	9	9.50(4.85)	8.75	10.62	16.37	3.75	5.69	8.60	8.96 $\pm$ 4.38	0.62	0.71	0.127
Nat 2	28	10	11	19	4	6	4	9.00(5.73)	10.00	11.00	19.00	3.96	6.00	3.96	8.99 $\pm$ 5.74	0.57	0.68	0.162
Hat 1	50	8	11	19	6	6	9	9.83(4.88)	7.98	9.98	17.21	4.87	4.99	7.88	8.82 $\pm$ 4.55	0.64	0.69	0.072
Hat 2	46	10	12	20	6	5	11	10.67(5.35)	9.55	10.14	16.86	5.49	4.35	9.83	9.37 $\pm$ 4.41	0.62	0.70	0.114
Hat 3	60	8	8	13	5	5	6	7.50(3.02)	6.65	6.51	11.34	3.92	4.45	5.16	6.34 $\pm$ 2.68	0.66	0.64	-0.031
Hat 4	49	9	12	17	5	6	7	9.33(4.50)	8.89	10.91	15.03	4.35	5.34	6.54	8.51 $\pm$ 3.99	0.58	0.73	0.205
Hat 5	36	9	12	18	6	4	9	9.67(4.93)	8.71	11.62	16.50	5.69	3.98	8.25	9.12 $\pm$ 4.47	0.67	0.73	0.082
ค่าเฉลี่ย	43.57							9.36							8.59	0.62	0.70	0.127

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

ตารางที่ 6 การทดสอบสมมุติของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ซึ่งตัวเลขในตารางแสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ (P -value)

ประชากร	$Mbr-1$	F_{IS}	$Mbr-2$	F_{IS}	$Mbr-5$	F_{IS}	$Mbr-7$	F_{IS}	$Mbr-8$	F_{IS}	$Mbr-10$	F_{IS}	All loci
Nat 1	0.0047	+0.231	0.0051	+0.327	0.1097	+0.042	0.1737	+0.181	0.3762	0.000	0.5641	-0.046	0.002
Nat 2	0.0360	+0.165	0.0010	+0.259	<0.0001	+0.259	1.0000	-0.080	0.0340	+0.153	1.0000	-0.019	<0.0001
Hat 1	<0.0001	+0.378	<0.0001	+0.187	<0.0001	+0.033	0.5100	-0.033	0.2500	-0.143	0.0900	-0.158	High sign.
Hat 2	<0.0001	+0.336	0.0072	+0.225	0.7040	-0.018	0.2980	+0.121	0.8410	-0.010	0.9230	-0.025	High sign.
Hat 3	<0.0001	+0.227	0.0020	-0.067	<0.0001	+0.083	0.6680	-0.200	0.2920	-0.218	0.0002	-0.103	High sign.
Hat 4	0.0140	+0.192	<0.0001	+0.416	<0.0001	+0.118	0.3530	+0.079	0.0050	+0.288	0.1570	+0.106	High sign.
Hat 5	<0.0001	+0.372	0.0150	+0.195	0.0790	+0.033	0.5090	-0.107	0.6750	+0.035	0.1090	-0.115	High sign.

Bonferroni correction $P < 0.0071$ (0.05/7)

ตารางที่ 7 การทดสอบ Linkage disequilibrium

ตำแหน่ง	Nat 1	Nat 2	Hat 1	Hat 2	Hat 3	Hat 4	Hat 5
<i>Mbr1-Mbr2</i>	1.0000	1.0000	0.0009	0.9233	<0.0001	0.9848	0.2391
<i>Mbr1-Mbr5</i>	1.0000	1.0000	0.0063	0.4200	<0.0001	0.2317	0.4109
<i>Mbr2-Mbr5</i>	0.2258	1.0000	0.0016	0.0370	0.0136	0.3580	0.0067
<i>Mbr1-Mbr7</i>	0.0004	0.9237	0.0862	0.4515	0.0017	0.1027	0.2153
<i>Mbr2-Mbr7</i>	0.4322	0.6373	0.0328	0.2941	0.0028	0.8124	0.3225
<i>Mbr5-Mbr7</i>	0.1046	0.9148	0.0078	0.5774	0.1544	0.7099	0.9029
<i>Mbr1-Mbr8</i>	0.4662	0.0507	0.0598	0.5286	<0.0001	0.0822	0.3455
<i>Mbr2-Mbr8</i>	0.4357	0.9077	0.1983	0.8287	0.0001	0.0036	0.1843
<i>Mbr5-Mbr8</i>	0.9324	0.6587	0.0042	0.4426	0.0003	<0.0001	0.2135
<i>Mbr7-Mbr8</i>	0.0237	0.8565	0.0790	0.2335	0.0003	0.1677	0.6392
<i>Mbr1-Mbr10</i>	0.1665	0.1823	0.0888	0.7721	<0.0001	0.0288	0.2844
<i>Mbr2-Mbr10</i>	0.3871	0.2499	0.0060	0.1123	0.0148	0.1111	0.3849
<i>Mbr5-Mbr10</i>	0.4936	0.8210	0.1975	0.2825	<0.0001	0.0399	0.0025
<i>Mbr7-Mbr10</i>	0.3495	0.3921	0.3814	0.8576	0.0138	0.3768	0.8816
<i>Mbr8-Mbr10</i>	0.3319	0.5762	0.0579	0.8903	<0.00001	<0.00001	0.1262

Bonferroni correction $P < 0.0033$ (0.05/15)

ตารางที่ 8 การทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากร

Pair-wise	<i>P</i> -value						
	<i>Mbr-1</i>	<i>Mbr-2</i>	<i>Mbr-5</i>	<i>Mbr-7</i>	<i>Mbr-8</i>	<i>Mbr-10</i>	ทุกตำแหน่ง
Nat1-Nat2	0.6647	<0.0001	<0.0001	0.0022	0.0524	<0.0001	<0.0001
Nat1-Hat1	0.0036	0.0016	<0.0001	0.0079	0.0079	0.0193	<0.0001
Nat1-Hat2	0.047	0.003	0.0002	0.3651	0.0001	0.0001	<0.0001
Nat1-Hat3	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1823	0.0007	<0.0001	<0.0001
Nat1-Hat4	0.0012	0.2787	<0.0001	0.0327	<0.0001	0.0001	<0.0001
Nat1-Hat5	0.4659	0.4923	0.0003	0.0586	0.0360	0.0055	<0.0001
Nat2-Hat1	0.0064	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0253	<0.0001	<0.0001
Nat2-Hat2	0.1446	<0.0001	0.0574	0.0005	0.0386	<0.0001	<0.0001
Nat2-Hat3	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001
Nat2-Hat4	0.0139	<0.0001	<0.0001	0.0037	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Nat2-Hat5	0.3546	0.0001	0.0064	<0.0001	0.13	<0.0001	<0.0001
Hat1-Hat2	<0.0001	0.2893	0.1232	0.018	0.0193	0.0099	<0.0001
Hat1-Hat3	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.4328	<0.0001	0.0014	<0.0001
Hat1-Hat4	<0.0001	0.0117	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Hat1-Hat5	0.0341	0.0118	<0.0001	0.0019	0.5550	0.0015	<0.0001
Hat2-Hat3	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1036	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Hat2-Hat4	0.0125	0.0151	<0.0001	0.0065	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Hat2-Hat5	0.0013	0.0981	0.0002	0.7479	0.1836	0.2427	<0.0001
Hat3-Hat4	<0.0001	0.0035	<0.0001	0.0025	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Hat3-Hat5	<0.0001	0.0012	<0.0001	0.0086	0.0046	<0.0001	<0.0001
Hat4-Hat5	0.0002	0.9364	<0.0001	0.0129	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Bonferroni correction $P < 0.0024$ (0.05/21)

ตารางที่ 9 ค่า pairwise F_{ST} (เหนือเส้นทแยงมุม) และค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Nei's genetic distance)

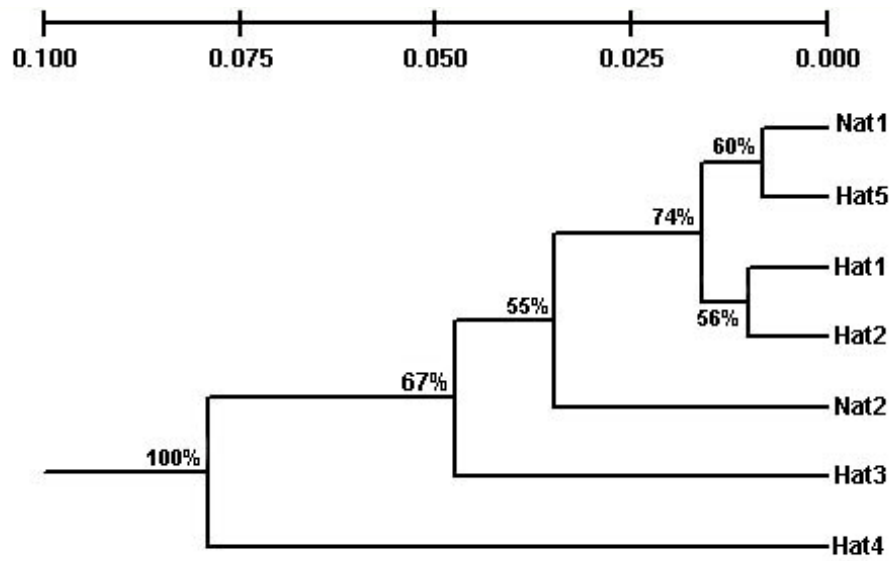
ประชากร	Nat 1	Nat 2	Hat 1	Hat 2	Hat 3	Hat 4	Hat 5
Nat 1	-	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0019
Nat 2	0.0318	-	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Hat 1	0.0224	0.0412	-	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0017
Hat 2	0.0191	0.0346	0.0102	-	<0.0001	<0.0001	0.0012
Hat 3	0.0441	0.0583	0.0458	0.0439	-	<0.0001	<0.0001
Hat 4	0.0486	0.0869	0.0865	0.0810	0.0948	-	<0.0001
Hat 5	0.0081	0.0316	0.0125	0.0098	0.0450	0.0765	-

Pairwise F_{ST} แสดงว่าประชากรที่ศึกษามีความแตกต่างทุกคู่ประชากร ($P < 0.0024$)

ตารางที่ 10 ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ F_{ST} ในไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง

ตำแหน่ง	F_{ST}
<i>Mbr-1</i>	+0.0461
<i>Mbr-2</i>	+0.0381
<i>Mbr-5</i>	+0.0559
<i>Mbr-7</i>	+0.0282
<i>Mbr-8</i>	+0.1414
<i>Mbr-10</i>	+0.0729
ค่าเฉลี่ย	+0.0621*
Bootstrapping ทุกตำแหน่งที่ความเชื่อมั่น 95%	0.0415-0.0917

* ผลการทดสอบมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 4 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA

วิจารณ์ผล

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกึ่งก้ามกรามจากโรงเพาะฟักและธรรมชาติ ทั้ง 7 ประชากรไม่มีความแตกต่างกัน โดยทั่วไปพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรโรงเพาะฟักจะต่ำกว่าในประชากรธรรมชาติ เช่น ที่มีรายงานในปลาไน (*Cyprinus caprio* L.) ($A_r=4.436$; $H_o=0.095-0.492$ ในประชากรโรงเพาะฟัก เทียบกับ $A_r=8.221$; $H_o=0.633-0.861$ ในประชากรธรรมชาติ เมื่อวิเคราะห์ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 4 ตำแหน่ง) (Kohlmann *et al.*, 2005) ปลา Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) ($A_r=4-14.75$; $H_o=0.440-0.875$ ในประชากรโรงเพาะฟัก และ $A_r=14.5-21.2$; $H_o=0.783-0.809$ ประชากรธรรมชาติ) (Lundrigan *et al.*, 2005) ทั้งนี้เนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น การใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อยมาใช้เป็นประชากรเริ่มต้น ส่งผลให้บางอัลลีลสูญหายไป จากนั้นหากพ่อแม่พันธุ์มีจำนวนน้อยอย่างต่อเนื่อง ก็จะทำให้เกิดจากการผสมเลือดชิดในที่สุด ซึ่งจะมีผลไปในการลดระดับเฮเทอโรไซโกซิตี (Hedrick, 2005) การที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกึ่งก้ามกรามจากโรงเพาะฟักในการศึกษานี้ มีความหลากหลายไม่ต่างจากประชากรธรรมชาติ อาจแสดงถึงการจัดการพ่อแม่พันธุ์ที่ถูกต้อง คือมีการใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนมาก จากการสอบถามพบว่าโรงเพาะฟักที่เลี้ยงกึ่งสายพันธุ์พื้นเมือง (รวมโชค-ฟาร์มและลมโชคฟาร์ม) ไม่ได้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์เอง แต่จะใช้วิธีซื้อแม่กึ่งที่มีไข่ติดหน้าท้องแล้วจำนวนมาก ๆ มาปล่อยให้วางไข่ (สมพงษ์, 2546) การทำเช่นนี้อาจมีส่วนทำให้คงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรไว้ได้

การที่ประชากรโรงเพาะฟัก มีความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่ต่างจากประชากรธรรมชาติ แม้จะพบไม่บ่อยนัก แต่ก็มีรายงานอยู่บ้าง เช่น ในปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) ในประเทศนอร์เวย์ และไอร์แลนด์ พบว่าปลาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงมีค่า $A = 6.8-11.9$ และ $H_o = 0.41-0.64$ ขณะที่ประชากรธรรมชาติมีค่า $A = 7.6-11.5$ และ $H_o = 0.0.64-0.68$ (Norris, 1999) นอกจากนั้นในบางกรณีพบว่า ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งลดลงในประชากรโรงเพาะฟัก แต่ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีไม่ลดลงเมื่อเทียบกับประชากรธรรมชาติ เช่นที่มีรายงานในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในประเทศฟิลิปปินส์ (ประชากรจากธรรมชาติ และประชากรโรงเพาะฟักมีค่า $A = 23.9$ และ 12.8 ตามลำดับ และ $H_o = 0.750-0.791$ และ $0.742-0.798$ ตามลำดับ (Xu *et al.*, 2001) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ปกติ โดย Allendorf and Phelps (1980) สรุปไว้ว่าค่าเฮเทอโรไซโกซิตีไม่วิต่อการขาดช่วงทางพันธุกรรม ทำให้ค่านี้ใช้วัดการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ภายในประชากรได้ไม่ดีเท่ากับจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง เช่น ถ้าเกิดปรากฏการณ์คอขวดขึ้นในประชากร จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง จะลดลงในขณะที่ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Xu *et al.*, 2001; Kalinowski, 2004; Lundrigan *et al.*, 2005; Machado-Schiaffino *et al.*, 2007)

อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้เช่นกันว่า ประชากรกึ่งก้ำกรามในธรรมชาติ (ประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำกระบือ) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง จนมีค่าไม่แตกต่างจากประชากรโรงเพาะฟัก ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ศึกษาโดยใช้ไมโทคอนเดรียไลต์ในสัตว์น้ำจืด เช่น ปลา และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ มีค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งเท่ากับ 7.6 และ ค่าเฉลี่ยสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตีเท่ากับ 0.46 (DeWoody and Avise, 2000)

ประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยา อาจสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากการผสมพันธุ์กับกึ่งจากโรงเพาะฟัก ซึ่งเป็นกึ่งที่กรมประมงปล่อย ตามนโยบายการเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำ โดยพบว่า ในแต่ละปีมีการปล่อยกึ่งลงแม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำอื่น ๆ ภายในประเทศ ไม่ต่ำกว่า 10 ล้านตัว ทุกปี (กรมประมง, 2541; 2542; 2543; 2546; 2547) ซึ่งการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมในกึ่งประชากรธรรมชาติเนื่องจากการผสมพันธุ์กับกึ่งจากโรงเพาะฟัก มีตัวอย่างจากรายงานในกึ่งกุ้งม้าม (*Marsupenaeus japonicus*) ที่พบว่ากึ่งจากแหล่งธรรมชาติ ($A_e = 8.58$ และ $H_o = 0.7370$) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่แตกต่างจากประชากรโรงเพาะฟัก ($A_e = 6.86$ และ $H_o = 0.6935$) สาเหตุอาจเกิดเนื่องจากการหลุดรอด หรือปล่อยกึ่งจากโรงเพาะฟักลงไปสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ (Luan *et al.*, 2006) ส่วนกึ่งก้ำกรามแม่น้ำกระบือนั้น แม้จะไม่มีรายงานการปล่อยกึ่งลงในแม่น้ำสายนี้มาเป็นระยะเวลากว่า 10 ปี (สุดา, การติดต่อส่วนตัว) แต่ความหลากหลายทางพันธุกรรมอาจลดลงเนื่องจากสาเหตุต่าง ๆ เช่น การจับจนเกินกำลังผลิต และ/หรือ การที่สภาพแวดล้อมเสื่อมโทรมลง

เมื่อพิจารณาจากการทดสอบสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าประชากรทั้งหมดมีความถี่ยีนในไทป์ไม่อยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก โดยมีโฮโมไซโกตมากกว่าค่าคาดหวัง (ยกเว้นในประชากรจากวิทยุเมืองฟาร์ม ที่มีโฮโมไซโกตน้อยกว่าค่าคาดหวัง) ซึ่งการที่ประชากรไม่อยู่ในสมดุล อาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น การผสมเลือดชิด การมี null allele หรือการมีประชากรที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันมากกว่า 1 ประชากรอยู่ในตัวอย่างเดียวกัน (Wahlund effect) หรืออาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้มีน้อยทำให้ไม่ครอบคลุมยีนในไทป์ทุกยีนในไทป์ที่เป็นไปได้ทั้งหมด (Hedrick, 2005) เช่น ตำแหน่ง *Mbr-1*, *Mbr-2* และ *Mbr-3* มีจำนวนอัลลีลเท่ากับ 10, 13 และ 27 อัลลีล ตามลำดับ ซึ่งจำนวนยีนในไทป์ที่เป็นไปได้ คือ 55, 91 และ 378 ตามลำดับ โดยจำนวนตัวอย่างที่เรานำมาศึกษามีเพียง 28-60 ตัวอย่าง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ประชากรจากโรงเพาะฟักมีการนำพ่อแม่พันธุ์จากต่างประเทศเข้ามาปะปนกับสายพันธุ์ภายในประเทศ (Wahlund effect) รวมทั้งโรงเพาะฟักส่วนใหญ่รวบรวมพ่อแม่พันธุ์มาจากหลายแหล่งแต่ไม่มีข้อมูลประวัติที่ใช้ยืนยัน

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากค่า F_{IS} ของ ไมโครแซทเทลไลต์ แต่ละตำแหน่งแล้ว พบว่า ประชากรที่ไม่อยู่ในสมมูลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก มีโฮโมไซโกตมากกว่าค่าคาดหวังในบางตำแหน่ง เท่านั้น (1-3 ตำแหน่ง จากทั้งหมด 6 ตำแหน่ง) จึงเป็นไปได้ว่าเกิดการผสมเลือดชิดในประชากร นั้น ๆ เนื่องจากการผสมเลือดชิดจะมีผลต่อยีนทุก ๆ ตำแหน่งเท่า ๆ กัน นอกจากนั้นค่าเฮเทอโร-ไซโกติของประชากรทั้งหมดยังอยู่ในระดับสูง รวมทั้งค่าความหลากหลายของอัลลิลมีค่าใกล้เคียง กัน ทำให้การผสมเลือดชิดไม่น่าจะเป็นสาเหตุของการเบี่ยงเบนจากสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก และ ไม่พบ null allele จากการทดสอบ Mendelian inheritance ใน ไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 6 ตำแหน่ง ที่ศึกษา ดังนั้นการปะปนกันระหว่างประชากรที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันน่าจะเป็นสาเหตุของการ ไม่อยู่ในสมมูลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

ประชากรโรงเพาะฟักจากขวัญเมืองฟาร์ม (Hat 3) มีโฮโมไซโกตน้อยกว่าค่าคาดหวัง และมีค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรที่ศึกษาทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบ Linkage disequilibrium ของไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 10 คู่ จากทั้งหมด 15 คู่ ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับข้อมูลของฟาร์ม ที่พบว่ามีกรนำเข้าพ่อแม่พันธุ์จากประเทศพม่า โดย ตัวอย่างที่ศึกษาเป็นลูกรุ่นที่ 2 จากผลการศึกษาวิเคราะห์ได้ว่า พ่อแม่พันธุ์จากพม่าที่นำเข้ามา มี จำนวนไม่มาก (หรืออาจมีจำนวนมาก แต่มีเพียงไม่กี่คู่ ที่ประสบความสำเร็จในการผสมพันธุ์) จึงทำ ให้ จำนวนอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่งต่ำ การที่เฮเทอโรไซโกตมีค่าสูงกว่าค่าทางทฤษฎี อาจเนื่องจาก ความถี่ของอัลลิลมีการเปลี่ยนแปลงไปมา (Shikano *et al.*, 2001)

แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แสดงว่าประชากรจากรวมโชคฟาร์ม (Hat 1) และ ลมโชยฟาร์ม (Hat 2) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับประชากรจาก แม่น้ำเจ้าพระยา ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับประวัติของทั้งสองประชากร ซึ่งเป็นสายพันธุ์พื้นเมือง (Local stock) ที่เกิดจากการนำกึ่งกำกรามจากแม่น้ำเจ้าพระยา (Nat 1) มาเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา นานกว่า 20 ปี นอกจากนั้น การปล่อยกึ่งจากโรงเพาะฟักลงไปในแม่น้ำเจ้าพระยา ก็ยังทำให้ ประชากรธรรมชาติและประชากรโรงเพาะฟักคล้ายคลึงกันยิ่งขึ้น การจัดการพันธุกรรมของโรง-เพาะฟักกึ่งกำกรามทั่ว ๆ ไป ซึ่งใช้แม่กึ่งที่รวบรวมจากฟาร์มเลี้ยงหลาย ๆ ฟาร์มมาเพาะ โดยไม่ได้ เจาะจงว่าจะต้องมาจากฟาร์มใด เป็นผลให้กึ่งกำกรามจากรวมโชคฟาร์ม (Hat 1) และลมโชยฟาร์ม (Hat 2) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก

ส่วนประชากรจากประเทศอินโดนีเซีย (Hat 5) มีความคล้ายคลึงกับประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยามาก ทั้งนี้ประวัติที่แท้จริงของกุ่มอินโดนีเซียนี้ไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีความเป็นไปได้มากกว่า อาจเป็นกุ่มสายพันธุ์ไทยที่นำไปเพาะเลี้ยงก็ได้ (Antoro, การติดต่อส่วนตัว)

ประชากรขัวญเมืองฟาร์ม (Hat 3) ซึ่งนำเข้าพ่อแม่พันธุ์มาจากประเทศพม่า มีความคล้ายคลึงกับกุ่มจากแม่น้ำกระบุรี (Nat 2) มากกว่ากุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา (Nat 1) และแม้ว่าโดยสภาพภูมิศาสตร์แม่น้ำกระบุรีจะไม่ได้ติดต่อกับแม่น้ำอื่น ๆ ในประเทศพม่าโดยตรง แต่มีรายงานว่ากุ่มก้ามกรามจากแม่น้ำกระบุรี มีพันธุกรรมคล้ายคลึงกับกุ่มก้ามกรามจากแม่น้ำในประเทศบังคลาเทศ (de Bruyn, 2005) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับแม่น้ำอื่น ๆ ในประเทศพม่า เช่น แม่น้ำอิระวดี และแม่น้ำสาละวิน (Zakaria-Ismail, 1994) ดังนั้นการที่พบว่ากุ่มจากขัวญเมืองฟาร์มคล้ายกับกุ่มแม่น้ำกระบุรีมากกว่ากุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา จึงสอดคล้องกับข้อมูลข้างต้น

ประชากรจากเกษตรสมบูรณ์ฟาร์ม (Hat 4) มีความแตกต่างจากประชากรอื่นมากที่สุด ทั้งนี้แม้ไม่มีข้อมูลชัดเจนเกี่ยวกับแหล่งที่มาของสายพันธุ์ดังกล่าว ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้ก็แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ดังกล่าวไม่น่าจะเกิดจากประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำกระบุรี โดยอาจมาจากแหล่งที่ห่างไกลกว่านี้เช่น ประเทศอินเดีย

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกึ่งก้ำกักรากจากโรงเพาะฟัก มีค่าปานกลาง โดยมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง เท่ากับ 9.40 ค่าเฉลี่ย allelic richness เท่ากับ 8.43 และค่าเฉลี่ยค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี เท่ากับ 0.70 ขณะที่ประชากรกึ่งก้ำกักรากจากธรรมชาติ มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง เท่ากับ 9.36 ค่าเฉลี่ย allelic richness เท่ากับ 8.59 และค่าเฉลี่ยค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี เท่ากับ 0.62 ซึ่งพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งจากโรงเพาะฟัก และธรรมชาติไม่แตกต่างกันทางสถิติ ประชากรที่ศึกษามีความถี่ยีนไม่อยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กทุกประชากร เนื่องจากมีประชากรที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่า 1 ประชากรเข้ามาผสม

แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงว่า ประชากรจากแม่น้ำเจ้าพระยา (Nat 1) และโรงเพาะฟักจากประเทศอินโดนีเซีย (Hat 5) มีพันธุกรรมคล้ายคลึงกันมากที่สุด (bootstrap = 60%) ส่วนประชากรโรงเพาะฟักสายพันธุ์พื้นเมือง (รวมโชคฟาร์ม และลมโชยฟาร์ม) มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันแต่น้อยกว่าความสัมพันธ์ระหว่างคู่แรก (bootstrap = 56%) อย่างไรก็ตาม ทั้งสองคู่ประชากรจับกันเป็นกลุ่มเดียวด้วยค่า bootstrap 74% ในขณะที่ประชากรจากแม่น้ำกระบือ (Nat 2) ประชากรจากขวัญเมืองฟาร์ม (Hat 3) และเกษตรสมบูรณ์ฟาร์ม (Hat 4) มีพันธุกรรมที่ห่างไกลจากประชากรอื่น และไม่รวมกลุ่มกับประชากรใด

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาแสดงว่า กุ้งสายพันธุ์พื้นเมือง (Hat 1 และ Hat 2) ของประเทศไทย ยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับหนึ่ง และไม่ได้เกิดการผสมเลือดชิดตามที่เกษตรกรตั้งข้อสังเกต อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้ไม่ได้หมายความว่า ลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น การเจริญเติบโต ความต้านทานโรค จะไม่เปลี่ยนแปลงไปจากประชากรธรรมชาติ ที่เป็นประชากรเริ่มต้น ทั้งนี้เพราะลักษณะเหล่านั้นอาจเปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากสาเหตุอื่น ๆ เช่น การคัดเลือกทางลบ โดยไม่ตั้งใจ (negative indirect selection) ดังที่ Doyle *et al.* (1983) รายงานว่า การคัดเลือกกุ้งก้ามกรามที่เจริญพันธุ์ในระยะแรกมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ จะมีผลดีต่อการคัดเลือกเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโต แต่ถ้าคัดเลือกกุ้งก้ามกรามที่เจริญพันธุ์ในรุ่นหลังมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ จะเป็นการคัดเลือกทางลบทำให้การเจริญเติบโตลดลง เพราะกุ้งที่เจริญพันธุ์เร็วจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่ากลุ่มที่เจริญพันธุ์ช้า

ผลการศึกษาในสัตว์หลายชนิด แสดงว่าระดับความหลากหลายทางพันธุกรรม อาจสัมพันธ์กับลักษณะปรากฏบางลักษณะ ในขณะที่อาจไม่สัมพันธ์กับบางลักษณะ เช่น การศึกษาในปลา rainbow trout จำนวน 3 สายพันธุ์ พบว่า ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตมีความสัมพันธ์กับค่าเฮเทอโรไซโกซิตี โดยพบว่าค่าการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion ratios) ลดลงเมื่อค่าเฮเทอโรไซโกซิตีสูง และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีมีความสัมพันธ์เชิงลบกับค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rates) แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับค่าอัตราการตายสะสม (cumulative mortality) และค่าการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของเชื้อ IHNV ดังนั้นจึงควรศึกษาลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประชากรพื้นเมืองนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับความสามารถในการปรับตัว ซึ่งอาจเป็นข้อดีของสายพันธุ์เหล่านี้ การที่ประชากรขวัญเมืองฟาร์ม (Hat 3) มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งต่ำ ทำให้เกิดข้อควรระวังว่า การนำประชากรใหม่เข้ามา เพื่อขยายฐานพันธุกรรม ต้องระวังไม่ให้ค่า N_e ต่ำ ซึ่งค่า N_e นี้ไม่ได้ขึ้นกับจำนวนพ่อแม่พันธุ์ที่นำเข้ามาเพียงอย่างเดียว แต่ต้องพิจารณาถึง สัดส่วนเพศผู้เพศเมียที่ผสมพันธุ์ และอัตราการรอดของลูกแต่ละครอด้วย (Falconer, 1986) การที่ประชากรจากขวัญเมืองฟาร์ม (Hat 3) และเกษตรสมบูรณ์ฟาร์ม (Hat 4) แตกต่างจากประชากรอื่น ๆ มาก หากปล่อยให้เกิดการผสมกับประชากรพื้นเมือง อาจทำให้กลุ่มยีนที่มีประโยชน์ (เช่น ยีนที่ทำให้เกิดการปรับตัว) ซึ่งจับกลุ่มกันระหว่างการเกิด domestication กระเจายาว อาจทำให้สูญเสียลักษณะดี ๆ ของประชากรพื้นเมืองไป ดังนั้นจึงควรมีการควบคุมการผสมข้ามประชากรดังกล่าวกับประชากรพื้นเมือง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2541. รายงานประจำปี 2541.

กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2542. รายงานประจำปี 2542.

กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2543. รายงานประจำปี 2543.

กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2546. รายงานประจำปี 2546.

กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. รายงานประจำปี 2547.

ชลอ ลีเมสุวรรณ และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย.
บริษัทเมจิคพับบลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.

เชิดชาย อมาตยกุล และ ชีรพันธ์ ภูคาสุวรรณค์. 2517. รายงานการสำรวจกุ้งก้ามกรามในประเทศไทย. ฉบับที่ 13. กองบำรุงพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

บุรฉัตร จันทกานต์, ณัฐพงษ์ เพชรฤทธิ์ และ พัลลภ คำบุตรดี. 2547. การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามโดยใช้อัตราส่วนเพศต่างกัน. ฉบับที่ 24. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด ราชบุรี.

ประจวบ หล้าอุบล. 2527. เอกสารคำสอน วิชา กุ้ง (Natantia). ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สมพงษ์ สุวรรณทศ. 2546. กลวิธีการเพาะและอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามในประเทศไทย. เอกสารแนะนำ กรมประมง. กรุงเทพฯ.

ศรียรัตน์ สอดสุข และ พนม กระจำพจน์ สอดสุข. 2541. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกุ้งก้ามกรามจาก 3 แหล่งประเทศไทย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 18/2541 กรมประมง, กรุงเทพฯ.

- Alam, S. and S. Islam. 2005. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. **Aquaculture** 246: 151-160.
- Alarcon, J.A., A. Magoulas, T. Georgakopoulos, E. Zouros and M.C. Alvarez. 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture** 230: 65-80
- Allendorf F.W. and S.R. Phelps. 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of Cutthroat Trout. **American Fisheries Society** 109: 537-543.
- Archie J.W. 1985. Statistical analysis of heterozygosity data: independent sample comparisons. **Evolution** 39: 623-637.
- Chand V., M. de Bruyn and P.B. Mather. 2005. Microsatellite loci in the eastern form of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **Molecular Ecology Notes** 5: 308–310.
- Charoentawee, K., S. Poompuang and U. Na-Nakorn. 2006. Isolation and characterization of microsatellite in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Molecular Ecology Notes** 6: 823-825.
- de Bruyn, M., J.A. Wilson and P.B. Mather. 2004. Huxley's line demarcates extensive genetic divergence between eastern and western forms of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 30: 251-257.
- de Bruyn, M., E. Nugroho, M. M. Hossain, J.C. Wilson and P.B. Mather. 2005. Phylogeographic evidence for the existence of an ancient biogeographic barrier: the Isthmus of Kra Seaway. **Heredity** 94: 370–378.

- Desvignes, J.F., J. Laroche, J.D. Durand and Y. Bouvet. 2001. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus caprio* L.) based on allozymes and microsatellites. **Aquaculture** 194: 291-301.
- DeWoody, J. and J. Avise. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. **Journal of Fish Biology** 56: 461-473.
- Ditlecadet, D., F. Dufresne, N.R. Le François and P.U. Blier. 2006. Applying microsatellites in two commercial strains of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): Potential for a selective breeding program. **Aquaculture** 257: 37–43.
- Doyle, R.W., S. Singholka and M.B. New. 1983. “Indirect selection” for genetic change: A quantitative analysis illustrated with *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture** 30: 237-247.
- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider. 2005. **Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis**. Computational and Molecular Population Genetics Lab, University of Berne, Switzerland.
- Falconer, D.S. 1986. **Introduction to Quantitative Genetics**. 2nd ed. Longman, London.
- Goldstein, D.B. 2001. **Microsatellites Evolution and Application**. Oxford University Press Inc., New York.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (ver. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **J. Heredity** 86: 485-486.
- Goudet, J. 2002. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indice (version 2.9.1)**. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet(1995).

- Goyard, E., S. Arnaud, V. Vonau, V. Bishoff, O. Mouchel, D. Pham, J. Wyban. and P. Boudry. 2003. Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. **Aquat. Living Resour.** 16: 501–508.
- Hara, M. and M. Sekino. 2003. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. **Aquaculture** 217: 107-114.
- Hedrick, P.W. 1985. **Genetics of populations**. Jones and Bartlett Publishers, Inc., USA.
- _____, P.W. 2005. **Genetics of populations**. Jones and Bartlett Publishers, Inc., USA
- Kalinowski, S.T. 2004. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics** 5: 539–543.
- _____, S.T. 2005. HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. **Molecular Ecology Notes** 5: 187-189.
- Kohlmann, K., P. Kersten and M. Flajshans. 2005. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus caprio* L.) populations. **Aquaculture** 247: 253-266.
- Krishnamurthy, K.V. 2003. **Textbook of Biodiversity**. Science Publishers, Inc. USA.
- Leberg, P.L. 2002. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. **Molecular Ecology** 11: 2445-2449.
- Luan, S., J. Kong and Q.Y. Wang. 2006. Genetic variation of wild and cultured populations of the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate 1888) using microsatellites. **Aquaculture Research** 37: 785-792.

- Lundrigan, T.A., J.D. Reist and M.M. Ferguson. 2005. Microsatellite genetic variation within and among Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from aquaculture and natural populations in North America. **Aquaculture** 244: 63-75.
- Machado-Schiaffino, G., E. Dopico and E. Garcia-Vazquez. 2007. Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. **Aquaculture** 264: 59–65
- Miller, M.P. 1997. **Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) version 1.3**. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Arizona.
- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Ann. Human. Genet.** 41: 225-233.
- _____. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**. 89: 583-590.
- 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.
- Pampoulie, C., T.D. Jorundsdottir, A. Steinarsson, G. Petursdottir, M.O. Stefannson, A.K. Danielsdottir. 2006. Genetic comparison of experimental farmed strains and wild Icelandic populations of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Aquaculture** 261: 556-564.
- Petit, R.J., A.E. Mousadik and O. Pons. 1998. Identifying Populations for Conservation on the Basis of Genetic Markers. **Conservation Biology** 12: 844-855.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Heredity** 86: 248-249.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution** 43: 223-225.

- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco.
- Shikano, T., T. Chiyokubo and N. Taniguchi. 2001. Temporal changes in allele frequency, genetic variation and inbreeding depression in small populations of the guppy, *Poecilia reticulata*. **Heredity** 86: 153-160.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. 1969. **Biometry; The Principles and Practice of Statistic in Biological Research**. W.H. Freeman and Company, New York.
- Taggart, J.B., R.A. Hynes., P.A. Prodohl and A. Ferguson. 1992. Asimplified protocol for routine total DNA isolation from Salmonid fishes. **Journal of Fish Biology** 40: 963-965.
- Xu, Z., J.H. Primavera, L.D. de la Pena., P. Pettit, J. Belak and A. Alcivar-Warren. 2001. Genetic diversity of wild and cultured Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. **Aquaculture** 199: 13-40.
- Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle. 2000. **POPGENE version 1.32 Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis**. University of Alberta and Center for International Forestry Research, Alberta, Canada.
- Zakaria-Ismail, M. 1994. Zoogeography and biodiversity of the freshwater fishes of Southeast Asia. **Hydrobiologia** 285: 41-48.

ภาคผนวก

สารละลายสำหรับการหาขนาดของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ

1. 40% acrylamide gel (19:1) (500 ml)

Acrylamide	190	g
Bis-acrylamide	10	g

2. 5% acrylamide gel (500 ml)

40% acrylamide	62.5	ml
5X TBE	100	ml
Urea	225	g

3. 5% denaturing polyacrylamide gel

5% acrylamide gel	70	ml
TEMED	70	μl
APS	400	μl

สารเคมีสำหรับการย้อมเจดด้วยวิธี Silver staining

1. 10% glacial acetic acid (1500 ml)

glacial acetic acid	150	ml
deionized H ₂ O	1350	ml

2. staining solution (2000 ml)

Silver nitrate	2	g
37% formaldehyde	3	ml

3. developing solution (1500 ml)

Na ₂ CO ₃ anhydrous	50	g
37% formaldehyde	2.25	ml
10 mg/ml Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	250	μl

ตารางผนวกที่ 1 แสดงความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่งในกิ้งก่ามกรม
7 ประชากร

ตำแหน่ง	ขนาด (bp)	Nat1	Nat2	Hat1	Hat2	Hat3	Hat4	Hat5
<i>Mbr-1</i>	264	0.0139	0.0185	0.0816	0.0543	0.0086	0.0510	0.0000
	268	0.0833	0.0926	0.1224	0.0870	0.4052	0.0306	0.0429
	274	0.1250	0.0556	0.0510	0.2065	0.2069	0.0816	0.1143
	276	0.0694	0.0741	0.1429	0.0870	0.0172	0.1224	0.1571
	282	0.1528	0.2037	0.1735	0.1413	0.0086	0.0918	0.1857
	292	0.2222	0.1852	0.1020	0.1304	0.1293	0.0816	0.1571
	298	0.1944	0.1296	0.2653	0.0435	0.1034	0.1327	0.2143
	300	0.0833	0.0926	0.0000	0.1413	0.1207	0.2755	0.0286
	304	0.0556	0.1111	0.0612	0.0978	0.0000	0.1327	0.0857
	310	0.0000	0.0370	0.0000	0.0109	0.0000	0.0000	0.0143
<i>Mbr-2</i>	298	0.2000	0.1111	0.4600	0.4333	0.2333	0.2449	0.2500
	300	0.3000	0.0741	0.2100	0.2444	0.4417	0.3571	0.3194
	304	0.0286	0.1481	0.0400	0.0111	0.1667	0.0816	0.0694
	306	0.0286	0.0370	0.0400	0.0222	0.0083	0.0204	0.0278
	314	0.0143	0.0370	0.0300	0.0444	0.0000	0.0510	0.0417
	318	0.0714	0.0185	0.0300	0.0667	0.0167	0.0306	0.0556
	322	0.0286	0.0000	0.0800	0.0222	0.0083	0.0102	0.0000
	324	0.0857	0.0000	0.0400	0.0889	0.0917	0.0510	0.0556
	328	0.0571	0.0741	0.0400	0.0222	0.0333	0.0510	0.0417
	334	0.1143	0.1667	0.0100	0.0111	0.0000	0.0306	0.0417
	336	0.0714	0.1852	0.0200	0.0000	0.0000	0.0510	0.0417
	338	0.0000	0.0741	0.0000	0.0111	0.0000	0.0000	0.0417
	340	0.0000	0.0741	0.0000	0.0222	0.0000	0.0204	0.0139
<i>Mbr-5</i>	276	0.0694	0.0000	0.0000	0.0000	0.0089	0.0851	0.0000
	280	0.0139	0.0000	0.0200	0.0000	0.0000	0.0213	0.0139
	282	0.0694	0.0000	0.0200	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	284	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000	0.0000

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตำแหน่ง	ขนาด (bp)	Nat1	Nat2	Hat1	Hat2	Hat3	Hat4	Hat5
<i>Mbr-5</i>	286	0.0278	0.0000	0.0200	0.0111	0.4018	0.0426	0.0278
	288	0.0278	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0139
	290	0.0000	0.1111	0.0000	0.0111	0.0000	0.0000	0.0556
	292	0.0000	0.0370	0.0000	0.0000	0.0446	0.0000	0.0000
	294	0.0000	0.0370	0.0700	0.0111	0.0179	0.0106	0.0139
	296	0.0000	0.0000	0.0400	0.0222	0.0268	0.0000	0.0278
	298	0.0139	0.0556	0.0600	0.1000	0.0446	0.1170	0.0139
	300	0.0972	0.0556	0.0000	0.0556	0.0179	0.0957	0.0556
	302	0.0139	0.0926	0.0300	0.0556	0.0000	0.0319	0.0972
	304	0.0139	0.0926	0.0500	0.0667	0.0714	0.1383	0.0278
	306	0.1528	0.1111	0.0400	0.1000	0.0714	0.0532	0.0833
	308	0.0694	0.0185	0.1300	0.0556	0.1250	0.1596	0.0694
	310	0.0833	0.0741	0.2300	0.2667	0.0179	0.0000	0.0972
	312	0.0139	0.0741	0.0200	0.0222	0.0000	0.0213	0.0278
	314	0.0139	0.0185	0.0300	0.0111	0.0000	0.0851	0.0000
	316	0.0556	0.0185	0.0500	0.0222	0.0000	0.0000	0.1111
	318	0.0833	0.0741	0.0700	0.0667	0.0000	0.0426	0.0000
	320	0.0556	0.0370	0.0400	0.0333	0.0000	0.0213	0.1944
	322	0.0000	0.0185	0.0000	0.0222	0.0000	0.0000	0.0000
	324	0.0000	0.0185	0.0100	0.0000	0.0000	0.0000	0.0139
	326	0.0000	0.0370	0.0000	0.0111	0.0000	0.0106	0.0000
	328	0.1250	0.0185	0.0400	0.0444	0.0268	0.0532	0.0556
	330	0.0000	0.0000	0.0300	0.0111	0.0000	0.0106	0.0000
<i>Mbr-7</i>	265	0.0000	0.0000	0.0100	0.0000	0.0000	0.0102	0.0139
	268	0.0694	0.0000	0.2400	0.0978	0.1780	0.1020	0.0972
	271	0.1111	0.0179	0.0900	0.1413	0.1017	0.0204	0.1389
	274	0.0000	0.0000	0.0100	0.0326	0.0085	0.0000	0.0278
	283	0.0139	0.0357	0.0000	0.0435	0.0085	0.0714	0.0972

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตำแหน่ง	ขนาด (bp)	Nat1	Nat2	Hat1	Hat2	Hat3	Hat4	Hat5
<i>Mbr-8</i>	251	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0104	0.0000
	254	0.0694	0.0357	0.0300	0.0000	0.0833	0.1667	0.0417
	257	0.0278	0.0893	0.1000	0.0326	0.0000	0.0208	0.0556
	260	0.0972	0.2500	0.1000	0.2283	0.1583	0.0417	0.1667
	263	0.0972	0.0357	0.0000	0.0000	0.0083	0.5312	0.0000
	266	0.6944	0.5536	0.7500	0.7065	0.6667	0.2292	0.7361
	269	0.0139	0.0357	0.0100	0.0109	0.0000	0.0000	0.0000
	272	0.0000	0.0000	0.0100	0.0217	0.0000	0.0000	0.0000
<i>Mbr-10</i>	228	0.0278	0.0000	0.0300	0.0222	0.0763	0.0625	0.0139
	237	0.0278	0.0000	0.0100	0.0556	0.0000	0.0000	0.0139
	246	0.0972	0.1607	0.1300	0.1111	0.2203	0.1250	0.1528
	249	0.3194	0.6964	0.5200	0.4667	0.5847	0.1875	0.3889
	252	0.0417	0.1250	0.0000	0.0333	0.0000	0.0104	0.0694
	255	0.0417	0.0000	0.0600	0.0333	0.0169	0.2604	0.0139
	258	0.2639	0.0179	0.1000	0.0111	0.0932	0.3021	0.0556
	261	0.1667	0.0000	0.1100	0.1778	0.0085	0.0521	0.2222
	264	0.0000	0.0000	0.0000	0.0333	0.0000	0.0000	0.0694
	267	0.0000	0.0000	0.0100	0.0444	0.0000	0.0000	0.0000
	273	0.0139	0.0000	0.0300	0.0111	0.0000	0.0000	0.0000

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวกัณฐิย์ เจริญทวี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 30 ตุลาคม 2523
สถานที่เกิด	จันทบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(ผลิตภัณฑ์ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์