

โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรปลาคูก้าน (*Clarias batrachus* Linn.) จากลุ่มแม่น้ำ
มูลในจังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดศรีสะเกษ

Population Genetic Structure of Asian Catfish (*Clarias batrachus* Linn.) in
Moon River Basin of Ubon Ratchathani and Si Sa Ket Province

คำนำ

ปลาคูก้าน (*Clarias batrachus* Linn.) เป็นปลาน้ำจืด ซึ่งเป็นปลาพื้นเมืองของประเทศไทย ที่มีผู้นิยมรับประทานและมีราคาดี (เจ็ดนั้น และคณะ, 2538) แต่ในปัจจุบันการอยู่รอดของปลาคูก้านในประเทศไทยลดลงและพบปลาคูก้านเฉพาะในแหล่งน้ำธรรมชาติเท่านั้น เนื่องจากเกษตรกรไม่ให้ความสนใจในการเพาะเลี้ยง และปัญหาจากแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติถูกทำลาย ทำให้ปริมาณปลาคูก้านในธรรมชาติลดลง สำนักนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อมจึงได้จัดปลาคูก้านเป็นปลาที่อยู่ในภาวะถูกคุกคามและมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (สำนักนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, 2540) โดยคาดว่าปลาคูก้านกำลังสูญเสียวความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยมีสาเหตุจากการสูญเสียนิเวศที่อยู่อาศัย ซึ่งอาจเกิดจากความเสื่อมโทรมตามธรรมชาติ หรือเพราะการกระทำของมนุษย์ จากการรุกรานของชนิดต่างถิ่น (exotic species) ที่นำเข้ามาในประเทศ และการแยกออกเป็นประชากรย่อยๆ ตามภูมิประเทศในธรรมชาติ เป็นต้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องคุ้มครองและอนุรักษ์พันธุ์ปลาคูก้าน โดยการวางแผนการอนุรักษ์นั้นมีความจำเป็นที่จะต้องเข้าใจถึงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปลาคูก้านในธรรมชาติ จึงจะสามารถรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรให้คงอยู่ จึงมีการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของปลาคูก้าน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการเข้าใจถึงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร และเป็นข้อมูลที่ใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์ปลาคูก้านต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาสภาพภูมิประเทศในบริเวณที่อยู่อาศัยของปลาดุกค้ำาน รวมทั้งคุณลักษณะทางกายภาพอื่นๆ ในบริเวณดังกล่าว
2. ศึกษาโครงสร้างประชากรปลาดุกค้ำานในกลุ่มแม่น้ำมูลบริเวณจังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัดศรีสะเกษ
3. ศึกษาความแตกต่างระหว่างประชากรปลาดุกค้ำานประชากรต่างๆ ในกลุ่มแม่น้ำมูลบริเวณจังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัดศรีสะเกษ

การตรวจเอกสาร

1. ปลาอุกค้ำาน

ปลาอุกค้ำานอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืดทั่วไปในประเทศไทย ในธรรมชาติจะพบเห็นทั่วไปตามแม่น้ำ ลำคลอง หนองบึง โดยปลาอุกค้ำานมีรูปร่างยาว เป็นปลาไม่มีเกล็ด กระดูกท้ายทอยค่อนข้างแหลมตรงกลางจะหยัก (Smith, 1945) ลักษณะของกระดูกหัวขรุขระ หนวดที่ขากรรไกรบนยาวถึงก้านครีบหลังอันที่ 7 หรือ 8 หนวดที่ตางยาวถึงปลายครีบอก ครีบหลังมีก้านครีบอ่อน 65 – 77 อัน ครีบกันมีก้านครีบอ่อน 41 – 58 อัน ลักษณะของครีบหางกลมไม่ติดกับครีบหลังและครีบกัน ครีบท้องกลม ลักษณะฟันที่เพดานปากและที่ขากรรไกรบนเป็นฟันซี่เล็ก ๆ จำนวนกระดูกซี่กรอง 16 – 19 อัน และมีความทนทานต่อการขาดออกซิเจน ส่วนปลาอุกค้ำานที่มีลำตัวสีเทาปนดำหรือสีขาวยังเรียกว่า อุกเผือก ปลาอุกค้ำานที่ลำตัวมีสีค่อนข้างแดง เรียกว่า อุกแดงหรืออุกเงิน พวกนี้ส่วนมากจะมีจุดขาวเล็กๆ ตามตัว (เจ็ดฉัน และคณะ, 2538) แหล่งกำเนิดของปลาอุกค้ำานมีอยู่ทั่วไปในน่านน้ำเขตร้อนแถบเอเชีย ได้แก่ ประเทศอินเดีย ศรีลังกา พม่า ลาว กัมพูชา เวียดนาม อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และไทย โดยในประเทศไทยพบว่ามีแพร่กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ (โยธิน, 2524)

เกษตรกรนิยมเลี้ยงปลาอุกค้ำานกันมากในอดีต จนเมื่อปี พ.ศ.2529 การเลี้ยงปลาอุกค้ำานมีปัญหาเรื่องโรคมามากขึ้น ประกอบกับในปี พ.ศ.2530 ได้มีการนำปลาอุกยักษ์ (*Clarias gariepinus*) ซึ่งเป็นปลาพื้นเมืองของทวีปแอฟริกาเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทย และได้ทำการผสมข้ามระหว่างแม่ปลาอุกอุยกกับพ่อปลาอุกยักษ์ได้ปลาอุกบึกอุยก ซึ่งมีการเจริญเติบโตเร็วและต้านทานโรคได้ดี นอกจากนี้ยังเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากกว่าปลาอุกค้ำาน เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาอุกจึงหันมาเลี้ยงปลาอุกบึกอุยกแทนปลาอุกค้ำาน โดยในปัจจุบันนี้ไม่พบว่ามี การเพาะเลี้ยงปลาอุกค้ำานในเชิงการค้า จะพบประชากรปลาอุกค้ำานเฉพาะในแหล่งน้ำธรรมชาติเท่านั้น และปัญหาจากแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติถูกทำลาย ทำให้ปลาอุกค้ำานในธรรมชาติลดจำนวนลง ในปี พ.ศ.2539 สำนักนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อมได้จัดปลาอุกค้ำานเป็นปลาที่อยู่ในภาวะถูกคุกคามและมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (สำนักนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, 2540)

ปลาอุกค้ำานเป็นปลาที่มีนิสัยดุ ว่องไว ไม่ชอบอยู่นิ่ง ชอบชอกแซกมุดไปตามพื้นโคลนตม และชอบว่ายน้ำกระเสือกกระสนว่ายน้ำวนน้ำออกไปจากแหล่งอาศัยในขณะที่ฝนตกและน้ำไหลลงไป

ในแหล่งน้ำที่อาศัยอยู่ และสามารถอยู่บนบกได้เป็นเวลานานๆ ด้วย ปลาอุกด้านสามารถอยู่ได้อย่างหนาแน่นในพื้นที่แคบๆ ปลาอุกด้านในธรรมชาติสามารถผสมพันธุ์ได้เมื่ออายุ 7 – 8 เดือน (วิทย์ และคณะ, 2530) สามารถวางไข่ได้ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ไปจนถึงกลางเดือนพฤศจิกายน (เจ็ดฉัน และคณะ, 2538; อุทัยรัตน์, 2544) สามารถวางไข่ได้ถึงปีละ 2 ครั้ง ปลาอุกด้านวางไข่ในโพรงที่มีขนาดปากโพรงกว้างประมาณ 25-30 เซนติเมตร ลึกประมาณ 30 เซนติเมตร โพรงดังกล่าวจะอยู่บริเวณเชิงลาดของคันบ่อหรือริมตลิ่งจากผิวน้ำประมาณ 25 - 30 เซนติเมตร แม่ปลาอุกด้านน้ำหนักประมาณ 300 - 800 กรัม สามารถวางไข่ได้ครั้งละ 5,000 ถึง 7,000 ฟอง ไข่ของปลาอุกด้านมีลักษณะเป็นไข่จุ่ม และต้องติดกับวัตถุ (วิทย์ และคณะ, 2530; เจ็ดฉัน และคณะ, 2538) ในธรรมชาติปลาอุกด้านขนาดเล็ก กินอาหารจำพวกโปรโตซัว ไรน้ำขนาดเล็ก ส่วนปลาอุกด้านที่มีขนาดโตขึ้น จะกินอาหารจำพวกตัวอ่อนของแมลงลูกกึ่ง ลูกปู หนอน และชอบหาอาหารกินในเวลากลางวันตามบริเวณพื้นก้นบ่อและจะขึ้นมากินอาหารที่บริเวณผิวน้ำเป็นบางขณะ (โยธิน, 2524)

2. บริเวณลุ่มแม่น้ำมูล

แม่น้ำมูลจะเป็นลำน้ำสำคัญของภาคตะวันออกเฉียงเหนือและเป็นลำน้ำที่ยาวที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ยาว 641 กิโลเมตร กว้างโดยเฉลี่ย 150 เมตร มีต้นน้ำอยู่ในจังหวัดนครราชสีมา ไหลผ่านจังหวัดบุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกษ โดยในจังหวัดศรีสะเกษ จะไหลผ่านอำเภอราษีไศล อำเภอเมือง อำเภอยางชุมน้อยและอำเภอกันทรารมย์ และไหลผ่านเข้าจังหวัดอุบลราชธานี โดยผ่านอำเภอในจังหวัดอุบลราชธานีคือ อำเภอเมือง อำเภวารินชำราบ อำเภอตาลสุม อำเภอพิบูลมังสาหาร และบรรจบกับแม่น้ำโขงที่อำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี (โกวิทย์ และคณะ, 2522; วรรณิการ์, 2523; ชีรพัฒน์, 2535) โดยแม่น้ำมูลตอนต้นมีลักษณะเป็นลำน้ำห้วยเล็กๆ ไหลตัดชอกเขาและผ่านที่ราบน้ำท่วมถึง ส่วนแม่น้ำมูลตอนปลายมีลักษณะการไหลตัดแนวสันหิน เป็นแก่งต่าง ๆ มากมาย มีลำน้ำใหญ่น้อยไหลลงมาสมทบมากมาย และเป็นสาขาของแม่น้ำที่ได้ชื่อว่า เป็นแม่น้ำที่มีขนาดใหญ่ และมีความหลากหลายของพันธุ์ปลามาก โดยจากการสำรวจของ สันทนา และถวัลย์ (2534) พบว่าในแม่น้ำมูลมีปลาทั้งหมด 68 ชนิด 22 ครอบครัว โดยครอบครัวที่พบชนิดปลามากที่สุด ได้แก่ ครอบครัวปลาตะเพียน (Cyprinidae) พบปลาทั้งหมด 28 ชนิด ส่วนชนิดปลาที่พบมากที่สุดได้แก่ ปลาชะ ปลาสร้อยขาว และปลาสร้อยนกเขา ส่วนปัจจัยด้านระบบนิเวศในแม่น้ำมูลจะมีลักษณะเฉพาะแตกต่างจากลุ่มน้ำอื่นๆ คือ แม่น้ำมูลไหลผ่านบริเวณชายขอบแอ่งโคราช ซึ่งเป็นดินแดนที่ได้แผ่นดินลงไปเต็มไปด้วยแหล่งหินเกลือ เกลือได้ดินถูกแรงกดดันของน้ำและละลายขึ้นสู่ผิวน้ำ ไหลไปตามกระแสน้ำและหลงเหลือความเค็มเป็นเกลือไว้ตามผิวดินริมฝั่งแม่น้ำ

และปนเปื้อนอยู่ในน้ำในฤดูแล้ง ทำให้แม่น้ำมูลในฤดูแล้งเค็ม และแม่น้ำมูลจะไหลผ่านที่ราบน้ำท่วมถึงในบริเวณแม่น้ำมูลตอนกลาง ลักษณะของแม่น้ำบริเวณนี้จะไหลช้าและคดโค้งเกิดการเปลี่ยนทางเดินของสายน้ำ เกิดเนินตะกอนดินมีความอุดมสมบูรณ์ ทำให้เกิดเป็นสังคมพืช สัตว์ อันหลากหลาย และเกาะแก่งต่างๆ บริเวณแม่น้ำมูลตอนปลาย จะเป็นแหล่งที่ทำหน้าที่ฟอกน้ำให้มีปริมาณออกซิเจน เพื่อการหายใจของสัตว์น้ำ และเป็นแหล่งหลบภัยของปลาใน ฤดูแล้ง ทำให้ปลาชุกชุม ซึ่งชุมชนปลายแม่น้ำมูลจึงยึดอาชีพการทำประมงเป็นหลัก (นุชรี, 2544) โดยในที่นี้เราจะสนใจแม่น้ำมูลในบริเวณ 2 จังหวัดที่ทำการศึกษาคือ จังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดศรีสะเกษ ซึ่งมีข้อมูลพื้นฐานของจังหวัดดังนี้

จังหวัดอุบลราชธานีร้อยละ 45 ของพื้นที่เป็นที่ราบเรียบและราบลุ่ม กระจายอยู่ทางแถบตอนเหนือ และตอนกลางเป็นที่ราบลุ่มแม่น้ำชีกับราบลุ่มแม่น้ำมูล จังหวัดอุบลราชธานีมีการทำนากันมาก โดยเป็นการทำนากันโดยอาศัยน้ำฝนอย่างเดียว ไม่มีการชลประทาน ข้าวที่ปลูกนั้นจะปลูกข้าวหอมมะลิ ปลูกตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม ฤดูฝนจะอยู่ในช่วงเดือน พฤษภาคมถึงกันยายนของแต่ละปี โดยเฉพาะเดือนกรกฎาคมถึงกันยายนจะมีความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 81 - 83 เปอร์เซ็นต์ (กวี, 2547) จะมีฝนตกมากระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงกันยายน และตกมากที่สุดในเดือนสิงหาคม ซึ่งสอดคล้องกับช่วงระยะเวลาการปลูกข้าวในจังหวัด ส่วนเดือนที่ฝนตกน้อยที่สุดคือเดือนมกราคม (โกวิท และคณะ, 2522; สนาน, 2528) และจากการใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ในการประเมินผลผลิตข้าวนาปีในปี 2545 ยังพบว่าในพื้นที่บริเวณริมฝั่งแม่น้ำมูลของจังหวัดอุบลราชธานีโดยส่วนใหญ่แล้วได้ทำการเกษตรกรรมโดยการปลูกข้าวนาปี (อรรถ และคณะ, 2545)

ส่วนจังหวัดศรีสะเกษร้อยละ 60 ของพื้นที่เป็นที่ราบเรียบและราบลุ่ม พบทางตอนเหนือเป็นที่ราบต่ำของลำน้ำมูล ทางตอนกลางเป็นที่ราบเรียบเชิงคอนของห้วยต่างๆ น้ำห้วยไหลลงแม่น้ำมูล พื้นที่ส่วนใหญ่ที่เป็นที่ราบลุ่มน้ำท่วมถึงโดยในบริเวณแม่น้ำมูลมักมีปัญหาน้ำท่วมอยู่เสมอ เกษตรกรส่วนใหญ่ทำนาเป็นอาชีพหลัก โดยอาศัยแต่น้ำฝนในการทำนา ผลผลิตที่ได้จึงขึ้นกับปริมาณน้ำฝนของแต่ละปี ฤดูฝนจะอยู่ในช่วงเดือน พฤษภาคมถึงกันยายนของแต่ละปี โดยเฉพาะเดือนกรกฎาคมถึงกันยายนจะมีความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 80 - 84 เปอร์เซ็นต์ (กวี, 2547) โดยปริมาณน้ำฝนจะสูงสุดในเดือนกันยายน 282.0 มิลลิเมตร และเริ่มลดลงต่ำสุดในเดือนธันวาคม โดยมีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยตลอดทั้งปี 1,298.2 มิลลิเมตร (สุเทพ, 2527) และจากการใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ในการประเมินผลผลิตข้าวนาปี ในปี 2545 ยังพบว่าในพื้นที่บริเวณริมฝั่งแม่น้ำมูลของจังหวัดศรีสะเกษโดยส่วนใหญ่ใช้ทำการเกษตรกรรมโดยการปลูกข้าวนาปี (อรรถ และคณะ, 2545)

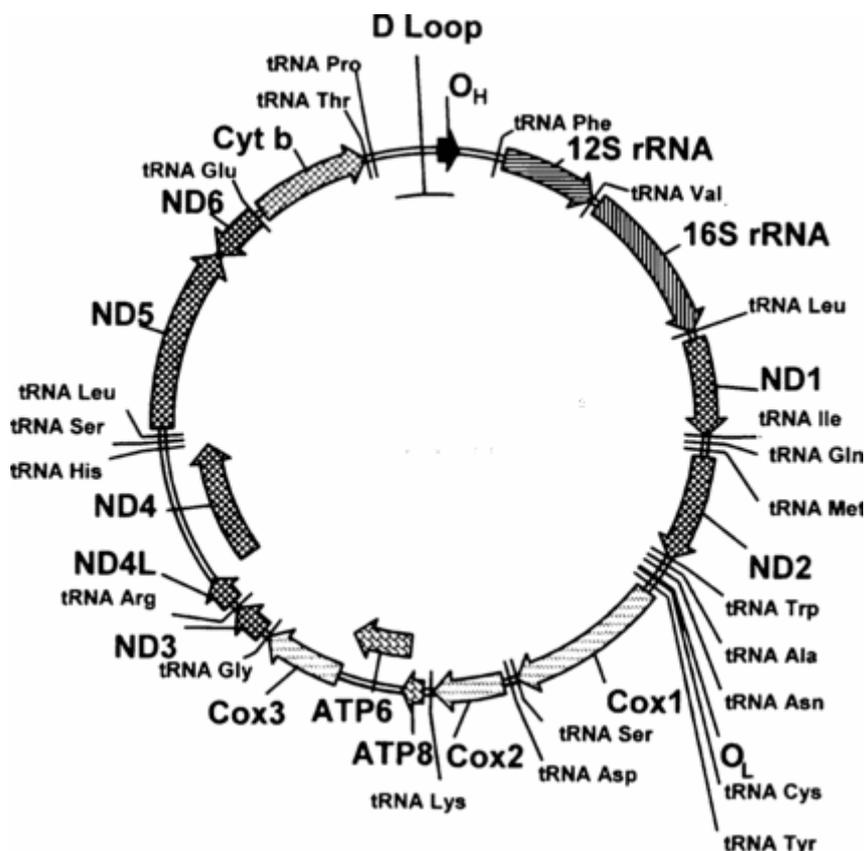
การทำประมงส่วนใหญ่ทำกันในจังหวัดนครราชสีมากับจังหวัดอุบลราชธานี โดยฤดูกาลที่มีการทำประมงกันมากจะอยู่ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งเป็นช่วงน้ำลด (ไมตรี และ ฉันทนา, 2535)

ฉันทนา และคณะ (2536) ได้ทำการสำรวจชนิดและปริมาณปลาในบริเวณที่จะก่อสร้างเขื่อนปากมูล โดยพบว่าบริเวณโขงเจียม ในจังหวัดอุบลราชธานี เดือนกรกฎาคมกับเดือนตุลาคม 2535 และเดือนมีนาคม 2536 สำรวจพบปลาคูค้ำด้านบริเวณนี้และในบริเวณคันเปือย บ้านห้วยไฮ ตำบลคำเขื่อนแก้ว จังหวัดอุบลราชธานี เดือนมีนาคม 2536 ก็สำรวจพบปลาคูค้ำ และที่บริเวณแก่งสะพือ จังหวัดอุบลราชธานี สำรวจพบปลาคูค้ำด้าน ในเดือนมีนาคม 2536 ซึ่งผลการสำรวจสอดคล้องกับ (ธีรพัฒน์ และคณะ, 2534)

3. ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีลักษณะเป็น โมเลกุลดีเอ็นเอรูปวงแหวนเกลียวคู่มีขนาดเล็ก โดยไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของมนุษย์และสัตว์มีขนาดประมาณ 16 กิโลเบส จีโนมของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ จะประกอบด้วยส่วนที่เป็นยีน และส่วนที่ไม่ใช่ยีน โดยส่วนที่เป็นยีนจะมี 13 ยีนสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน 2 ยีนที่เป็นรหัสสำหรับสร้าง ribosomal RNA 22 ยีนที่เป็นรหัสสำหรับสร้าง transfer RNA และส่วนที่ไม่ใช่ยีน (control region) ซึ่งทำหน้าที่เป็นบริเวณเริ่มต้นในการจำลองแบบของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ และการถอดรหัสภายในไมโทคอนเดรียจีโนม (Meyer, 1993; Meyer, 1994) รูปภาพที่ 1 ประกอบ

โดยไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอจะอยู่ภายในไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งในเซลล์สัตว์ และเซลล์พืช โดยทั่วไปไมโทคอนเดรียในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีหน้าที่หลักที่สำคัญคือเป็นแหล่งผลิตสารพลังงานสูงที่เรียกว่า ATP เพื่อนำพลังงานในรูป ATP มาใช้ในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต (Alberts *et al.*, 2004) และนอกจากทำหน้าที่ผลิตพลังงานในรูป ATP แล้ว ไมโทคอนเดรียก็ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุมูลอิสระ เพราะว่าในไมโทคอนเดรียมีเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงอนุมูลอิสระที่เกิดจากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนทำให้อนุมูลอิสระเปลี่ยนแปลงไปไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ลัดดา, 2547)



ภาพที่ 1 แผนที่แสดงตำแหน่งของยีนและส่วนที่ไม่ใช้ยีนในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีคุณสมบัติที่สำคัญ 3 ประการคือ ประการแรกการถ่ายทอดไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีการถ่ายทอดผ่านทางแม่เท่านั้น (maternal inheritance) ประการที่สองคือ ไม่มีการ recombination เกิดขึ้น ประการที่สามคือ ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการที่รวดเร็วกว่ายีนเดี่ยวในนิวเคลียส 5 - 10 เท่า ซึ่งการวิวัฒนาการของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ที่เกิดด้วยความถี่สูง เป็นการกลายพันธุ์ด้วยการแทนที่เบสแบบ transition มากกว่า transversion โดยเกิดการแทนที่เบสในตำแหน่งที่ไม่เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนมีอัตราเกิดสูงกว่าการแทนที่เบสในตำแหน่งที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปถึง 4 - 6 เท่า ตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์บ่อยจะเป็นช่วง control region ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์แบบ tandem duplication โดยมีเบสเพิ่มขึ้นเป็นช่วงๆ เช่น มีการเพิ่มเบสประมาณ 200 - 4,100 คู่เบส ในบริเวณ control region ทำให้มีขนาดเปลี่ยนแปลงไป จากการศึกษาในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Meyer, 1993; Meyer, 1994) ในบริเวณ control region จะเกิดวิวัฒนาการได้รวดเร็วกว่าไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณอื่นๆ 10 ถึง 20 เท่า โดยเฉพาะตำแหน่งที่เกิด transition ได้ง่ายใน control region จะสามารถวิวัฒนาการได้เร็วกว่าบริเวณอื่นๆ เป็น 100 เท่า ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นในบริเวณ

control region ไม่ได้เกิดขึ้นโดยสุ่ม แต่ละบริเวณใน control region จะมีอัตราส่วนการกลายพันธุ์ไม่เท่ากัน บางบริเวณมีอัตราการกลายพันธุ์สูง แต่บางบริเวณมีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ (Randi, 2000; Chen and Hebert, 1999) สอดคล้องกับ Bermingham *et al.* (1986) ทำการศึกษาปลา Bowfin ในแม่น้ำ Santee - cooper ใน South Carolina ถึงแม่น้ำ Mississippi ทางตะวันออกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา โดยวิธีการ RFLP จากไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอทั้งจีโนม จากผลการทดลองพบว่า บริเวณ control region มีอัตราความถี่ของการกลายพันธุ์สูงเหมาะสมกับการศึกษาในระดับประชากรโดยการกลายพันธุ์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเกิดจากการกลายพันธุ์แบบการแทนที่เบส addition และ deletion เพราะฉะนั้นบริเวณ control region ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอจึงเหมาะแก่การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การจำแนกประชากรที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดออกจากกันได้ และนิยมใช้ในการศึกษาระดับประชากรและการศึกษาความสัมพันธ์ภายในชนิด (Avisé, 1986) ดังนั้นการศึกษาไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้จำแนกโครงสร้างประชากรในสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาโดยเฉพาะจากบริเวณ control region ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ที่มีการกลายพันธุ์ในอัตราที่สูงเมื่อเทียบกับยีนภายในไมโทคอนเดรียจีโนมด้วยกัน

4. RFLP

การศึกษาโครงสร้างประชากรอาจใช้วิธี allozyme analysis, การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากรเช่น mitochondrial DNA, microsatellite และ DNA sequencing โดยในการศึกษานี้จะใช้วิธีการวิเคราะห์ restriction fragment length polymorphism (RFLP) ร่วมกับเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ของบริเวณ control region และ *16S rRNA* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของปลาคุกด้าน ซึ่งวิธีการนี้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาโครงสร้างประชากร ทำให้การศึกษาความผันแปรของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นไปอย่างสะดวกรวดเร็วมากขึ้น โดยความแปรปรวนที่เกิดขึ้นเกิดจากการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Halliburton, 2004) ทำให้เกิดความแปรปรวนของจำนวนและขนาดชิ้นดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ศึกษา (Beaumont and Hoare, 2003)

เหตุผลที่ใช้วิธี RFLP ศึกษาเพราะว่าในสิ่งมีชีวิตบางครั้งมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอจากการกลายพันธุ์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้ดีเอ็นเอภายในสิ่งมีชีวิตมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีการ RFLP เป็นการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัด

จำเพาะ (Beaumont and Hoare, 2003) การวิเคราะห์ RFLP เริ่มจากการนำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในบริเวณเป้าหมาย มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่คัดเลือกไว้แล้วเปรียบเทียบกับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน หากความแตกต่างจากขนาดหรือจำนวนชิ้นของดีเอ็นเอ เพื่อเป็นเครื่องมือแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม จากความแตกต่างของความถี่อัลลีลระหว่างประชากร ซึ่งจะแปรปรวนตามลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันในตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Nei and Kumar, 2000) นำข้อมูลรูปแบบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์โดยวิธีการทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ population parameter ต่างๆ เพื่อศึกษาโครงสร้างประชากรของปลาชุกค้ำในบริเวณที่ศึกษา (สุรินทร์, 2545)

5. การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในปลา

5.1 ค่าพื้นฐานที่ใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร

ประชากรเป็นแหล่งรวมของสิ่งมีชีวิตที่มียีนในไทยต่างๆ ดังนั้นในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร จึงมีความสนใจศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา โดยศึกษาทั้งความแปรปรวนภายในและระหว่างประชากร ซึ่งรูปแบบความแปรปรวนทางพันธุกรรมตามธรรมชาติจะมีร่องรอยมาจากเหตุการณ์ต่าง ๆ เช่น ประวัติศาสตร์ของประชากร การถ่ายเทยีนระหว่างประชากร และการคัดเลือกตามธรรมชาติ (Halliburton, 2004) นอกจากนี้จำนวนและรูปแบบของความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้นจากปัจจัยต่างๆ เช่น การคัดเลือกตามธรรมชาติ การเกิด inbreeding การเกิด genetic drift การถ่ายเทยีน และการกลายพันธุ์ เป็นต้น ซึ่งปัจจัยแต่ละปัจจัยจะส่งผลแตกต่างกัน เช่น การกลายพันธุ์จะทำให้ความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพิ่มมากขึ้น ส่วนการเกิด genetic drift หรือการเกิด inbreeding จะทำให้ความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพิ่มลดลง ส่วนปัจจัยที่เหลือเช่น การคัดเลือกตามธรรมชาติ หรือการถ่ายเทยีน จะมีผลทำให้ความแปรปรวนทางพันธุกรรมอาจจะเพิ่มขึ้นหรือลดลงแล้วแต่กรณี เป็นต้น ซึ่งข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้สามารถคำนวณค่าที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร โดยใช้ค่าพื้นฐานต่างๆ ในการศึกษาดังนี้ (Hedrick, 2000)

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในประชากร สามารถคำนวณได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันระหว่าง haplotype ทั้งหมด เรียกว่า nucleotide diversity (Halliburton, 2004) ส่วนค่า nucleotide divergence (Nei' genetic distance) เป็นเครื่องมือแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรม

ระหว่างประชากร โดยคำนวณจากความถี่ของอัลลีลระหว่าง 2 ประชากร สามารถใช้หาระยะห่างระหว่างประชากรได้ดี และการศึกษาค่า genetic distance เป็นเครื่องมือที่แสดงระยะห่างทางพันธุกรรม โดยคำนวณจากความถี่ของอัลลีลระหว่าง 2 ประชากร หรือรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่าง 2 ประชากร เพื่อประมาณระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรที่ศึกษา (Frankham, 2002) ส่วนค่า F_{ST} เป็นเครื่องมือที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร โดยคำนวณจากความถี่อัลลีลที่แตกต่างกันระหว่างประชากรที่ศึกษา และการวิเคราะห์ analysis of molecular variance (AMOVA) เป็นเครื่องมือวัดความแปรปรวนในประชากร ซึ่งประกอบด้วยความแปรปรวนระหว่างกลุ่ม ความแปรปรวนระหว่างประชากร และความแปรปรวนภายในประชากร จากข้อมูลพันธุศาสตร์ที่ได้จากวิธีการต่าง ๆ เช่น RFLP, DNA sequencing และ microsatellite เป็นต้น (Halliburton, 2004)

5.2 การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในปลา

Vrijenhoek (1998) เสนอว่าสถานการณ์ในปัจจุบันแหล่งน้ำตามธรรมชาติซึ่งเป็นถิ่นที่อยู่อาศัยของปลาได้ถูกทำลายลงจากสารเคมีที่เป็นมลพิษ เช่น ยาฆ่าแมลง เป็นต้น แต่ในธรรมชาติปลาบางชนิดจะมีวงจรการอพยพประชากรไปยังแหล่งน้ำอื่นๆ ในธรรมชาติ เพื่อการดำรงชีวิต ซึ่งลักษณะภูมิประเทศบางแห่งก็จะแพร่กระจายประชากรได้ดี แต่ลักษณะภูมิประเทศในบางแห่งอาจจะมีอุปสรรคต่อการอพยพของปลาจากสิ่งกีดขวางตามธรรมชาติได้ เมื่อปลามีการแพร่กระจายประชากรไปยังแหล่งที่อยู่อาศัยบริเวณอื่น จะทำให้ปลามีการรวมตัวกับประชากรอื่นจึงเกิดการถ่ายเทยีนระหว่างประชากรของปลาขึ้น และจากรายงานของ Brien (1994) พบว่าในปัจจุบันสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในกลุ่ม endangered species (สายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีความเสี่ยงสูงต่อการสูญพันธุ์ภายในระยะเวลาอันใกล้) กำลังมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วจนใกล้สูญพันธุ์ โดยพบว่าในสัตว์มีประชากรขนาดเล็กถึงในแต่ละบริเวณ ซึ่งส่งผลให้เกิดการผสมเลือดชิด และ genetic drift ทำให้ความผันแปรทางพันธุกรรมลดลง การศึกษาการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถทำได้โดยใช้การวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ประชากร ซึ่งการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ประชากร จะแสดงให้เห็นประวัติความเป็นมาของประชากรในธรรมชาติและทำนายได้ถึงภาวะที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เพื่อที่จะสามารถวางแผนอนุรักษ์ได้ ดังที่ Takahashi and Ohara (2003) ทำการศึกษาปลา *Rhinogobius* ในทะเลสาบ Biwa ของประเทศญี่ปุ่น โดยใช้วิธี PCR - RFLP ในบริเวณ control region ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ได้ค่า haplotype diversity ของปลา *Rhinogobius sp.*OR (Orange-type) เท่ากับ 0.214 - 0.543 และของปลา *Rhinogobius sp.*BW (Biwa - type) เท่ากับ 0.543

- 0.682 จากการเปรียบเทียบค่า haplotype diversity ระหว่าง *Rhinogobius sp.*BW มีค่าสูงกว่าใน *Rhinogobius sp.*OR ส่วนภายในชนิดของ *Rhinogobius sp.*OR จะมีค่าของ haplotype diversity ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ระหว่างจุดเก็บตัวอย่างแต่ละแห่ง แสดงว่าเกิดการถ่ายเทยีนในกลุ่มประชากร *Rhinogobius sp.*OR ที่มีแหล่งอาศัยอยู่คนละบริเวณกัน โดยค่า genetic divergence ของปลา *Rhinogobius sp.*OR จากบริเวณทะเลสาบกับในแม่น้ำมีค่าไม่แตกต่างกัน คาดว่าเกิดจากในระยะตัวอ่อนของปลา *Rhinogobius sp.*OR จะอาศัยอยู่ในทะเลสาบ แต่พอโตขึ้นปลาเหล่านี้ส่วนหนึ่งจะเริ่มอพยพไปอยู่ในแม่น้ำ แต่อีกส่วนหนึ่งก็จะอยู่ในทะเลสาบต่อไป เช่นเดียวกับ Ikeda *et al.* (2003) ทำการศึกษาปลา Ryukyu-ayu ที่เกาะ Amami-oshima ทางตอนใต้ของประเทศญี่ปุ่น ใช้วิธีการ RFLP ศึกษา control region ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ พบว่าปลาดังกล่าวมีค่า haplotype diversity เท่ากับ 0.281, 0.356 และค่า nucleotide diversity เท่ากับ 0.106, 0.049 ตามลำดับ จากค่าที่ได้แสดงการแบ่งแยกประชากรปลา Ryukyu-ayu แบ่งเป็นประชากรทางตะวันตกและตะวันออกตามลักษณะทางภูมิศาสตร์ของเกาะซึ่งแบ่งเกาะออกเป็น 2 ส่วนได้แก่ฝั่งตะวันตกและตะวันออกของเกาะ เช่นเดียวกับ Lu *et al.* (2001) ใช้วิธีการ PCR - RFLP ศึกษาบริเวณ control region, *ND5*, *ND6* และ *cytochrome b* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอและ microsatellite จาก 6 loci ในนิวเคลียสดีเอ็นเอ ทำการศึกษาปลา Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) จากแม่น้ำ St. John ในตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอเมริกาจากจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 27 จุด จากการวิเคราะห์ค่า haplotype diversity, nucleotide diversity และ F_{ST} รวมทั้งสร้าง phylogenetic tree แบบ Neighbour-joining พบว่าประชากรของปลา Whitefish แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือกลุ่ม Atlantic, Mississippian และ Acadian ซึ่งทั้ง 3 กลุ่มประชากรมีความหลากหลายทางพันธุกรรมแตกต่างกันเนื่องจากระบบนิเวศวิทยาและสิ่งแวดล้อมบริเวณที่ศึกษามีผลทำให้เกิดการแบ่งกลุ่มประชากร เช่นเดียวกับ Sell and Spirkovski (2004) ทำการศึกษาปลา *Salmo letnica* ในทะเลสาบ Ohrid ในประเทศ Macedonia โดยใช้วิธี PCR-RFLP ศึกษาบริเวณ control region, *ND1*, *ND3/4* และ *ND5/6* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ จากผลการทดลองพบว่าปลา *Salmo letnica* ในทะเลสาบ Ohrid แบ่งออกเป็นประชากรปลา *Salmo letnica typicus* และปลา *Salmo letnica aestivalis* ได้ค่า nucleotide diversity เท่ากับ 0.0016 และ 0.0013 ตามลำดับ ค่า nucleotide divergence ระหว่าง haplotype ที่ศึกษามีค่าตั้งแต่ 0.0005 ถึง 0.0094 และจากการวิเคราะห์ AMOVA พบความแปรปรวนระหว่างประชากร 26 เปอร์เซ็นต์ และความแปรปรวนภายในประชากร 74 เปอร์เซ็นต์ จากโครงสร้างประชากรของปลา *Salmo letnica* ในทะเลสาบ Ohrid และความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างปลา *Salmo letnica typicus* และปลา *Salmo letnica aestivalis* แสดงให้เห็นว่ามีการผสมพันธุ์แยกกันระหว่างประชากร และควรทำการจัดการและอนุรักษ์ปลา *Salmo letnica* ในบริเวณดังกล่าว นอกจากการศึกษาบริเวณ control region

แล้วก็มีรายงานการศึกษา PCR-RFLP ในยีน *16S rRNA* ได้แก่รายงานของ Mamuris *et al.* (2005) ใช้วิธีการ RFLP ศึกษาใน *16S rRNA*, *12S rRNA*, *ND5*, *ND6* และ *CoI* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ศึกษาปลา *Ladigesocypris ghigii* ที่เกาะ Rhodes ในประเทศกรีซ เมื่อวิเคราะห์ค่า genetic distance, haplotype diversity, nucleotide diversity และ F_{ST} พบว่าความหลากหลายในประชากรต่ำเนื่องจากเกิด bottleneck ในอดีต จึงควรแยกประชากรปลาที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมออกจากกันเพื่อการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ให้เห็นว่าประชากรนั้นแบ่งกันตามประวัติความเป็นมาของประชากรและอาจบ่งถึงการแบ่งแยกของประชากรตามลักษณะภูมิประเทศ

จากรายงานการวิจัยดังกล่าว สรุปว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ PCR-RFLP มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาโครงสร้างประชากร โดยนิยมทำการศึกษาจากไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ เช่น ในบริเวณ control region, *16S rRNA*, *ND5* และ *ND6* เป็นต้น ดังการศึกษาของ Ikeda *et al.* (2003) แสดงให้เห็นว่าประชากรปลา Ryukyu-ayu ที่เกาะ Amami - oshima ของญี่ปุ่น แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มทางฝั่งตะวันตก และตะวันออกของเกาะ และ Lu *et al.* (2001) ศึกษาปลา Whitefish จากแม่น้ำ St. John ของอเมริกา พบว่าประชากรปลา Whitefish แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความหลากหลายทางพันธุกรรมแตกต่างกัน และ Sell and Spirkovski (2004) ศึกษาปลา *Salmo letnica* ในทะเลสาบ Ohrid ประเทศ Macedonia พบว่าประชากรปลาดังกล่าวแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม และมีการผสมพันธุ์แยกจากกันระหว่างประชากร และ Mamuris *et al.* (2005) ศึกษาปลา *Ladigesocypris ghigii* ที่เกาะ Rhodes ในกรีซ พบความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรต่ำ จึงควรแยกประชากรปลาที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมออกจากกันเพื่อการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้ จากรายงานที่อ้างอิงจะเห็นว่าการศึกษาค้นคว้าข้อมูลพันธุกรรมของปลาที่สนใจ เพื่อไปวิเคราะห์ค่า population parameter ต่างๆ และนำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปใช้ในการอธิบายโครงสร้างประชากรปลาในบริเวณที่ศึกษา

นอกจากการศึกษาโดยวิธีการ PCR-RFLP ในบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* แล้วก็ยังมียีนลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ประชากร และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้อีกเช่น Sturmbauer and Meyer (1992) หา ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ control region และยีน *cytochrome b* ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลา Cichlid ในทะเลสาบ Tanganyika และทะเลสาบวิกตอเรีย พบว่ายีน *cytochrome b* จะมีวิวัฒนาการช้ากว่าบริเวณ control region ทำการวิเคราะห์

ผลได้ค่าเฉลี่ยของ sequence divergence ใน control region เท่ากับ 8.2 เปอร์เซ็นต์ พบความสัมพันธ์ภายในชนิดจะเกิดการกลายพันธุ์แบบการแทนที่เบสแบบ transition ในอัตราสูง และพบการกลายพันธุ์แบบ deletion และ addition จากการกลายพันธุ์ในบริเวณ control region แสดงว่าบริเวณ control region สามารถนำมาใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ภายในชนิดได้ เช่นเดียวกับ Meyer *et al.* (1990) หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ control region และยีน *cytochrome b* จากไม่โตคอนเดรียดีเอ็นเอ ปลาน้ำจืด Cichlid ในทะเลสาบวิกตอเรีย จากตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ Victorian 14 ตัว และ African 23 ตัว พบความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำ มีการกลายพันธุ์ของเบสทั้งแบบ transition และ transversion โดยเกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณ control region มากกว่าใน *cytochrome b* และพบการกลายพันธุ์แบบการแทนที่เบส deletion และ addition ในบริเวณ control region ของปลา Cichlid โดยปลาชนิดเดียวกันจะเกิดการกลายพันธุ์แบบ transition สูงกว่าการเกิด transversion บริเวณ control region สามารถนำมาใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ภายในชนิดได้ เช่นเดียวกับ Kubota and Watanabe (2002) หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ control region และ *cytochrome b* จากไม่โตคอนเดรียดีเอ็นเอ ในปลา Cyprinid ที่บริเวณ Tanakia tanago ของประเทศญี่ปุ่น พบการแทนที่เบส 9 ตำแหน่งใน control region โดยกลุ่มประชากรทั้ง 3 กลุ่มได้ค่า haplotype diversity อยู่ในช่วง 0.0000 - 0.8316 ค่า nucleotide diversity ใน control region อยู่ในช่วง 0.0000 - 0.0068 และค่า nucleotide diversity ใน *cytochrome b* อยู่ในช่วง 0.0000 - 0.0064 พบว่า genetic variation มีค่าต่ำมากในยีน *cytochrome b* และบริเวณ control region แต่ประชากรในธรรมชาติพบ 3 ประชากร เช่นเดียวกับ Chen *et al.* (1998) ทำการศึกษาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ control region และยีน *tRNA^{phe}* ของไม่โตคอนเดรียดีเอ็นเอในปลาน้ำจืด 2 ชนิด คือ *Rhinogobius maculafasciatus* และ *Rhinogobius giurinus* จากประเทศไต้หวันและทางใต้ของประเทศจีน ได้ค่า nucleotide divergence ระหว่างปลา 2 ชนิดมีค่า 11.3 - 11.7 เปอร์เซ็นต์ บ่งชี้ว่าเป็นปลาคนละสกุลกันและค่า nucleotide divergence ในปลา *Rhinogobius giurinus* มีค่า 0.8 - 1.8 เปอร์เซ็นต์ การวิเคราะห์ผลจะเห็นว่าข้อมูลจากบริเวณ control region ของไม่โตคอนเดรียดีเอ็นเอ ใช้เป็นข้อมูลในการทำ Phylogenetic reconstruction ได้ทั้งในระดับ intraspecific และ interspecific ในปลา *Rhinogobius* ได้เช่นเดียวกับ Waters and Wallis (2001) ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ control region ทั้งหมดของไม่โตคอนเดรียดีเอ็นเอของปลา *Galaxias vulgaris* จากบริเวณทางใต้ของประเทศนิวซีแลนด์ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้แสดงให้เห็นค่า nucleotide divergence ระหว่าง *Galaxias vulgaris* กับ *Galaxias brevipinnis* มีค่า 6.4 เปอร์เซ็นต์และค่า Intraspecific divergence ของปลา *Galaxias vulgaris* ระหว่างบริเวณ Hurunui และ Waianakarua มีค่าอยู่ในช่วง 0.0 - 2.6 เปอร์เซ็นต์ และค่า Interspecific divergence ระหว่าง *Galaxias gollumoides*

กับ *Galaxias vulgaris* เท่ากับ 5.2 ± 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปลา *Galaxias brevipinnis* มีการอพยพย้ายถิ่นแยกออกมาทำให้มีวิวัฒนาการแตกต่างออกไป นอกจากการศึกษาบริเวณ control region แล้วก็มีรายงานการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *16S rRNA* ได้แก่รายงานของ Dias *et al.* (2004) หาลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *16S rRNA*, *12S rRNA* และ *ND4* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ โดยศึกษาปลาครอบครัว Callichthyidae ในประเทศบราซิล ทำ phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum - parsimony และ Maximum - likelihood พบว่าปลาครอบครัว Callichthyidae ในธรรมชาติจะแบ่งได้เป็น 2 ครอบครัวย่อยได้แก่ ครอบครัวย่อยของ Corydoradinae และครอบครัวย่อยของ Callichthyinae ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปลา

จากรายงานการวิจัยพันธุศาสตร์ประชากรในปลาที่ศึกษาโครงสร้างประชากร พบว่าวิธีการที่นิยมใช้ในการศึกษาได้แก่การวิเคราะห์ RFLP และ sequencing เป็นต้น เพื่อนำข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้ มาคำนวณค่าทางสถิติ เช่นค่า nucleotide diversity, haplotype diversity, F_{ST} และ nucleotide divergence เป็นต้น และนำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปใช้ในการอธิบายโครงสร้างประชากรปลาในบริเวณที่ศึกษา โดยทำการศึกษาจากบริเวณ control region เนื่องจาก Sturmbauer and Meyer (1992) และ Meyer *et al.* (1990) ศึกษาปลา Cichlid ในทะเลสาบวิกตอเรีย โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ control region พบการกลายพันธุ์สูง จึงนิยมใช้บริเวณดังกล่าวในการศึกษาความสัมพันธ์ภายในชนิด ส่วน Chen *et al.* (1998) ศึกษาปลา *Rhinogobius* จากไต้หวันและจีน จากบริเวณ control region แล้วใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมสร้างโครงสร้างประชากร ส่วน Dias *et al.* (2004) ศึกษาปลาครอบครัว Callichthyidae ในบราซิล จากโครงสร้างประชากรพบว่าแบ่งเป็น 2 ครอบครัวย่อย จากรายงานที่อ้างอิงจะเห็นว่าข้อมูลทางพันธุกรรมเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมปลา จะต้องศึกษาโครงสร้างประชากรปลาในแหล่งที่อยู่อาศัยบริเวณเป้าหมาย เมื่อรู้ข้อมูลโครงสร้างประชากรปลาที่ศึกษาแล้ว จึงนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการวางแผนอนุรักษ์ปลาชนิดนั้นๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 1.1 ตัวอย่างปลาคุกด้านจาก 10 อำเภอ ในจังหวัดศรีสะเกษและอุบลราชธานีจำนวน 200 ตัว
- 1.2 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge) Sigma SK20, Germany
- 1.3 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR: polymerase chain reaction)
- 1.4 เครื่องฉายแสง ultraviolet และอุปกรณ์ถ่ายภาพ
- 1.5 ชุดเครื่องมือ agarose gel electrophoresis
- 1.6 ชุดเครื่องมือ polyacrylamide gel electrophoresis
- 1.7 หม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) รุ่น SS - 325 บริษัท Seiko, Japan
- 1.8 หลอดพลาสติกสำหรับทำปฏิกิริยา PCR (PCR tube)
- 1.9 หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1,500 ไมโครลิตร
- 1.10 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้พร้อม tip ขนาด 20 100 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- 1.11 ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (hotbox oven)

2. สารเคมีและเอนไซม์

- 2.1 ชุดสกัดดีเอ็นเอ AquaPure Genomic DNA Isolation Kit ของบริษัท Bio Rad
- 2.2 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR และการวิเคราะห์ PCR-RFLP
 - 2.2.1 10 X PCR buffer
 - 2.2.2 2.0 mM MgCl₂
 - 2.2.3 dNTP
 - 2.2.4 TaqDNA polymerase (recombinant) # EP402 บริษัท Fermentus, USA
 - 2.2.5 primers

2.2.6 ultra pure water

2.2.7 เอนไซม์ตัดจำเพาะได้แก่ *Tas I, Tru II, Rsa I, Hin1 II, Hae III, Dpn II, Msp I*

บริษัท Fermentus, USA and Bio lab

2.3 สารเคมีที่ใช้ใน agarose gel electrophoresis

2.3.1 agarose

2.3.2 1 X TAE buffer

2.3.3 loading buffer

2.3.4 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder mix)

2.3.5 ethidium bromide

2.4 สารเคมีที่ใช้ใน polyacrylamide gel electrophoresis

2.4.1 repel silane และ bind silane

2.4.2 acrylamide gel และ methylene bisacrylamide

2.4.3 10% APS (ammonium persulphate)

2.4.4 TEMED (*N',N',N',N'*, -tetramethyl ethylenediamine)

2.4.5 TBE buffer

2.4.6 silver nitrate

2.4.7 glycerol

2.4.8 glacial acetic acid

2.4.9 loading buffer

2.4.10 developer (sodium carbonate 12.5 กรัม, formaldehyde 270 ไมโครลิตร, sodium thiosulfate 20 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร)

3. เครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับการคำนวณและโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

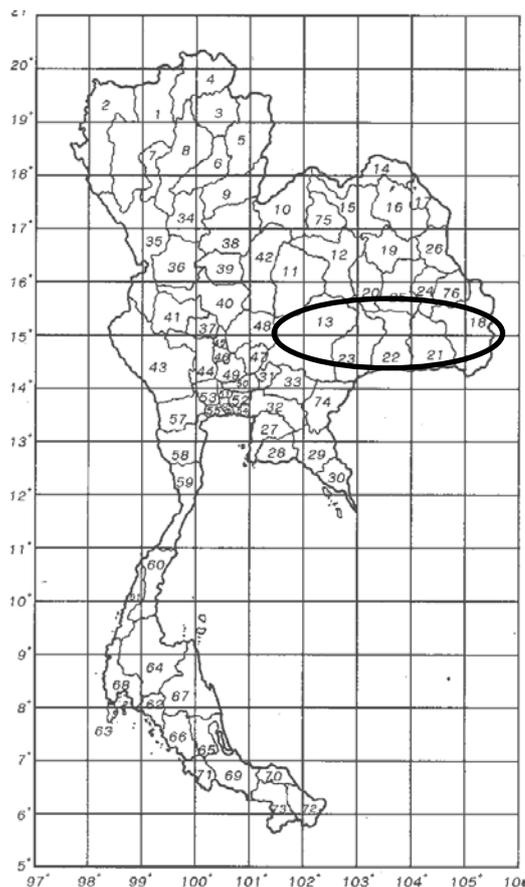
3.1 เครื่องคอมพิวเตอร์ติดตั้งอุปกรณ์ประมวลผล Intel Pentium 4 CPU 2.40 GHz ติดตั้ง RAM ขนาด 1.0 GB เชื่อมต่อ Internet

3.2 Arlequin version 3.0 (An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis) (Excoffier *et al.*, 2005) ใช้ในการวิเคราะห์ค่าทางสถิติเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ประชากร

3.3 Phylip version 3.6 (Phylogeny Inference Package) (Felsenstein, 2002) เพื่อใช้สร้าง Population phylogenetic tree

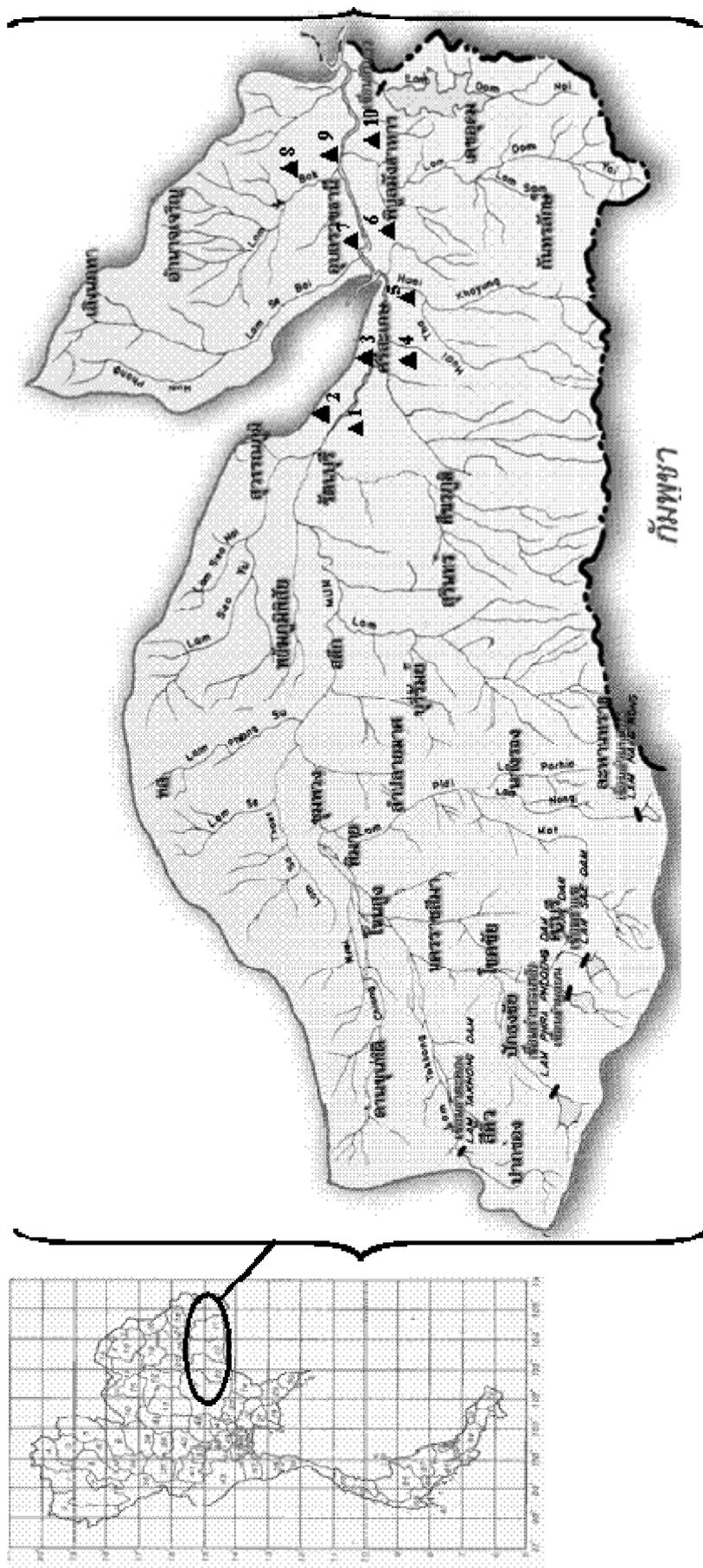
4. การเก็บตัวอย่างปลาคุกด้านและลักษณะภูมิประเทศบริเวณอำเภอเก็บตัวอย่าง

เนื่องจากปัจจุบันภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเป็นแหล่งเดียวที่คาดว่ายังมีปลาคุกด้านในแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยในจังหวัดศรีสะเกษและอุบลราชธานีเป็นจังหวัดที่ลุ่มแม่น้ำมูลไหลผ่านซึ่งแต่ละฤดูกาลจะมีระดับน้ำสูงต่ำไม่เท่ากันและยังไม่มีข้อมูลประชากรของปลาคุกด้าน จึงเป็นที่น่าสนใจว่าโครงสร้างประชากรของปลาคุกด้านเป็นอย่างไร จึงดำเนินการรวบรวมปลาคุกด้านจาก 2 จังหวัดดังกล่าว โดยวิธีการไปเก็บตัวอย่างได้ทำการเดินทางไปยังจังหวัดศรีสะเกษและอุบลราชธานีโดยใช้รถกระบะเป็นพาหนะ และทำการติดต่อกับญาติซึ่งเป็นคนพื้นที่ในจังหวัดอุบลราชธานีเพื่อช่วยเหลือในการติดต่อประสานงานกับชาวบ้านในพื้นที่ เพื่อเดินทางไปเก็บตัวอย่างเองในแหล่งน้ำที่อยู่ในที่นาของชาวบ้านที่ติดต่อไว้ ทำการจับปลาคุกด้านโดยใช้แหจับปลาจากบ่อน้ำในที่นาของชาวบ้านที่อาศัยอยู่ในอำเภอเป้าหมาย โดยลักษณะสภาพแวดล้อมรอบๆ แหล่งน้ำเป็นพื้นที่ราบลุ่มใช้ในการเพาะปลูกข้าวในฤดูฝนจะมีน้ำท่วมขังในบริเวณดังกล่าว ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 10 จุดจะอยู่ภายในอำเภอต่าง ๆ ของแต่ละจังหวัด โดยจังหวัดศรีสะเกษ ประกอบด้วยอำเภอโพธิ์สุวรรณ ราษีไศลยางชุมน้อย เมืองศรีสะเกษ และกันทรารมย์ ส่วนจังหวัดอุบลราชธานีประกอบด้วยอำเภวารินชำราบ เมืองอุบลราชธานี ตระการพืชผล ตาลชุม และพิบูลมังสาหาร (ภาพที่ 3 และตารางที่ 1) ทำการเก็บตัวอย่างปลาคุกด้านจากอำเภอละ 20 ตัว ทั้งหมด 10 อำเภอ รวมตัวอย่างปลาคุกด้านทั้งหมด 200 ตัวอย่าง โดยเหตุผลในการเลือกจุดเก็บตัวอย่าง จะเลือกจากอำเภอที่มีแม่น้ำมูลไหลผ่าน เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างประชากรของปลาคุกด้านในบริเวณลุ่มน้ำมูล รวมทั้งการอธิบายผลจากการเกิดน้ำท่วม ระดับน้ำในแม่น้ำมูลที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง จะมีผลต่อโครงสร้างประชากรอย่างไร โดยจุดเก็บตัวอย่างในแต่ละอำเภอจะเลือกจากจุดที่สามารถเดินทางเข้าไปเก็บตัวอย่างปลาได้ และเป็นบ่อน้ำหรือแหล่งน้ำที่เจ้าของที่อนุญาตให้ทำการจับปลาคุกด้านได้ จึงเลือกเก็บตัวอย่างจากจุดดังกล่าว ซึ่งสภาพภูมิประเทศของแต่ละจุดเก็บตัวอย่างจะอธิบายไว้ในผลและวิจารณ์ หัวข้อสภาพภูมิประเทศบริเวณที่อยู่อาศัยของปลาคุกด้านในอำเภอที่ศึกษา



ภาพที่ 2 แผนที่ประเทศไทยโดยในวงรีจะประกอบด้วยหมายเลข 18 คือจังหวัดอุบลราชธานี หมายเลข 21 คือจังหวัดศรีสะเกษ หมายเลข 22 คือจังหวัดสุรินทร์ หมายเลข 23 คือจังหวัดบุรีรัมย์ หมายเลข 13 คือจังหวัดนครราชสีมา

โดยพื้นที่ราบลุ่มของ 2 จังหวัด จะสัมพันธ์กับลำน้ำขนาดใหญ่ทั้ง 2 ฟัง โดยเฉพาะบริเวณคั้งน้ำหรือที่คดเคี้ยวของร่องน้ำซึ่งบริเวณนี้จะมีน้ำท่วมในฤดูฝนและมีน้ำแห้งในหนอง บึงในหน้าแล้ง โดยบริเวณนี้จะมีป่าลุ่มน้ำจืดปกคลุมอยู่ (คือป่าที่ขึ้นตามบึงในที่ราบลุ่มริมแม่น้ำภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ส่วนใหญ่ชาวประมงใช้ประโยชน์ในการหาปลา และเนื่องจากที่ราบลุ่มสองฝั่งแม่น้ำมูลมีภูมิประเทศเป็นที่ราบน้ำท่วมถึง จึงมักใช้พื้นที่บริเวณดังกล่าวในการทำนาขนานสองฝั่งแม่น้ำ ลักษณะดินที่พบเป็นดินอินเซปติซอลส์ ที่มีลักษณะเนื้อดินร่วน ละเอียด และเนื้อดินเหนียว มีลักษณะสีเข้ม เช่น สีดำหรือสีเทา เป็นผลมาจากการสะสมของพวกอินทรีย์วัตถุ ลักษณะภูมิอากาศในจังหวัดศรีสะเกษ และจังหวัดอุบลราชธานี มีลักษณะใกล้เคียงกัน เป็นภูมิอากาศแบบมรสุมเขตร้อน ขึ้นปานกลาง มีฝนตกน้อยถึงหนักแล้วแต่บริเวณ เป็นเขตที่มีฝนตก 5.5 - 6.5 เดือนในรอบปี (กรี, 2547) จากลักษณะพื้นที่ราบลุ่มในจังหวัดศรีสะเกษ และอุบลราชธานี ทำให้บริเวณ



ภาพที่ 3 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ในจังหวัดศรีสะเกษและจังหวัดอุบลราชธานี (▲)

ริมฝั่งแม่น้ำมูลในฤดูฝนจะเป็นพื้นที่ที่มีน้ำท่วมถึง และบริเวณริมฝั่งแม่น้ำมูลมักจะใช้พื้นที่ในการทำนา ปลาอุกด้านที่อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำในที่นาที่มีน้ำท่วมถึง จึงสามารถอพยพจากแหล่งน้ำหนึ่งไปยังอีกแหล่งน้ำหนึ่งได้

ตารางที่ 1 แสดงอักษรย่อของแต่ละอำเภอที่เป็นจุดเก็บตัวอย่างที่ใช้ในภาพและตาราง

| ชื่ออำเภอ | อักษรย่อ | หมายเลขในภาพที่ 3 | |
|------------------|----------|-------------------|---------------|
| โพธิ์สุวรรณ | PS | 1 | } ศรีสะเกษ |
| ราษีไศล | RS | 2 | |
| ยางชุมน้อย | YC | 3 | |
| เมืองศรีสะเกษ | MS | 4 | |
| กันทรารมย์ | GT | 5 | |
| วารินชำราบ | VR | 6 | } อุบลราชธานี |
| เมืองอุบลราชธานี | MA | 7 | |
| ตระการพืชผล | TK | 8 | |
| ตาลชุม | TS | 9 | |
| พิบูลมังสาหาร | PB | 10 | |

5. การสกัด total genomic DNA

ในการสกัด total genomic DNA จากเนื้อเยื่อปลาอุกด้านในโครงการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ AquaPure Genomic DNA Isolation Kit ของบริษัท Bio Rad ในการสกัด โดยใช้เนื้อเยื่อปลาอุกด้านในการสกัดประมาณ 10 มิลลิกรัม ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้ spectrophotometer พบว่าสัดส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) ได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 1.82 เพราะฉะนั้น total genomic DNA มีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 50.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ จึงมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง สามารถนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอที่เป็นบริเวณเป้าหมายได้ และตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการทำ agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

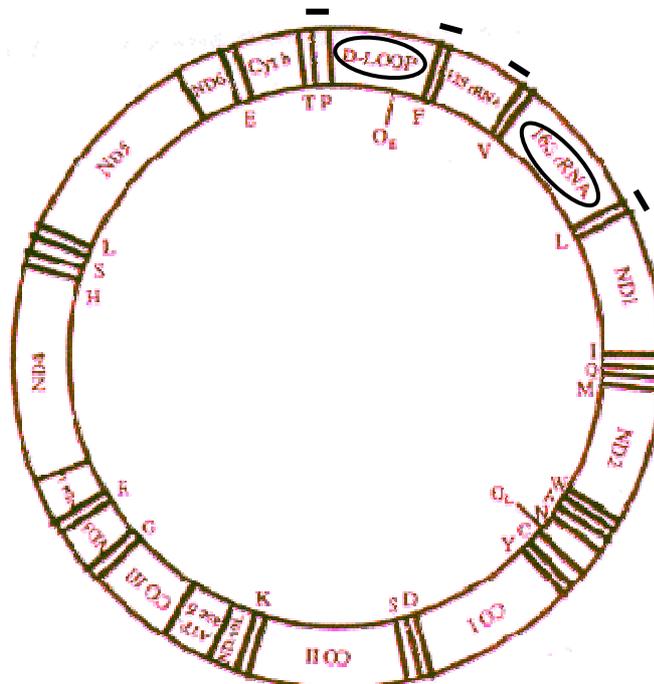
6. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่างดีเอ็นเอปลาคุณดำน

6.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณ control region

ตามแผนการทดลองจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย 2 บริเวณคือ control region และยีน *16S rRNA* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ control region โดยใช้ primer CR-F และ CR-R ตำแหน่ง primer CR-F อยู่ในยีน *tRNA^{Pro}* และตำแหน่ง primer CR-R อยู่ในยีน *tRNA^{Phe}* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ติดบริเวณ control region ทาง 5' และ 3' ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (ภาพที่ 4) ตามลำดับโดยการออกแบบอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียจากปลาบึก (Jondeung *et al.*, 2006) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer มีดังนี้

CR-F 5'-CCAAAGCTAGGATTCTCAGCT-3'

CR-R 5'-TCAGTGTTATGCTTTGGTTTAAGC-3'



ภาพที่ 4 แสดงตำแหน่งของ control region และยีน *16S rRNA* (ในวงรี) และตำแหน่ง primer CR-F, CR-R และ primer 16S-F, 16S-R (เส้นตรง) ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

องค์ประกอบสารต่างๆ ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังตารางที่ 2 อุณหภูมิสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

| | | | | |
|----------------------|------|----|--------|----------------|
| Initial denaturation | 94°C | 2 | นาที | } ทำซ้ำ 35 รอบ |
| Denaturation | 94°C | 30 | วินาที | |
| Annealing | 50°C | 30 | วินาที | |
| Elongtion | 72°C | 90 | วินาที | |
| Final elongation | 72°C | 10 | นาที | |

นำ PCR product 5 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยทำ 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel แล้วนำเจลไปย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์ ดูได้แสง UV ถ้าสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้จริงจะเห็นแถบดีเอ็นเอตรงกับตำแหน่งขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการ โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

| สารที่ใช้ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) |
|---------------------------------------|---------------------|
| 10 X PCR buffer | 5.0 |
| 2.0 mM MgCl ₂ | 5.0 |
| 10 pmole primer (FW) | 2.0 |
| 10 pmole primer (RW) | 2.0 |
| 2.5 mM dNTPs | 4.0 |
| Ultra pure water | 23.5 |
| Template DNA | 6.0 |
| <i>Taq</i> DNA polymerase (5 unit/μl) | 0.5 |
| รวม | 50.0 |

6.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายยีน *16S rRNA*

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *16S rRNA* ในไมโทคอนเดรียด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่ออกแบบไว้ 1 คู่ คือ primer 16S-F และ 16S-R โดยตำแหน่ง primer 16S-F อยู่ในยีน *12S rRNA* และ primer 16S-R อยู่ในยีน *tRNA^{Leu}* ซึ่งยีน *12S rRNA* อยู่ทาง 5' ถัดจากยีน *tRNA^{Val}* ที่อยู่ติดกับยีน

16S rRNA และยีน *tRNA^{Leu}* อยู่ติดทาง 3' ของยีน 16S rRNA (ภาพที่ 4) โดยการออกแบบอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียจากปลาบึก (Jondeung *et al.*, 2006) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer มีดังนี้

16S-F 5'-AGGTCGTAACATGGTAAGTGTACCG

16S-R 5'-AGAGGAGGATTTGAACCTCCG

องค์ประกอบสารต่างๆ ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังตารางที่ 2 อุณหภูมิสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

| | | | | |
|----------------------|------|-----|--------|----------------|
| Initial denaturation | 94°C | 2 | นาที | } ทำซ้ำ 35 รอบ |
| Denaturation | 94°C | 30 | วินาที | |
| Annealing | 48°C | 45 | วินาที | |
| Elongtion | 72°C | 120 | วินาที | |
| Final elongation | 72°C | 10 | นาที | |

นำ PCR product 5 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยทำ 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel แล้วนำเจลไปย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์ ดูได้แสง UV ถ้าสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้จริงจะเห็นแถบดีเอ็นเอตรงกับตำแหน่งขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการ โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด

7. การวิเคราะห์ RFLP

7.1 การวิเคราะห์ RFLP บริเวณ control region

เมื่อได้ PCR product บริเวณ control region ซึ่งเป็นบริเวณเป้าหมายที่ต้องการ นำดีเอ็นเอบริเวณ control region ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิดคือ *Tas I*, *Tru1 I*, *Rsa I* และ *Hin1 II* ซึ่งมีตำแหน่งตัดในบริเวณ control region ทำให้ได้ดีเอ็นเอมีขนาดและจำนวนชิ้นต่างกัน จากการทดลองตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดมีวิธีการดังแสดงไว้โดยสรุปในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตำแหน่งจดจำ บัฟเฟอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในการตัดบริเวณ control region

| เอนไซม์ตัดจำเพาะ | ตำแหน่งจดจำ | บัฟเฟอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา | อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม |
|------------------|-------------|--|------------------------|
| <i>Tas</i> I | ↓ AATT | Buffer B [10mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37°C), 10mM MgCl ₂ and 0.1 mg/ml BSA] | 65°C |
| <i>Rsa</i> I | ↓ GTAC | Buffer Tango™ [33mM Tris-acetate (pH 7.9 at 37°C), 10 mM Mg-acetate, 66mM K-acetate and 0.1 mg/ml BSA] | 37°C |
| <i>Tru</i> 1 I | ↓ TTAA | Buffer R [10mM Tris-HCl (pH 8.5 at 37°C), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl and 0.1 mg/ml BSA] | 65°C |
| <i>Hin</i> 1 II | ↓ CATG | Buffer G [10mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37°C), 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl and 0.1 mg/ml BSA] | 37°C |

7.1.1 การตัดด้วยเอนไซม์ *Tas* I

นำสารละลาย PCR product 5.5 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ B [10mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37°C), 10mM MgCl₂ and 0.1 mg/ml BSA] 1 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ *Tas* I 5 u (0.5 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

7.1.2 การตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa* I

นำสารละลาย PCR product 5.5 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ Tango™ [33mM Tris-acetate (pH 7.9 at 37°C), 10 mM Mg-acetate, 66mM K-acetate and 0.1 mg/ml BSA] 1 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ *Rsa* I 5 u (0.5 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

7.1.3 การตัดด้วยเอนไซม์ *Tru*1 I

นำสารละลาย PCR product 5.5 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ R [10mM Tris-HCl (pH 8.5 at 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl and 0.1 mg/ml BSA] 1 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ *Tru*1 I 5 u (0.5 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

7.1.4 การตัดด้วยเอนไซม์ *Hin1* II

นำสารละลาย PCR product 5.5 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ G [10mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37°C), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl and 0.1 mg/ml BSA] 1 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ *Hin1* II 5 u (0.5 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมงหลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

7.2 การวิเคราะห์ RFLP ในยีน *16S rRNA*

นำ PCR product ของยีน *16S rRNA* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดคือ *Tas* I, *Rsa* I, *Hae* III, *Dpn* II และ *Msp* I ซึ่งมีตำแหน่งตัดในยีน *16S rRNA* ทำให้มีโอกาสเกิดความแตกต่างของขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ จากการทดลองตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดมีวิธีการดังแสดงไว้โดยสรุปในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตำแหน่งจดจำ บัฟเฟอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการตัดยีน *16S rRNA*

| เอนไซม์ตัดจำเพาะ | ตำแหน่งจดจำ | บัฟเฟอร์ที่ใช้ปฏิกิริยา | อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม |
|------------------|-------------|--|------------------------|
| <i>Dpn</i> II | ↓GATC | NEB <i>Dpn</i> II [100 mM NaCl, 50 mM Bis Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM dithiothreitol (pH 6.0 at 25 °C)] | 37 °C |
| <i>Hae</i> III | ↓GGCC | NEBuffer 2 [50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 at 25 °C)] | 37 °C |
| <i>Tas</i> I | ↓AATT | Buffer B [10 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37 °C), 10 mM MgCl ₂ and 0.1 mg/ml BSA] | 65 °C |
| <i>Msp</i> I | ↓CCGG | Buffer Tango™ [33 mM Tris-acetate (pH 7.9 at 37 °C), 10 mM Mg-acetate, 66 mM K-acetate and 0.1 mg/ml BSA] | 37 °C |
| <i>Rsa</i> I | ↓GTAC | Buffer Tango™ [33 mM Tris-acetate (pH 7.9 at 37 °C), 10 mM Mg-acetate, 66mM K-acetate and 0.1 mg/ml BSA] | 37 °C |

7.2.1 การตัดด้วยเอนไซม์ *Tas I*

นำสารละลาย PCR product 5.5 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ B [10mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37°C), 10mM MgCl₂ and 0.1 mg/ml BSA] 1 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ *Tas I* 5 u (0.5ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

7.2.2 การตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa I*

นำสารละลาย PCR product 5.5 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ Tango™ [33mM Tris-acetate (pH 7.9 at 37°C), 10 mM Mg-acetate, 66mM K-acetate and 0.1 mg/ml BSA] 1 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ *Rsa I* 5 u (0.5ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

7.2.3 การตัดด้วยเอนไซม์ *Hae III*

นำสารละลาย PCR product 5.5 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ NEB 2 [50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 at 25°C)] 1 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ *Hae III* 5 u (0.5ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

7.2.4 การตัดด้วยเอนไซม์ *Dpn II*

นำสารละลาย PCR product 5.5 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ NEB *Dpn II* [100 mM NaCl, 50 mM Bis Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (pH 6.0 at 25°C)] 1 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ *Dpn II* 5 u (0.5ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

7.2.5 การตัดด้วยเอนไซม์ *Msp I*

นำสารละลาย PCR product 5.5 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ Tango™ [33mM Tris-acetate (pH 7.9 at 37°C), 10 mM Mg-acetate, 66mM K-acetate and 0.1 mg/ml BSA] 1 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ *Msp I* 5 u (0.5ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

นำ PCR product ของ control region และยีน *16S rRNA* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาแยกขนาดโดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ต่อไป

8. การวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ (restriction fragment) ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis

นำ PCR product ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วมาแยกขนาดโดยใช้วิธีการ polyacrylamide gel electrophoresis เพราะว่าขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดบางชิ้นมีขนาดใกล้เคียงกันและบางชิ้นมีขนาดเล็กทำให้ไม่สามารถแยกขนาดได้ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis จึงใช้วิธี polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

8.1 เตรียมแผ่นกระจกสำหรับทำ polyacrylamide gel 2 แผ่น เช็ดกระจกทั้งสองแผ่นด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ให้สะอาด เช็ดกระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหูกระต่ายด้วย repel silene 200 ไมโครลิตร กระจกแผ่นหลังเช็ดด้วยสารละลาย bind silene (bind silene 1 ไมโครลิตร, เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร และกรดอะซิติก 2.5 ไมโครลิตร) นำแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่นไปฝั่งให้แห้งเป็นเวลาอย่างน้อยครึ่งชั่วโมง นำกระจกทั้งสองแผ่นมาประกอบเข้าด้วยกันวาง Spacer กั้นไว้ระหว่างแผ่นกระจกที่ประกบเข้าหากันโดยหันด้านที่ทา repel silene กับ bind silene เข้าหากันแล้วใช้คลิปหนีบไว้ ติดตั้งแผ่นกระจกกับฐานเครื่องมือสำหรับเท polyacrylamide gel

8.2 เตรียม 5.4 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide gel ที่มีองค์ประกอบดังตารางที่ 5

8.3 เทเจลลงไปในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้จนเต็ม แล้วใส่หัวลงไปด้านบนทิ้งให้เจลแข็งตัวโดยทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวดีดึงหัวออก นำแผ่นกระจกไปล้างด้านบนให้สะอาด ประกอบกับชุดเครื่องมือ electrophoresis เติม 1X TBE buffer ลงทั้งด้านบนและด้านล่างของเครื่องมือ electrophoresis ไล่ฟองอากาศออก ต่อสายไฟเข้าเครื่องกำเนิดไฟฟ้าเปิดกระแสไฟฟ้าให้กับเจลที่ยังไม่ได้ไหล ใช้กระแสไฟ 120 โวลต์ นาน 30 นาที

ตารางที่ 5 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้เตรียม 5.4 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide gel

| สารที่ใช้ | จำนวนที่ใช้ |
|--------------------------------|---------------|
| acrylamide 30 เปอร์เซ็นต์ | 3 มิลลิลิตร |
| 5X TBE buffer | 3.5 มิลลิลิตร |
| 10% APS (ammonium persulphate) | 150 ไมโครลิตร |
| TEMED | 12 ไมโครลิตร |
| น้ำกลั่น | 10 มิลลิลิตร |

8.4 เตรียม PCR product ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ผสมกับ loading dye 1.5 ไมโครลิตร แล้ว spindown ให้เข้ากันก่อนนำไปโหลดลงช่องเจล เปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ปิดเครื่องถอดแผ่นกระจกออก ล้างทำความสะอาด และแผ่นกระจกออกจากกัน โดยแผ่นเจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นหลัง

8.5 นำแผ่นกระจกที่มีเจลไปแช่ในสารละลาย fixative (glacial acetic acid 100 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร) แล้วเขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 20 นาที ล้างในน้ำกลั่น 30 นาที เปลี่ยนน้ำกลั่นล้างต่ออีก 5 นาที

8.6 นำแผ่นเจลไปแช่สารละลาย silver (silver nitrate 2 กรัม, น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) แล้วเขย่าเป็นเวลา 30 นาที ล้างในน้ำกลั่น 10 วินาที

8.7 นำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลาย developer (sodium carbonate 12.5 กรัม, formaldehyde 270 ไมโครลิตร, sodium thiosulfate 20 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร) พอเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนให้เอาแผ่นกระจกขึ้นจากสาร developer ทันที (ใช้เวลาประมาณ 8 นาที)

8.8 นำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลาย stop (glacial acetic acid 50 มิลลิลิตร, glycerol 30 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 920 มิลลิลิตร) แล้วเขย่าเป็นเวลา 3 นาที นำแผ่นเจลไปล้างในน้ำกลั่นนาน 10 นาที นำแผ่นกระจกไปผึ่งให้เจลแห้งในอากาศ

9. การวิเคราะห์โครงสร้างและความแตกต่างระหว่างประชากร

นำข้อมูลการทำ RFLP ในบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* มาวิเคราะห์ nucleotide diversity, AMOVA, F_{ST} และ nucleotide divergence (Nei's genetic distance) โดยคำนวณจากโปรแกรม Arlequin v 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) ใช้ค่า nucleotide divergence ที่ได้ในการสร้าง population phylogenetic tree จากวิธี Neighbour-joining โดยใช้โปรแกรม Neighbour ใน Phylip (Felsenstein, 2002) ค่าที่วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทำ RFLP มีสมการดังนี้

9.1 Nucleotide diversity ตามสมการ (Tajima, 1983; Nei, 1987)

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i}^k p_i p_j d_{ij}}{L}$$

| | | |
|-------|-----------------|--|
| เมื่อ | $\hat{\pi}_n$ | = Nucleotide diversity. |
| | d_{ij} | = Proportion of nucleotide differences between the i and j haplotypes. |
| | p_i and p_j | = Frequencies of the two haplotypes. |
| | k | = Different haplotypes in the population. |
| | L | = Number of loci. |

9.2 AMOVA และ F_{ST} ตามสมการ (Excoffier *et al.*, 1992)

ตารางที่ 6 แสดงวิธีการและสูตรคำนวณ AMOVA

| Source of variation | d.f. | Sum of squares | Variance components |
|---------------------|-------|-----------------|--|
| Among group | $G-1$ | SSD (AG) | $n'\sigma_a^2 + n'\sigma_b^2 + \sigma_c^2$ |
| Among populations | $P-G$ | SSD (AP/WG) | $n'\sigma_b^2 + \sigma_c^2$ |
| Within populations | $N-P$ | SSD (WP) | σ_c^2 |
| Total | $N-1$ | SSD (T) | σ_T^2 |

$$F_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2}$$

| | | |
|-------|-----------------|---|
| เมื่อ | SSD (T) | = Total sum of squared deviations. |
| | SSD (AG) | = Sum of squared deviations Among Groups of populations. |
| | SSD (WP) | = Sum of squared deviations Within populations. |
| | SSD (AP/WG) | = Sum of squared deviations Among populations, Within Groups. |
| | G | = Number of groups in the structure. |
| | P | = Total number of populations. |
| | N | = Total number of gene copies for haplotypic data. |

9.3 nucleotide divergence ตามสมการ (Nei and Li, 1979)

$$\hat{\delta} = \hat{\pi}_{XY} - \frac{(d_X + d_Y)}{2}$$

$\hat{\delta}$ = nucleotide divergence

$\hat{\pi}_{XY}$ = average divergence between haplotypes between population x and y

d_X = average divergence within populations x

d_Y = average divergence within populations y

10. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
บางเขน เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร

11. ระยะเวลาทำการทดลอง

การทดลองเริ่มตั้งแต่วันที่ ๑๕ พฤษภาคม ๒๕๔๗ สิ้นสุดเดือนเมษายน ๒๕๔๙

ผลและวิจารณ์

1. สภาพภูมิประเทศบริเวณที่อยู่อาศัยของปลาอุกค้ำในอำเภอที่ศึกษา

ทำการรวบรวมข้อมูลระดับน้ำและปริมาณน้ำจากสถานีตรวจวัดน้ำของจังหวัดศรีสะเกษ และอุบลราชธานี ซึ่งได้ขอข้อมูลดังกล่าวจากกรมชลประทาน ประกอบด้วยสถานีต่างๆ ดังนี้

สถานี M.7 (อำเภอเมืองอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี)

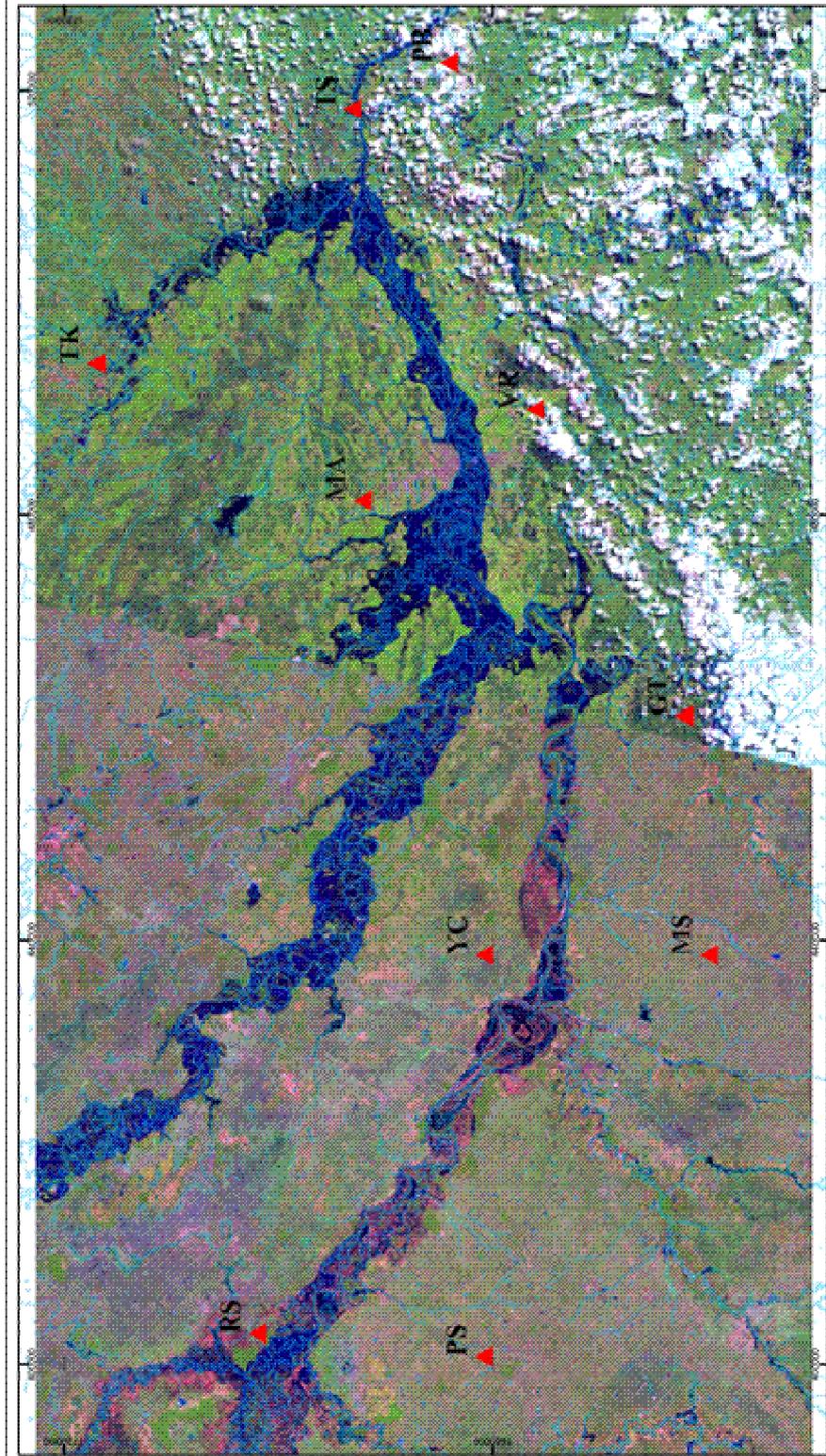
สถานี M.5 (อำเภอรามัน จังหวัดศรีสะเกษ)

สถานี M.9 (อำเภอเมืองศรีสะเกษ จังหวัดศรีสะเกษ)

สถานี M.69 (อำเภอตระการพืชผล จังหวัดอุบลราชธานี)

จากข้อมูลทำให้ทราบว่าในปี 2000 และปี 2002 เป็นปีที่มีระดับน้ำสูง จึงใช้ข้อมูลดังกล่าวประกอบการพิจารณาภาพถ่ายดาวเทียมจากสำนักงานพัฒนาเทคโนโลยีอวกาศและภูมิสารสนเทศ (GISTDA) เพื่อใช้ภาพประกอบการอธิบายการเคลื่อนย้ายของประชากรปลาอุกค้ำ รวมทั้งแสดงระดับน้ำที่เพิ่มขึ้นบริเวณลุ่มแม่น้ำมูลและแสดงลักษณะภูมิประเทศบริเวณที่ศึกษาในจังหวัดศรีสะเกษและอุบลราชธานี และภาพถ่ายดาวเทียมในปี 2001 ซึ่งเป็นปีที่มีระดับน้ำต่ำมาใช้ในการเปรียบเทียบระดับน้ำของแม่น้ำมูลกับภาพในปี 2000 และ 2002

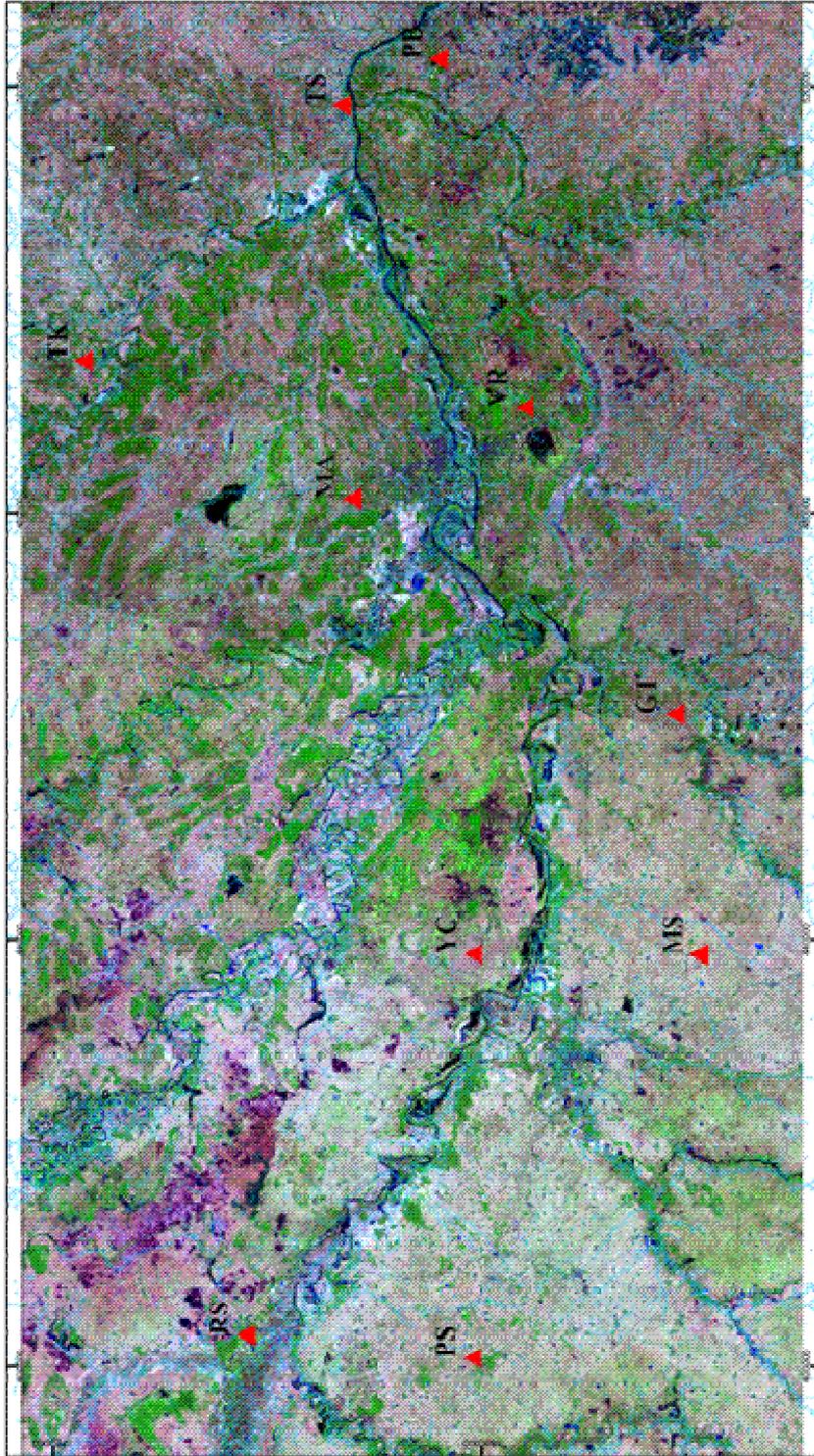
จากข้อมูลระดับน้ำและปริมาณน้ำจากสถานีตรวจวัดน้ำดังกล่าว ทำให้ทราบว่าเดือนที่มีระดับน้ำสูงในปี 2000 และปี 2002 ได้แก่วงเดือนกันยายนกับเดือนตุลาคม แต่เนื่องจากเดือนดังกล่าวยังอยู่ในฤดูฝนภาพถ่ายดาวเทียมที่ได้จึงมีเมฆบังพื้นที่ส่วนใหญ่ทำให้มองไม่เห็นลุ่มแม่น้ำมูล จึงได้ใช้ภาพจากเดือนพฤศจิกายนแทน ในการแสดงระดับน้ำของลุ่มแม่น้ำมูลในอำเภอที่ศึกษา โดยภาพถ่ายดาวเทียมที่ใช้จะใช้ภาพในปี 2002 แสดงระดับน้ำท่วม (ภาพที่ 5) และใช้ภาพถ่ายดาวเทียมในปี 2001 แสดงระดับน้ำแล้ง (ภาพที่ 6) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำที่แตกต่างกันระหว่างน้ำท่วมกับน้ำแล้ง



คำอธิบายสัญลักษณ์

- ▲ จุดเก็บตัวอย่าง
- ~ ทางน้ำ

ภาพที่ 5 แสดงภาพถ่ายดาวเทียมบริเวณแม่น้ำมูล ในจังหวัดศรีสะเกษและอุบลราชธานี โดยระบุจุดเก็บตัวอย่างในแต่ละอำเภอเป็นวงกลมในช่วงนี้ทั้งหมดของปี 2002



คำอธิบายสัญลักษณ์

▲ จุดเก็บตัวอย่าง

~~~~~ ทางน้ำ

ภาพที่ ๕ แสดงภาพถ่ายดาวเทียมบริเวณลุ่มแม่น้ำมูลในจังหวัดศรีสะเกษและอุบลราชธานี โดยระบุจุดเก็บตัวอย่างในแต่ละอำเภอเป้าหมายในช่วงน้ำแล้งของปี 2001

จากภาพถ่ายดาวเทียมจะเห็นว่าระดับน้ำในบริเวณลุ่มแม่น้ำมูลมีการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล โดยในช่วงฤดูฝนแม่น้ำมูลจะมีระดับน้ำสูงขึ้นทำให้เกิดน้ำท่วมในบริเวณพื้นที่อำเภอที่แม่น้ำมูลไหลผ่าน แต่ในฤดูอื่นระดับน้ำในแม่น้ำมูลจะลดลง และระดับน้ำในแต่ละปีจะไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำในแต่ละปี ซึ่งทุกอำเภอที่เป็นแหล่งเก็บตัวอย่างปลาคุด้านจะเป็นอำเภอที่อยู่ติดกับลุ่มแม่น้ำมูลเป็นหลัก ยกเว้นอำเภอตระการพืชผลอยู่ติดกับลุ่มน้ำลำเซบกซึ่งเป็นลุ่มน้ำสาขาของลุ่มแม่น้ำมูล โดยสภาพทางภูมิศาสตร์และลักษณะพื้นที่ของจุดเก็บตัวอย่างแต่ละอำเภอจะมีลักษณะดังนี้

จังหวัดศรีสะเกษประกอบอำเภอต่างๆ ดังนี้

อำเภอโพธิ์สุวรรณ (บ้านเลขที่ 124 หมู่บ้านโคด หมู่ 2 ต. โคด จ. ศรีสะเกษ) จุดเก็บตัวอย่างเป็นบ่อน้ำตื้นมีความลึกประมาณ 1 เมตร มีน้ำลึกประมาณครึ่งเมตร ขนาดของบ่อประมาณ 1 ไร่ ครอบๆ บ่อมีดินไผ่ขึ้นโดยรอบ และสภาพพื้นที่โดยรอบเป็นที่นา (ภาพที่ 7) จากภาพถ่ายดาวเทียมแสดงให้เห็นว่าจุดเก็บตัวอย่างเป็นพื้นที่ลุ่ม เมื่อถึงฤดูฝนทำให้น้ำท่วมถึงกันในพื้นที่ดังกล่าว ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างอยู่ห่างลำน้ำย่อยประมาณ 1 กิโลเมตร และห่างจากแม่น้ำมูลประมาณ 9 กิโลเมตร นอกจากนี้ น.ส.พ.ไทยรัฐประจำวันวันที่ 28 กรกฎาคม 2547 ได้รายงานว่ามีน้ำท่วมไร่นาและหมู่บ้านในอำเภอโพธิ์สุวรรณ ในช่วงเดือนกรกฎาคมปี 2547

อำเภอราศีไศล (บ้านเลขที่ 95 หมู่บ้านฝั่ง หมู่ 14 ต. หนองแคว จ. ศรีสะเกษ) จุดเก็บตัวอย่างเป็นบ่อน้ำรูปร่างยาว ลึกประมาณ 4-5 เมตร กำลังถูกสูบน้ำออกจากบ่อเพื่อจับปลา ครอบๆ บริเวณบ่อเป็นผืนนากว้าง และมีป่าโปร่งอยู่บางบริเวณไกลออกไป (ภาพที่ 8) จากภาพถ่ายดาวเทียมแสดงให้เห็นว่าจุดเก็บตัวอย่างเป็นพื้นที่ลุ่ม เมื่อถึงฤดูฝนทำให้น้ำท่วมถึงกันในพื้นที่ดังกล่าว ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างอยู่ห่างลำน้ำย่อยประมาณ 0.5 กิโลเมตร และห่างจากแม่น้ำมูลประมาณ 1.5 กิโลเมตร นอกจากนี้ น.ส.พ.ไทยรัฐประจำวันวันที่ 28 กรกฎาคม 2547 ได้รายงานว่ามีน้ำท่วมไร่นาและหมู่บ้านในอำเภอราศีไศล ช่วงเดือนกรกฎาคมปี 2547

อำเภอขามหมื่นน้อย (บ้านเลขที่ 65 หมู่บ้านขามหมื่นใหญ่ หมู่ 8 ต. ขามหมื่นใหญ่ จ. ศรีสะเกษ) จุดเก็บตัวอย่างเป็นบ่อน้ำรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ลึกประมาณ 2 เมตร น้ำในบ่อกำลังแห้งขอด ครอบๆ บริเวณบ่อเป็นผืนนา และมีต้นไม้ใหญ่ขึ้นประปราย (ภาพที่ 9) จากภาพถ่ายดาวเทียมแสดงให้เห็นว่าจุดเก็บตัวอย่างเป็นพื้นที่ลุ่มทำให้น้ำท่วมถึงกันในพื้นที่ดังกล่าวเมื่อถึงฤดูฝน ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างอยู่ห่างลำน้ำย่อยประมาณ 2 กิโลเมตร และห่างจากแม่น้ำมูลประมาณ 4.5 กิโลเมตร

อำเภอเมืองศรีสะเกษ (บ้านเลขที่ 33 หมู่บ้านชาด หมู่ 7 ต. หนองไฮ จ. ศรีสะเกษ) จุดเก็บตัวอย่างเป็นบ่อน้ำขนาดประมาณ 2-3 ไร่ ลึก 3-4 เมตร มีน้ำอยู่ประมาณ 1.5 เมตร รอบๆ บ่อเป็นผืนนากว้าง และมีป่าโปร่งโดยรอบผืนนา (ภาพที่ 10) จากภาพถ่ายดาวเทียมแสดงให้เห็นว่าจุดเก็บตัวอย่างเป็นพื้นที่ลุ่ม เมื่อถึงฤดูฝนทำให้น้ำท่วมถึงกันในพื้นที่ดังกล่าว ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างอยู่ห่างลำนํ้าย่อยประมาณ 2 กิโลเมตร และห่างจากแม่น้ำมูลประมาณ 13 กิโลเมตร

อำเภอกันทรารมย์ (บ้านเลขที่ 32 หมู่บ้านหนองหัวช้าง หมู่ 5 ต. หนองหัวช้าง จ. ศรีสะเกษ) จุดเก็บตัวอย่างเป็นบ่อน้ำรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาดประมาณ 2 ไร่ ลึก 3 เมตร มีน้ำอยู่ประมาณ 1 เมตร รอบบริเวณบ่อเป็นผืนนา และมีป่าโปร่งไกลออกไป (ภาพที่ 11) จากภาพถ่ายดาวเทียมแสดงให้เห็นว่าจุดเก็บตัวอย่างเป็นพื้นที่ลุ่ม เมื่อถึงฤดูฝนทำให้น้ำท่วมถึงกันในพื้นที่ดังกล่าว และจุดเก็บตัวอย่างอยู่ห่างจากแม่น้ำมูลประมาณ 3 กิโลเมตร

จังหวัดอุบลราชธานีประกอบอำเภอต่าง ๆ ดังนี้

อำเภวารินชำราบ (บ้านเลขที่ 143 หมู่บ้านโนนสมบรูณ์ หมู่ 10 ต. ธาตุ จ. อุบลราชธานี) จุดเก็บตัวอย่างเป็นบ่อน้ำรูปร่างยาว ลึกประมาณ 2 เมตร กว้างประมาณ 1 ไร่ รอบๆ บริเวณบ่อเป็นผืนนา และมีต้นไม้ใหญ่ขึ้นประปราย (ภาพที่ 12) จากภาพถ่ายดาวเทียมแสดงให้เห็นว่าจุดเก็บตัวอย่างเป็นพื้นที่ดอนทำให้น้ำท่วมถึงบริเวณดังกล่าวได้ยากแต่บริเวณดังกล่าวเมื่อถึงฤดูฝนก็จะเกิดน้ำท่วมขังเพราะเป็นที่นา ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างอยู่ห่างลำนํ้าย่อยประมาณ 1 กิโลเมตร และห่างจากแม่น้ำมูลประมาณ 6 กิโลเมตร นอกจากนี้ น.ส.พ.เคลิวิศร์ประจำวัน ที่ 11 สิงหาคม 2547 รายงานว่าในช่วงเดือนสิงหาคมปี 2547 บริเวณริมแม่น้ำมูลมีน้ำล้นตลิ่งจนเกิดน้ำท่วมในบริเวณริมแม่น้ำในอำเภวารินชำราบ

อำเภอเมืองอุบลราชธานี (บ้านเลขที่ 222 หมู่บ้านห้วยคุ่ม หมู่ 5 ต. ขามใหญ่ จ. อุบลราชธานี) จุดเก็บตัวอย่างเป็นบ่อน้ำรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาดประมาณครึ่งไร่ รอบๆ บริเวณบ่อเป็นป่าโปร่ง และมีผืนนาอยู่บางบริเวณ (ภาพที่ 13) จากภาพถ่ายดาวเทียมแสดงให้เห็นว่าจุดเก็บตัวอย่างเป็นพื้นที่ดอนทำให้น้ำท่วมถึงบริเวณดังกล่าวได้ยากแต่บริเวณดังกล่าวเมื่อถึงฤดูฝนก็จะเกิดน้ำท่วมขังได้ ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างอยู่ห่างลำนํ้าย่อยประมาณ 1 กิโลเมตร และห่างจากแม่น้ำมูลประมาณ 7.5 กิโลเมตร น.ส.พ.เคลิวิศร์ประจำวัน ที่ 11 สิงหาคม 2547 รายงานว่าช่วงเดือนสิงหาคมปี 2547 ริมแม่น้ำมูลมีน้ำล้นตลิ่งจนเกิดน้ำท่วมในบริเวณริมแม่น้ำในอำเภอเมืองอุบลราชธานี

อำเภอตระการพืชผล (บ้านเลขที่ 139 หมู่บ้านขามเปี้ย หมู่ 4 ต. ขามเปี้ย จ. อุบลราชธานี) จุดเก็บตัวอย่างเป็นบ่อน้ำขนาดประมาณ 1-2 ไร่ ขอบบ่อตื้น มีน้ำอยู่ประมาณครึ่งเมตร รอบๆ บ่อมีต้นไม้โตขึ้นโดยรอบ และสภาพพื้นที่โดยรอบเป็นที่นา (ภาพที่ 14) จากภาพถ่ายดาวเทียมแสดงให้เห็นว่าจุดเก็บตัวอย่างเป็นพื้นที่ลุ่มทำให้น้ำท่วมถึงกัน ในบริเวณดังกล่าวเมื่อถึงฤดูฝน ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างอยู่ห่างลำน้ำย่อยประมาณ 0.5 กิโลเมตร และห่างจากลำเชบกประมาณ 1.5 กิโลเมตร

อำเภอตาลสุ่ม (บ้านเลขที่ 167 หมู่บ้านนามน หมู่ 5 ต. ตาลสุ่ม จ. อุบลราชธานี) จุดเก็บตัวอย่างเป็นบ่อน้ำขนาดประมาณ 2 ไร่ รอบๆ บริเวณบ่อเป็นฝึนนา มีต้นไม้ใหญ่ขึ้นประปราย (ภาพที่ 15) จากภาพถ่ายดาวเทียมแสดงให้เห็นว่าจุดเก็บตัวอย่างเป็นพื้นที่ลุ่มทำให้น้ำท่วมถึงกัน ในบริเวณดังกล่าวเมื่อถึงฤดูฝน และจุดเก็บตัวอย่างอยู่ห่างลำน้ำย่อยประมาณ 0.1 กิโลเมตร และห่างจากแม่น้ำมูลประมาณ 0.5 กิโลเมตร

อำเภอพิบูลมังสาหาร (บ้านเลขที่ 303 หมู่บ้านสนามชัย หมู่ 9 ต. โพธิ์ไทร จ. อุบลราชธานี) จุดเก็บตัวอย่างเป็นบ่อน้ำขนาดประมาณ 2 ไร่ รอบๆ บริเวณบ่อเป็นฝึนนา และมีต้นไม้ใหญ่ขึ้นประปราย (ภาพที่ 16) จากภาพถ่ายดาวเทียมแสดงให้เห็นว่าจุดเก็บตัวอย่างเป็นพื้นที่ดอนทำให้น้ำท่วมถึงบริเวณดังกล่าวได้ยากแต่บริเวณดังกล่าวเมื่อถึงฤดูฝนก็จะเกิดน้ำท่วมขังเพราะเป็นที่นา ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างอยู่ห่างลำน้ำย่อยประมาณ 0.5 กิโลเมตร และห่างจากแม่น้ำมูลประมาณ 3.5 กิโลเมตร

สรุปจากภาพถ่ายดาวเทียมแสดงให้เห็นว่าพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นที่ราบลุ่ม แต่บางจุดเก็บตัวอย่างเป็นพื้นที่ดอน ซึ่งพื้นที่ส่วนใหญ่ใช้ในการทำนา เพราะฉะนั้นเมื่อถึงฤดูฝนโดยเฉพาะช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายนซึ่งเป็นช่วงที่มีปริมาณน้ำฝนมากระดับน้ำในแม่น้ำมูลจึงสูงขึ้น ทำให้เกิดน้ำท่วมขังในทุ่งนาและบริเวณจุดเก็บตัวอย่าง แต่ว่าจะมีการเชื่อมต่อไปยังแหล่งน้ำอื่นๆ หรือไม่ขึ้นอยู่กับระยะห่างจากลำน้ำย่อยกับระยะห่างจากแม่น้ำมูล และสิ่งกีดขวางตามธรรมชาติ โดยแต่ละจุดเก็บตัวอย่างมีระยะห่างจากลำน้ำย่อยประมาณ 0.1 - 2 กิโลเมตร และมีระยะห่างจากแม่น้ำมูลประมาณ 0.5 - 13 กิโลเมตร ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างในแต่ละอำเภอจะมีระยะห่างไม่เท่ากัน และจากข้อมูลของหนังสือพิมพ์ไทยรัฐและเดลินิวส์ได้รายงานว่าเคยเกิดน้ำท่วมในอำเภอโพธิ์สุวรรณ ราศีไศล วารินชำราบ และเมืองอุบลราชธานี ในปี 2547 นอกจากนี้เมื่อระดับน้ำเพิ่มมากขึ้นในแม่น้ำมูลก็จะทำให้พื้นที่ส่วนหนึ่งในอำเภอที่แม่น้ำมูลไหลผ่านเกิดน้ำท่วมขึ้น โดยในแต่ละปีจะมีปริมาณน้ำไม่เท่ากันทำให้แต่ละปีเกิดน้ำท่วมมากน้อยแตกต่างกัน และบางปีก็ไม่เกิดน้ำท่วมเป็นต้น



ภาพที่ 7 สภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ในอำเภอโพธิ์สุวรรณ



ภาพที่ 8 สภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ในอำเภอราศีไสล



ภาพที่ 9 สภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ในอำเภอยางชุมน้อย



ภาพที่ 10 สภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ในอำเภอเมืองศรีสะเกษ



ภาพที่ 11 สภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ในอำเภอกันทรารมย์



ภาพที่ 12 สภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ในอำเภวารินชำราบ



ภาพที่ 13 สภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ในอำเภอเมืองอุบลราชธานี



ภาพที่ 14 สภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ในอำเภอตระการพืชผล



ภาพที่ 15 สภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ในอำเภอตาลชุม



ภาพที่ 16 สภาพภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ในอำเภอพิบูลมังสาหาร

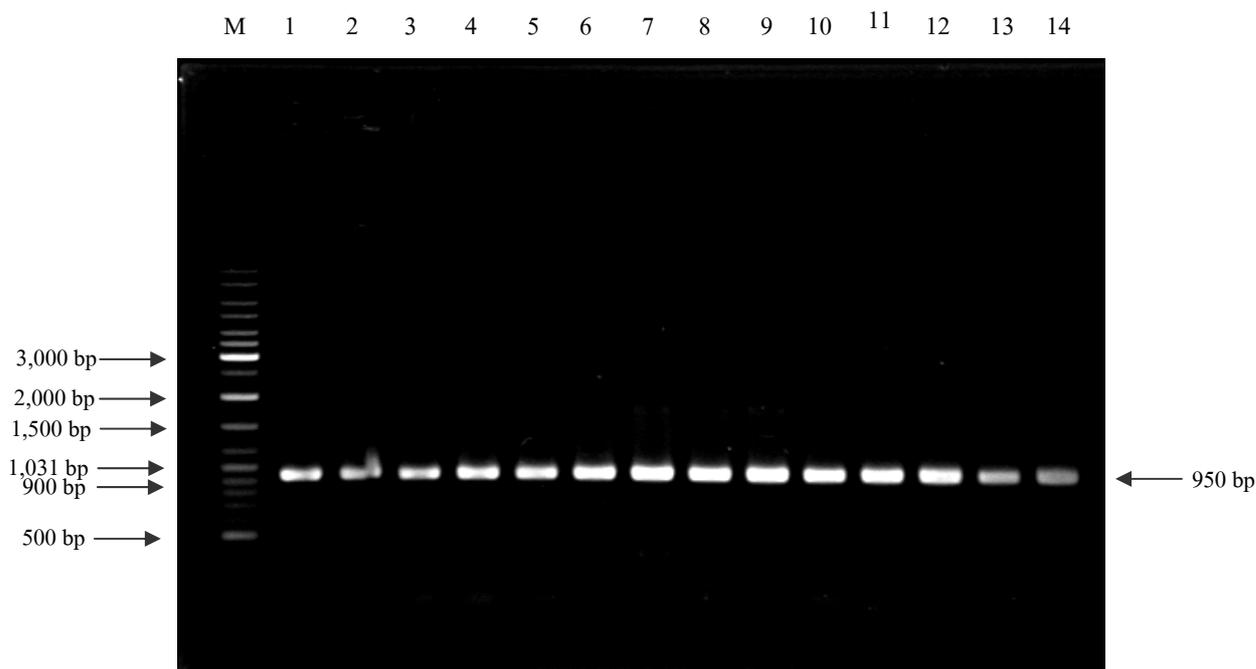
## 2. การสกัดดีเอ็นเอจากปลาดุกค้ำ

เมื่อเก็บตัวอย่างปลาดุกค้ำจากจุดเก็บตัวอย่างในอำเภอเป้าหมายได้ตามจำนวนที่ต้องการ จึงนำปลาดุกค้ำที่ได้กลับมายังห้องปฏิบัติการ และเก็บตัวอย่างในรูปเนื้อเยื่อ เพื่อนำเนื้อเยื่อปลาดุกค้ำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธีการที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจะใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ AquaPure Genomic DNA Isolation Kit ซึ่งเป็นชุดสกัดดีเอ็นเอของบริษัท Bio Rad เพื่อสกัด total genomic DNA โดยมีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 40 - 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ในแต่ละตัวอย่างที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อปลาดุกค้ำ จากการทดลองพบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ตามต้องการ โดยตรวจสอบจากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ซึ่งเป็นบริเวณเป้าหมาย และตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการทำ agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองปรากฏว่าสามารถเพิ่มปริมาณบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอได้แสดงว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้เป็นผลสำเร็จ หลังการสกัดดีเอ็นเอปลาดุกค้ำจากทั้ง 10 อำเภอ ทั้งหมด 200 ตัวอย่าง นำตัวอย่างดีเอ็นเอไปเพิ่มปริมาณบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ซึ่งเป็นบริเวณเป้าหมายต่อไป

## 3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ control region

เมื่อนำเนื้อเยื่อปลาดุกค้ำไปสกัด total genomic DNA ได้ตามต้องการ จึงใช้ดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณบริเวณ control region ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer CR-F และ primer CR-R ซึ่งผลจากการทำ PCR สามารถเพิ่มปริมาณ

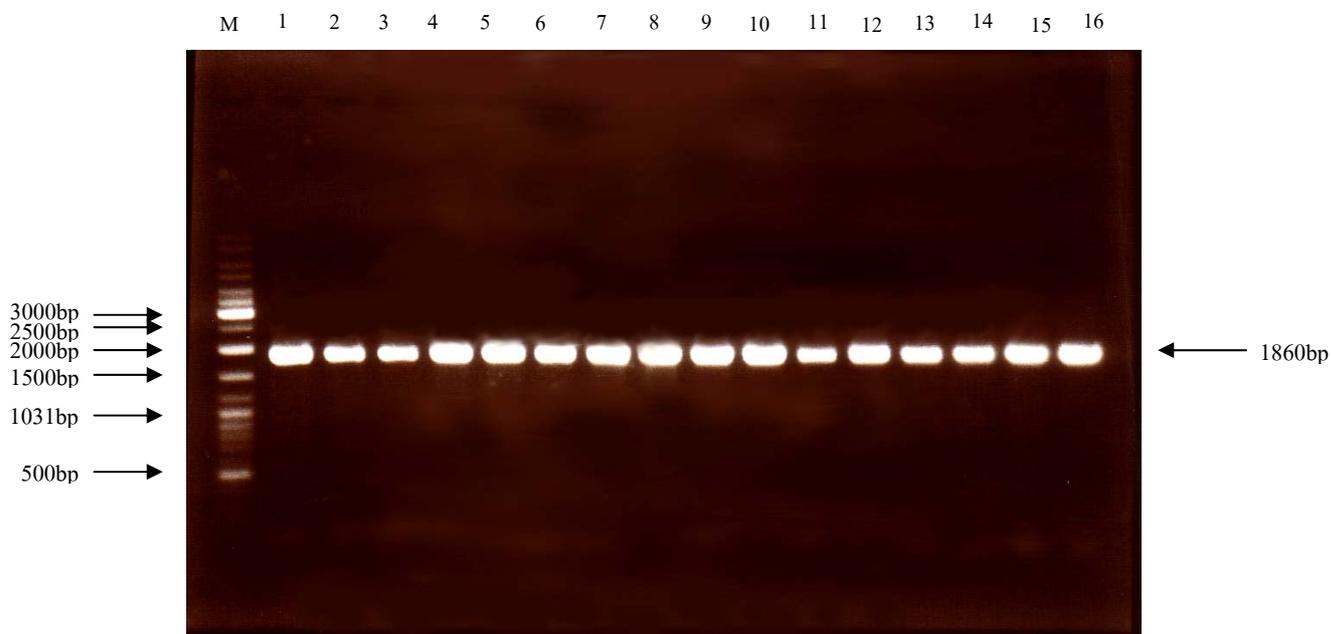
ดีเอ็นเอบริเวณ control region ได้ PCR product ขนาดประมาณ 950 คู่เบส เมื่อเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า PCR product ที่ได้มีความจำเพาะเจาะจง เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้มีเพียงชิ้นเดียว และไม่เกิดชิ้นดีเอ็นเอที่เป็น nonspecific product (ภาพที่ 17) จากผลการทดลองสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ control region ได้ทั้ง 200 ตัวอย่าง เปรียบเทียบขนาดกับบริเวณ control region ในปลาบึกพบว่าปลาบึกมีความยาวของบริเวณ control region เท่ากับ 899 คู่เบส PCR product ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกันกับบริเวณ control region ในปลาบึกแต่จะมีขนาดยาวกว่าเล็กน้อยเพราะมีความยาวในส่วนบริเวณยีน *tRNA<sup>Pro</sup>* และยีน *tRNA<sup>Phe</sup>* ที่ออกแบบเป็น primer ร่วมอยู่ด้วย เพราะฉะนั้นสรุปได้ว่า PCR product ที่ได้เป็นบริเวณเป้าหมายที่ต้องการจริง เพราะที่ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ AquaPure Genomic DNA Isolation Kit ที่บัฟเฟอร์ที่ใช้มีความเหมาะสมต่อตัวอย่าง ทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูงและคุณภาพดี จึงสามารถเพิ่มปริมาณ PCR product ได้ดี ซึ่ง PCR product ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกนำไปทำ RFLP ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหาความแตกต่างของขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอต่อไป



ภาพที่ 17 ผลการทดลองการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณ control region เมื่อใช้ primer คู่ CR-F และ CR-R สามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 950 คู่เบส ได้ตามต้องการ เมื่อเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard marker) จากภาพเป็นปลาจากอำเภอเมืองศรีสะเกษ

#### 4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีน *16S rRNA*

เมื่อนำเนื้อเยื่อปลาสดไปสกัด total genomic DNA ได้ตามต้องการ จึงใช้ดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน *16S rRNA* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer 16S-F และ primer 16S-R พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน *16S rRNA* ได้ PCR product ขนาดประมาณ 1,860 คู่เบส เมื่อเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานเปรียบเทียบขนาดกับยีน *16S rRNA* ในปลาบึกพบว่ามีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,673 คู่เบส แต่เมื่อรวมส่วนที่ออกแบบเป็น primer ด้วยพบว่ามีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,860 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับ PCR product ที่ได้มีขนาดเท่ากับยีน *16S rRNA* รวมส่วนออกแบบเป็น primer ด้วยของปลาบึก จึงสรุปได้ว่า PCR product ที่ได้เป็นบริเวณเป้าหมายที่ต้องการจริง พบว่า PCR product ที่ได้มีความจำเพาะเจาะจง เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้มีเพียงชิ้นเดียว และไม่เกิดชิ้นดีเอ็นเอที่เป็น nonspecific product (ภาพที่ 18) จากผลการทดลองสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการได้ทั้ง 200 ตัวอย่าง PCR product ที่เพิ่มปริมาณได้ จะถูกนำไปวิเคราะห์ RFLP pattern ของ *16S rRNA* ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหาความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอต่อไป



ภาพที่ 18 ผลการทดลองการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายยีน *16S rRNA* เมื่อใช้ primer คู่ 16S-F และ 16S-R ซึ่งสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,860 คู่เบส ได้ตามต้องการ เมื่อเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard marker) จากภาพเป็นปลาจากอำเภอราศีไศล

## 5. การวิเคราะห์ RFLP ในบริเวณ control region

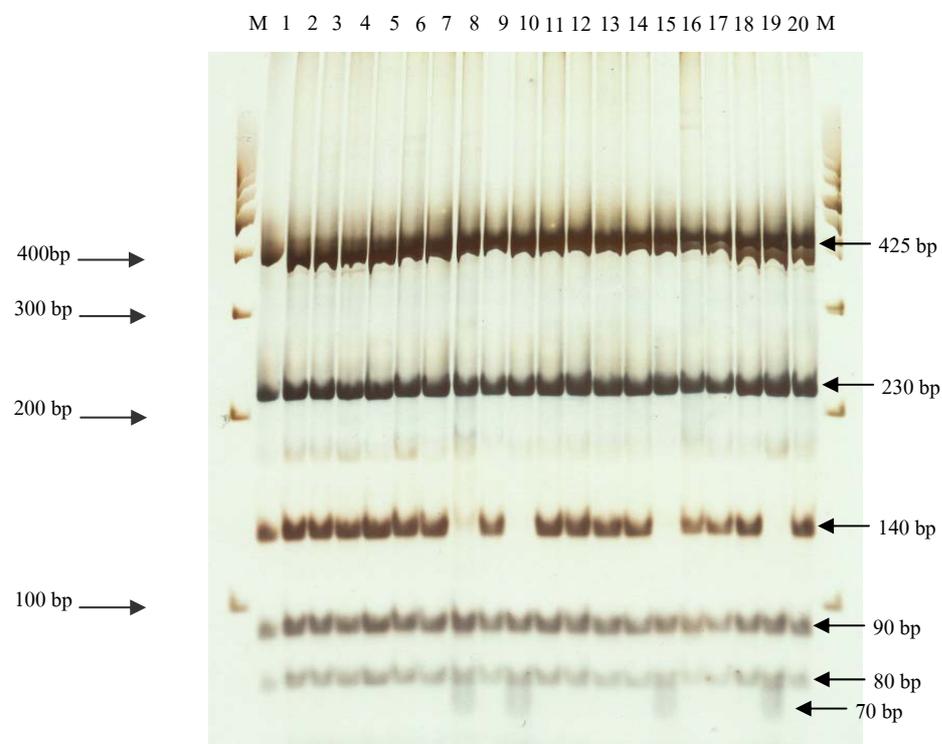
### 5.1 ผลการตัดบริเวณ control region ด้วยเอนไซม์ *Tas I*

จากการตัดดีเอ็นเอบริเวณ control region ด้วยเอนไซม์ *Tas I* ในตัวอย่างปลาอุกด้าน จำนวน 200 ตัวอย่าง ได้ผลดังภาพที่ 19 ผลการทดลองเป็นรูปแบบของตำแหน่งตัดที่แตกต่างกัน เป็น 2 รูปแบบได้แก่รูปแบบ A และ B โดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7 พบว่า ปลาอุกด้านในกลุ่ม A มีชิ้นส่วนภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Tas I* ทั้งหมด 5 ชิ้น (ขนาด 425, 230, 140, 90 และ 80 คู่เบส) เมื่อรวมความยาวของแต่ละชิ้นจะให้ความยาวของ control region เท่ากับ 965 คู่เบส ส่วนกลุ่ม B มีชิ้นดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Tas I* ทั้งหมด 5 ชิ้น (ขนาด 425, 230, 90, 80 และ 70 คู่เบส) เมื่อรวมความยาวของแต่ละชิ้นจะให้ความยาวของดีเอ็นเอบริเวณ control region เท่ากับ 895 คู่เบส เหตุที่เป็นเช่นนี้อธิบายโดย ให้กลุ่ม A ที่มีสมาชิกมากที่สุด (140 ตัว) เป็นรูปแบบการตัดปกติ ส่วนกลุ่ม B เป็นรูปแบบที่พบการกลายพันธุ์ออกไปจากกลุ่ม A 1 ครั้ง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม A กับ B ได้แก่ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 140 คู่เบสของกลุ่ม A ซึ่งไม่พบในกลุ่ม B แสดงให้เห็นว่าในกลุ่ม B มีการกลายพันธุ์ 1 ครั้ง ทำให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Tas I* ในชิ้น 140 คู่เบส ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 70 คู่เบสแทน ซึ่งเมื่อตรวจสอบผลจากการทำ acrylamide gel จะเห็นว่าบริเวณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 70 คู่เบสจะมีความกว้างของชิ้นดีเอ็นเอมากกว่าชิ้นดีเอ็นเอชิ้นอื่นๆ เกิดจากชิ้นดีเอ็นเอใหม่ที่ใส่ 2 ชิ้น จากการตัดชิ้น 140 คู่เบส มีขนาดใกล้เคียงกันทำให้ชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองอยู่ชิดกันมากจนเห็นเหมือนเป็นชิ้นเดียวกัน โดยพบว่าในกลุ่มรูปแบบ A มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดคือ 140 ตัวเป็นปลาอุกด้านมาจากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 10 จุด ในแต่ละอำเภอของทั้ง 2 จังหวัด และรูปแบบของกลุ่ม B มีสมาชิกในกลุ่ม 60 ตัวอย่าง เป็นปลามาจากอำเภอราศีไสลอำเภอเมืองศรีสะเกษ อำเภอขามเฒ่า อำเภอโพธิ์สุวรรณ อำเภอเมืองอุบลราชธานี อำเภวารินชำราบอำเภอตาลสุ่ม อำเภอพิบูลมังสาหาร และอำเภอตระการพืชผล (ยกเว้นอำเภอกันทรารมย์ที่ไม่พบรูปแบบของกลุ่ม B) ดังตารางที่ 8 สอดคล้องกับรายงานของ Ikeda and Taniguchi (2002) และ Brzuzan *et al.* (1998) ที่ศึกษาบริเวณ control region ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอด้วยวิธีการ RFLP ของปลา Ryukyu-ayu และปลา *Esox lucius* ตามลำดับ พบว่าบางรูปแบบมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กขาดหายไปเนื่องจากมีตำแหน่งตัดภายในชิ้นดีเอ็นเอเมื่อถูกตัดทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กเกินไปไม่สามารถตรวจสอบได้ และจากการศึกษาของนิภาพร (2539) ทำการศึกษา รูปแบบของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในปลาอุกอุย พบว่ามี

รูปแบบของกลุ่มหนึ่งที่ศึกษามีขนาดรวมน้อยเกินไป เนื่องจากขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่หายไปมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดชิ้นดีเอ็นเออื่นที่ปรากฏบนเจล ทำให้ชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองไม่สามารถบอกขนาดได้

ตารางที่ 7 ผลการตัด PCR product ของบริเวณ control region โดยเอนไซม์ *Tas I*

| ขนาด(คู่เบส)      | รูปแบบ control region กลุ่ม A | รูปแบบ control region กลุ่ม B |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 425               | 425                           | 425                           |
| 230               | 230                           | 230                           |
| 140               | 140                           | -                             |
| 90                | 90                            | 90                            |
| 80                | 80                            | 80                            |
| 70                | -                             | 70                            |
| จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ | 5                             | 5                             |
| ผลรวมจำนวนคู่เบส  | 965                           | 895                           |



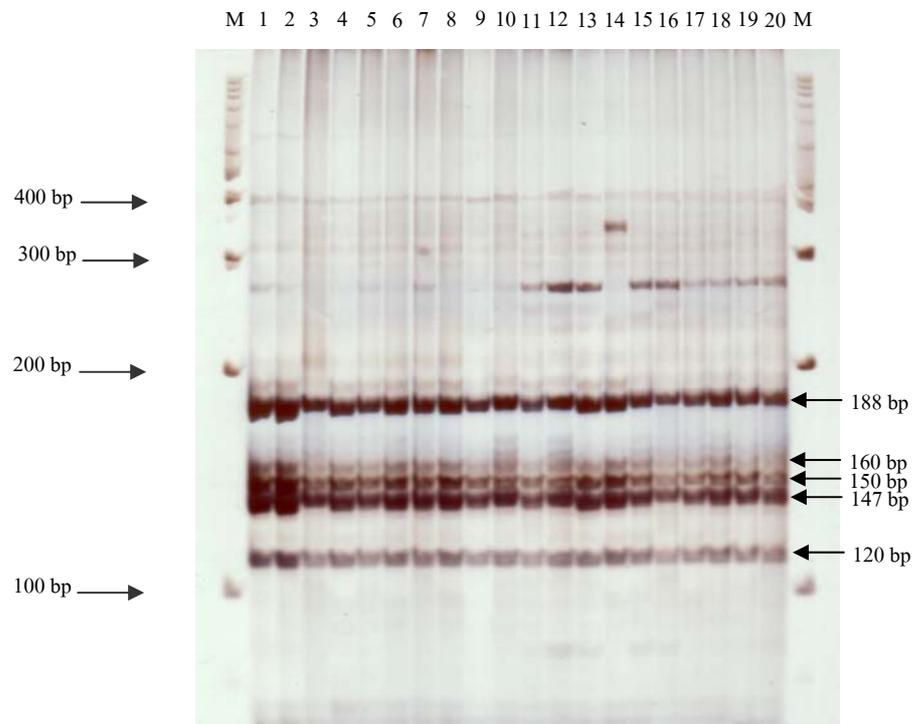
ภาพที่ 19 ผลการทดลองการตัด PCR product บริเวณ control region ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tas I*

**ตารางที่ 8** ผลการตัด PCR product จากปลาอุกด้าน ด้วยเอนไซม์ *Tas I* ตามอำเภอที่เก็บตัวอย่าง และแสดงจำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละอำเภอ

| รูปแบบ | สถานที่        |    |    |    |    |    |    |    |    |    | รวม |     |
|--------|----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
|        | Control region | VR | TS | RS | GT | MA | MS | PB | PS | TK |     | YC  |
| A      |                | 14 | 17 | 15 | 20 | 4  | 16 | 8  | 17 | 13 | 16  | 140 |
| B      |                | 6  | 3  | 5  | -  | 16 | 4  | 12 | 3  | 7  | 4   | 60  |

## 5.2 ผลการตัดบริเวณ control region ด้วยเอนไซม์ *TruI I*

จากการตัดดีเอ็นเอบริเวณ control region ด้วยเอนไซม์ *TruI I* ในตัวอย่างปลาอุกด้าน จำนวน 200 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองเป็นรูปแบบของตำแหน่งตัดที่เหมือนกัน (ภาพที่ 20) จึงกำหนดรูปแบบเป็นกลุ่มเดียวคือ A โดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 9 พบว่ากลุ่ม A จะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *TruI I* ทั้งหมด 5 ชิ้น (ขนาด 188, 160, 150, 147 และ 120 คู่เบส) เมื่อรวมความยาวแต่ละชิ้นจะให้ความยาวของกลุ่ม A เท่ากับ 765 คู่เบส โดยทำการตรวจสอบผลจากการทำ acrylamide gel พบว่าผลรวมของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีความยาวสั้นกว่าปกติ เมื่อเทียบกับขนาด PCR product เกิดจากมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกันซ้อนทับกันคือชิ้น 188 คู่เบส จากการทำ acrylamide gel ชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองอยู่ชิดกันมาก ทำให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 188 คู่เบส มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอหนากว่าชิ้นดีเอ็นเอชิ้นอื่น ไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้น acrylamide gel ได้มากกว่านี้เพราะชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *TruI I* ชิ้นอื่นจะเกิดลักษณะซ้อนทับกันทำให้การอ่านผลการทดลองทำได้ยาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของนิภาพร (2539) ที่ทำการศึกษารูปแบบของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในปลาอุกอุย พบว่ามีรูปแบบของกลุ่มหนึ่งมีขนาดรวมน้อยเกินไป เนื่องจากขนาดของชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองอยู่ชิดกันจนไม่สามารถแยกขนาดได้ โดยพบกลุ่ม A มีจำนวนสมาชิกทั้งหมด 200 ตัวอย่างเป็นปลาอุกด้านมาจากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 10 จุดในแต่ละอำเภอของทั้ง 2 จังหวัด ดังตารางที่ 10 จึงไม่เกิดความแตกต่างของรูปแบบชิ้นดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ *TruI I* ในประชากรที่ศึกษา



ภาพที่ 20 ผลการทดลองการตัด PCR product บริเวณ control region ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TruI*

ตารางที่ 9 ผลการตัด PCR product ของบริเวณ control region โดยเอนไซม์ *TruI*

| ขนาด(คู่เบส)      | รูปแบบ control region กลุ่ม A |
|-------------------|-------------------------------|
| 188               | 188                           |
| 160               | 160                           |
| 150               | 150                           |
| 147               | 147                           |
| 120               | 120                           |
| จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ | 5                             |
| ผลรวมจำนวนคู่เบส  | 765                           |

ตารางที่ 10 ผลการตัด PCR product จากปลาอุกด้าน ด้วยเอนไซม์ *TruI* ตามอำเภอที่เก็บตัวอย่าง และแสดงจำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละอำเภอ

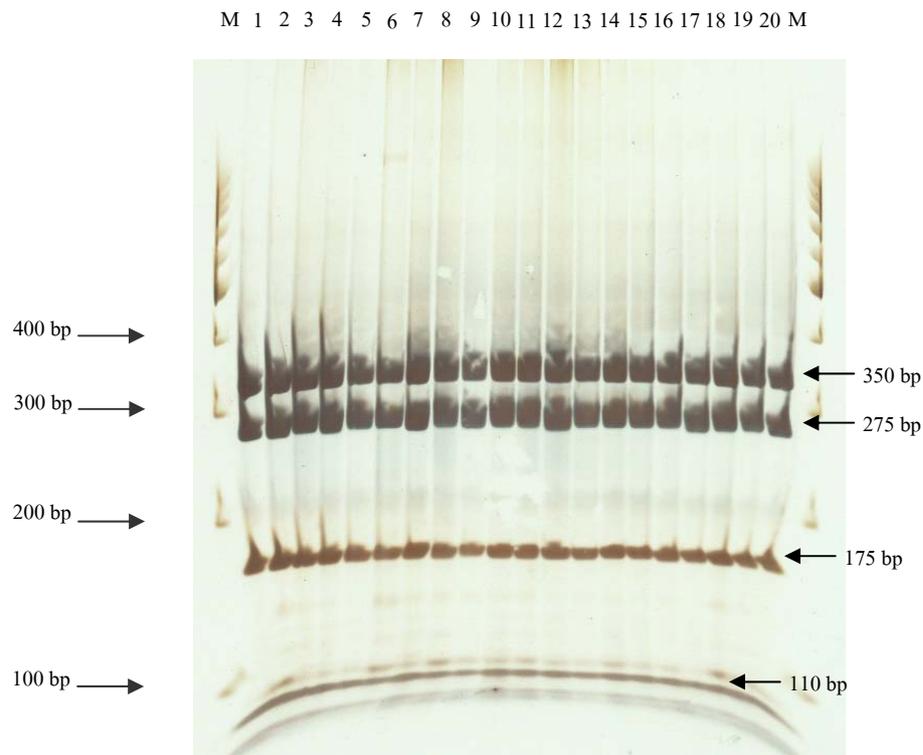
| รูปแบบ              | สถานที่ |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
|---------------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
|                     | VR      | TS | RS | GT | MA | MS | PB | PS | TK | YC | รวม |
| Control region<br>A | 20      | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 200 |

### 5.3 ผลการตัดบริเวณ control region ด้วยเอนไซม์ *Rsa I*

จากการตัดดีเอ็นเอบริเวณ control region ด้วยเอนไซม์ *Rsa I* ในตัวอย่างปลาอุกด้าน จำนวน 200 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองเป็นรูปแบบของตำแหน่งตัดที่ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 21) กลุ่ม A มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอแสดงไว้ในตารางที่ 11 พบว่ากลุ่ม A จะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa I* ทั้งหมด 4 ชิ้น (ขนาด 350, 275, 175, และ 110 คู่เบส) เมื่อรวมความยาวของแต่ละชิ้นจะให้ความยาวบริเวณ control region เท่ากับ 910 คู่เบส ขนาดชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดรวมกันมีขนาดสั้นกว่า PCR product เล็กน้อยแสดงว่าอาจมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กขาดหายไป สอดคล้องกับรายงานของ Ikeda and Taniguchi (2002) และ Brzuzan *et al.* (1998) ทำการศึกษา control region ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอด้วยวิธีการ RFLP พบบาง haplotype ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กขาดหายไป เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอบางชิ้นเมื่อถูกตัดจะมีขนาดเล็กเกินไปตรวจสอบไม่ได้รูปแบบที่ได้จึงแตกต่างกัน โดยพบกลุ่ม A ในประชากรทั้ง 200 ตัวอย่าง เป็นปลาอุกด้านมาจากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 10 จุดในแต่ละอำเภอของทั้ง 2 จังหวัด ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 11 ผลการตัด PCR product ของบริเวณ control region โดยเอนไซม์ *Rsa I*

| ขนาด(คู่เบส)      | รูปแบบ control region กลุ่ม A |
|-------------------|-------------------------------|
| 350               | 350                           |
| 275               | 275                           |
| 175               | 175                           |
| 110               | 110                           |
| จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ | 4                             |
| ผลรวมจำนวนคู่เบส  | 910                           |



ภาพที่ 21 ผลการทดลองการตัด PCR product บริเวณ control region ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa* I

ตารางที่ 12 ผลการตัด PCR product จากปลาคูก้าน ด้วยเอนไซม์ *Rsa* I ตามอำเภอที่เก็บตัวอย่าง และแสดงจำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละอำเภอ

| รูปแบบ         | สถานที่ |    |    |    |    |    |    |    |    |    | รวม |     |
|----------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
|                | VR      | TS | RS | GT | MA | MS | PB | PS | TK | YC |     |     |
| Control region |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |
| A              | 20      | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20  | 200 |

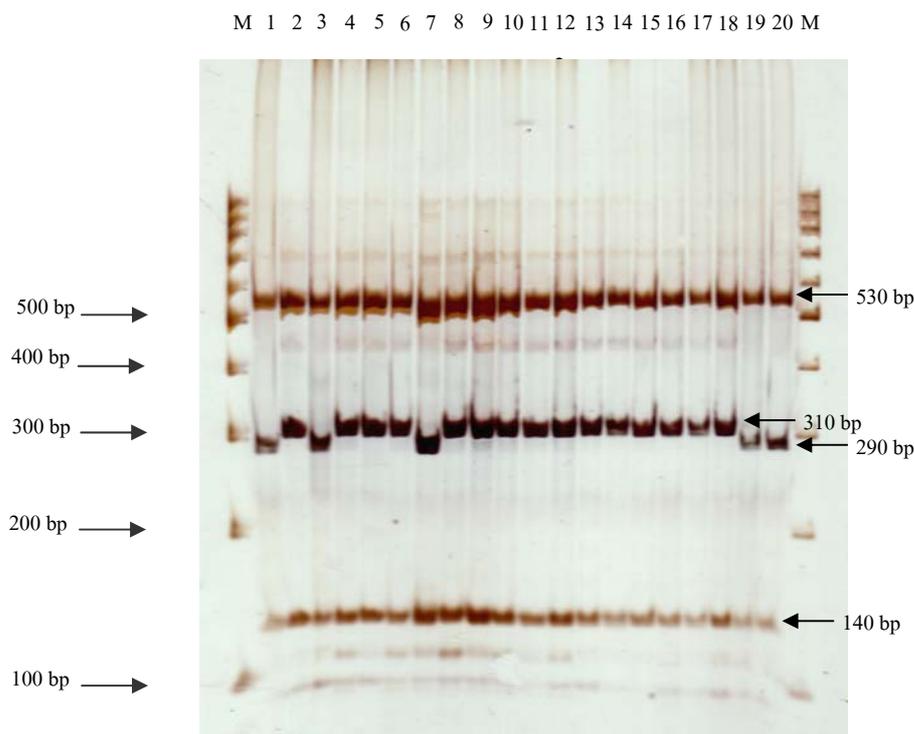
#### 5.4 ผลการตัดบริเวณ control region ด้วยเอนไซม์ *Hin*1 II

จากการตัดดีเอ็นเอบริเวณ control region ด้วยเอนไซม์ *Hin*1 II ในตัวอย่างปลาคูก้าน จำนวน 200 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองเป็นรูปแบบของตำแหน่งตัดที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 22) เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่ม A และ B โดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 13 พบว่าปลาคูก้าน ในกลุ่ม A จะมีชิ้นดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*1 II ทั้งหมด 3 ชิ้น (ขนาด 530, 290 และ 140 คู่เบส) เมื่อรวมความยาวของแต่ละชิ้นจะให้ความยาวของดีเอ็นเอบริเวณ control region เท่ากับ

960 คู่เบส ส่วนกลุ่ม B มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin1* II ทั้งหมด 3 ชิ้น (ขนาด 530, 310 และ 140 คู่เบส) เมื่อรวมความยาวของแต่ละชิ้นจะให้ความยาวทั้งหมด 980 คู่เบส เหตุที่เป็นเช่นนี้อธิบายโดย ให้กลุ่ม A ที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุด (137 ตัวอย่าง) เป็นรูปแบบการตัดแบบปกติ ส่วนกลุ่ม B จะเป็นรูปแบบที่พบการกลายพันธุ์ออกไปจากกลุ่ม A 1 ครั้ง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม A กับ B คือชิ้นดีเอ็นเอขนาด 290 คู่เบส ในกลุ่ม A หายไป แล้วมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 310 คู่เบสแทนในกลุ่ม B เกิดจากการกลายพันธุ์ 1 ครั้ง เพราะเบสในตำแหน่งตัดจำเพาะมีการเปลี่ยนแปลงไปทำให้ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Hin1* II หายไป 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 310 คู่เบสในกลุ่ม B แทนโดยชิ้นดีเอ็นเอขนาด 290 คู่เบส เป็นชิ้นที่อยู่ด้านปลายของ PCR product ซึ่งในกลุ่ม A เอนไซม์ *Hin1* II สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอ 310 คู่เบสได้ทำให้เกิดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 290 คู่เบสออกมา ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 20 คู่เบส มีขนาดเล็กมากจึงไม่สามารถตรวจสอบได้จากการทำ acrylamide gel ในกลุ่ม B ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 310 คู่เบส มาแทนชิ้น 290 คู่เบส จากการทำ acrylamide gel พบว่ากลุ่ม A มีจำนวนสมาชิกมากที่สุด 137 ตัวอย่าง เป็นปลาอุกด้านมาจากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 10 จุดในแต่ละอำเภอของทั้ง 2 จังหวัด กลุ่ม B มีจำนวนสมาชิกทั้งหมด 63 ตัวอย่าง มาจากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 10 จุดเช่นกัน ดังตารางที่ 14 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Takahashi and Ohara (2004) ที่ศึกษาบริเวณ control region ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของปลา *Rhinogobius* โดยวิธีการ PCR-RFLP จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน พบการขาดหายไปของชิ้นดีเอ็นเอบางชิ้นทำให้ขนาดรวมไม่เท่ากันในแต่ละรูปแบบ

ตารางที่ 13 ผลการตัด PCR product ของบริเวณ control region โดยเอนไซม์ *Hin1* II

| ขนาด(คู่เบส)      | รูปแบบ control region กลุ่ม A | รูปแบบ control region กลุ่ม B |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 530               | 530                           | 530                           |
| 310               | -                             | 310                           |
| 290               | 290                           | -                             |
| 140               | 140                           | 140                           |
| จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ | 3                             | 3                             |
| ผลรวมจำนวนคู่เบส  | 960                           | 980                           |



ภาพที่ 22 ผลการทดลองการตัด PCR product บริเวณ control region ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin1* II

ตารางที่ 14 ผลการตัด PCR product จากปลาคูก้าน ด้วยเอนไซม์ *Hin1* II ตามอำเภอที่เก็บตัวอย่าง และแสดงจำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละอำเภอ

| รูปแบบ         | สถานที่ |    |    |    |    |    |    |    |    |    | รวม |  |
|----------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|--|
|                | VR      | TS | RS | GT | MA | MS | PB | PS | TK | YC |     |  |
| Control region |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |  |
| A              | 5       | 12 | 10 | 12 | 17 | 19 | 19 | 18 | 10 | 15 | 137 |  |
| B              | 15      | 8  | 10 | 8  | 3  | 1  | 1  | 2  | 10 | 5  | 63  |  |

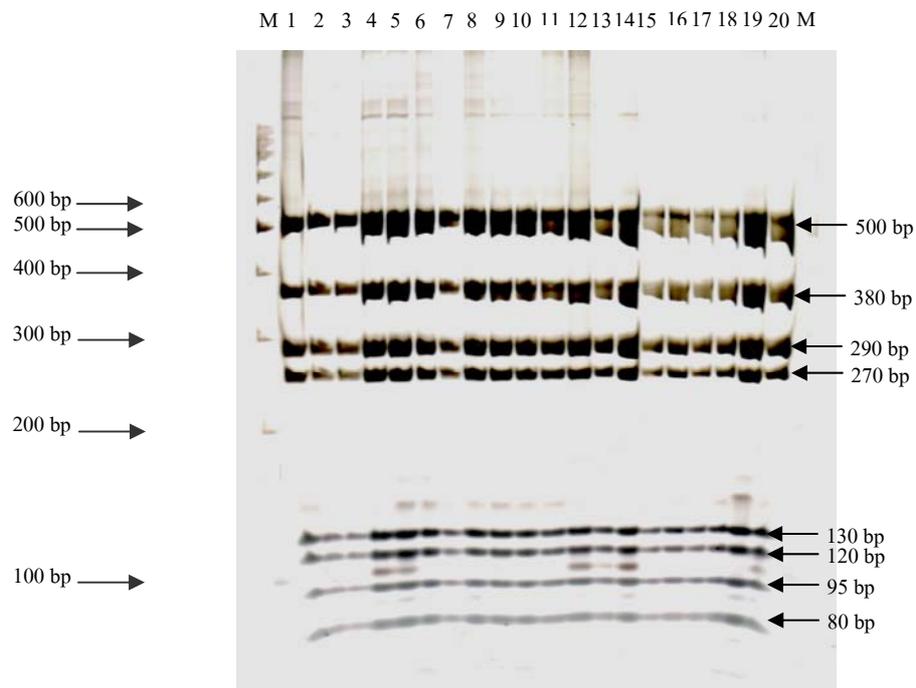
จากการเปรียบเทียบรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 4 ชนิด ได้แก่เอนไซม์ *Tas* I, *Tru1* I, *Rsa* I, *Hin1* II พบว่าการตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa* I และ *Tru1* I ได้รูปแบบชิ้นดีเอ็นเอ ออกมาเป็นรูปแบบเดียวทำให้ไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมจากการตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด นี้ ส่วนการตัดด้วยเอนไซม์ *Tas* I และ *Hin1* II พบว่าเอนไซม์ *Tas* I สามารถตัดแล้วเกิดรูปแบบของกลุ่มออกมาได้เป็น 2 รูปแบบ ส่วนเอนไซม์ *Hin1* II ตัดแล้วเกิดรูปแบบของกลุ่มเป็น 2 รูปแบบ เช่นกัน โดยรูปแบบของกลุ่มที่แตกต่างกันจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Tas* I นั้น พบกระจายอยู่ในเกือบทุกอำเภอ จะมีทั้ง 2 รูปแบบ ยกเว้นอำเภอกันทรารมย์ที่พบรูปแบบ A รูปแบบเดียว ส่วนเอนไซม์

*Hin*1 II มีรูปแบบกลุ่มทั้ง A และ B พบกระจายอยู่รวมกันในทุกๆ จุด แสดงถึงการถ่ายเทยีนระหว่างกันในประชากรปลาคุกด้านจากจุดเก็บตัวอย่าง

## 6. การวิเคราะห์ RFLP ในยีน *16S rRNA*

### 6.1 ผลการตัดยีน *16S rRNA* ด้วยเอนไซม์ *Dpn* II

จากการตัดยีน *16S rRNA* ด้วยเอนไซม์ *Dpn* II ในตัวอย่างปลาคุกด้านจำนวน 200 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองเป็นรูปแบบของตำแหน่งตัดที่เหมือนกัน (ภาพที่ 23) โดยรูปแบบการตัดที่ได้เรียกเป็นกลุ่ม A ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 15 พบว่าปลาคุกด้านในกลุ่ม A จะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Dpn* II ทั้งหมด 8 ชิ้น (ขนาด 500, 380, 290, 270, 130, 120, 95 และ 80 คู่เบส) เมื่อรวมความยาวของแต่ละชิ้นจะได้อายุยาวเท่ากับ 1865 คู่เบส โดยพบกลุ่ม A ในตัวอย่างปลาคุกด้านทั้ง 200 ตัวอย่าง มาจากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 10 จุดในแต่ละอำเภอของทั้ง 2 จังหวัด ดังตารางที่ 16 แสดงว่าเอนไซม์ *Dpn* II ไม่แสดงความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอพบรูปแบบของกลุ่ม A จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Dpn* II เป็นรูปแบบดีเอ็นเอทั้งหมดของประชากรตัวอย่างที่ศึกษาซึ่งมีตำแหน่งตัดเหมือนกันในตัวอย่าง แสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม สอดคล้องกับรายงานของ Brunner *et al.* (1998) ศึกษาปลา Arctic char โดยวิธีการ PCR-RFLP พบว่ามีเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิดที่ตัดดีเอ็นเอได้รูปแบบของดีเอ็นเอเหมือนกัน เนื่องจากบริเวณที่ศึกษาพบการกลายพันธุ์น้อยในตำแหน่ง Restriction site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการศึกษา



ภาพที่ 23 ผลการทดลองการตัด PCR product ยีน *16S rRNA* โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dpn II*

ตารางที่ 15 ผลการตัด PCR product ของยีน *16S rRNA* โดยเอนไซม์ *Dpn II*

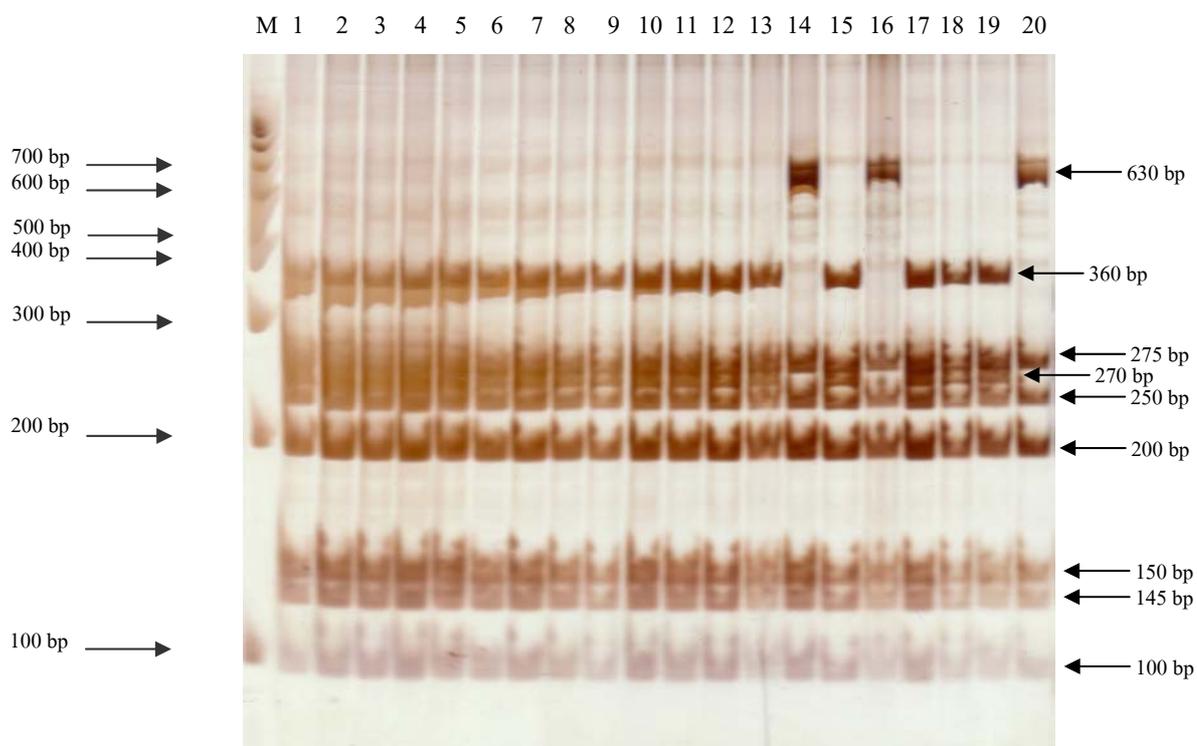
| ขนาด(คู่เบส)      | รูปแบบ <i>16S rRNA</i> กลุ่ม A |
|-------------------|--------------------------------|
| 500               | 500                            |
| 380               | 380                            |
| 290               | 290                            |
| 270               | 270                            |
| 130               | 130                            |
| 120               | 120                            |
| 95                | 95                             |
| 80                | 80                             |
| จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ | 8                              |
| ผลรวมจำนวนคู่เบส  | 1865                           |

**ตารางที่ 16** ผลการตัด PCR product จากปลาคูก้าน ด้วยเอนไซม์ *Dpn II* ตามอำเภอที่เก็บตัวอย่าง และแสดงจำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละอำเภอ

| รูปแบบ          | สถานที่ |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |  |
|-----------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|--|
|                 | VR      | TS | RS | GT | MA | MS | PB | PS | TK | YC | รวม |  |
| <i>16S rRNA</i> |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |  |
| A               | 20      | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 200 |  |

## 6.2 ผลการตัดยีน *16S rRNA* ด้วยเอนไซม์ *Hae III*

จากการตัดยีน *16S rRNA* ด้วยเอนไซม์ *Hae III* ในตัวอย่างปลาคูก้านจำนวน 200 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองเป็นรูปแบบของตำแหน่งตัดที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 24) เป็น 2 รูปแบบ ได้แก่ได้แก่กลุ่ม A และ B โดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 17 พบว่าปลาคูก้านในกลุ่ม A มีชิ้นดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae III* ทั้งหมด 8 ชิ้น (ขนาด 360, 275, 270, 250, 200, 150, 145 และ 100 คู่เบส) เมื่อรวมความยาวของแต่ละชิ้นจะให้ความยาวของยีน *16S rRNA* เท่ากับ 1,750 คู่เบส ส่วนกลุ่ม B มีชิ้นดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae III* ทั้งหมด 7 ชิ้น (ขนาด 630, 275, 250, 200, 150, 145 และ 100 คู่เบส) เมื่อรวมความยาวของแต่ละชิ้นจะให้ความยาวทั้งหมด 1,750 คู่เบส ซึ่งมีขนาดโดยรวมสั้นกว่า PCR product ประมาณ 100 คู่เบส คาดว่าเกิดจากส่วนที่หายไปถูกตัดเป็นชิ้นย่อยขนาดเล็กจนไม่สามารถตรวจสอบได้โดยการทำ acrylamide gel โดยกลุ่ม A ที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุด (197 ตัวอย่าง) เป็นรูปแบบการตัดแบบปกติ ส่วนกลุ่ม B เป็นรูปแบบที่เกิดการกลายพันธุ์ไปเมื่อเทียบกับกลุ่ม A โดยพบการกลายพันธุ์ 1 ครั้ง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันได้แก่ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 630 คู่เบส ที่กลุ่ม A ไม่มีแต่ในกลุ่ม A จะมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 270 กับ 360 คู่เบสแทน (ภาพที่ 24) ในกลุ่ม B ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 630 คู่เบสออกจากการรวมกันของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 270 กับ 360 คู่เบสในกลุ่ม A เกิดจากการกลายพันธุ์ 1 ครั้งในชิ้น 630 คู่เบส โดยพบว่าในกลุ่ม A มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดคือ 197 ตัวอย่าง มาจากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 10 จุดในแต่ละอำเภอของทั้ง 2 จังหวัด และกลุ่ม B มีจำนวนสมาชิก 3 ตัวอย่าง เป็นปลาคูก้านจากอำเภอพิบูลมังสาหารจุดเดียวดังตารางที่ 18 สอดคล้องกับ Ikeda *et al.* (2003) ศึกษาโครงสร้างประชากรในปลา *ryukyuensis* โดยวิธี PCR-RFLP พบว่าเอนไซม์ที่ให้รูปแบบของ haplotype ที่แตกต่างกันมักเกิดจากมีจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นหรือลดลงเนื่องจากมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนั้น และส่วนใหญ่เกิดการกลายพันธุ์เพียง 1 ครั้งในระดับประชากร



ภาพที่ 24 ผลการทดลองการตัด PCR product ยีน *16S rRNA* โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae III*

ตารางที่ 17 ผลการตัด PCR product ของยีน *16S rRNA* โดยเอนไซม์ *Hae III*

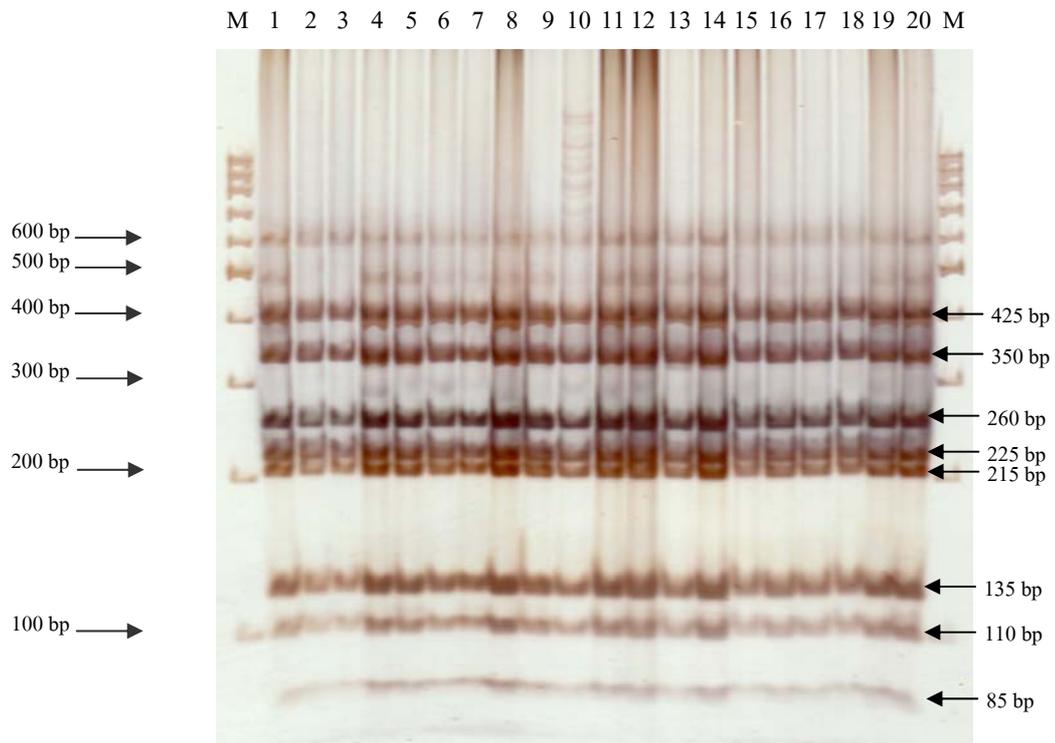
| ขนาด(คู่เบส)      | รูปแบบ <i>16S rRNA</i> กลุ่ม A | รูปแบบ <i>16S rRNA</i> กลุ่ม B |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 630               | -                              | 630                            |
| 360               | 360                            | -                              |
| 275               | 275                            | 275                            |
| 270               | 270                            | -                              |
| 250               | 250                            | 250                            |
| 200               | 200                            | 200                            |
| 150               | 150                            | 150                            |
| 145               | 145                            | 145                            |
| 100               | 100                            | 100                            |
| จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ | 8                              | 7                              |
| ผลรวมจำนวนคู่เบส  | 1750                           | 1750                           |

**ตารางที่ 18** ผลการตัด PCR product จากปลาคูก้าน ด้วยเอนไซม์ *Hae* III ตามอำเภอที่เก็บตัวอย่าง และแสดงจำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละอำเภอ

| รูปแบบ          | สถานที่ |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |  |
|-----------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|--|
|                 | VR      | TS | RS | GT | MA | MS | PB | PS | TK | YC | รวม |  |
| <i>16S rRNA</i> |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |  |
| A               | 20      | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 17 | 20 | 20 | 20 | 197 |  |
| B               | -       | -  | -  | -  | -  | -  | 3  | -  | -  | -  | 3   |  |

### 6.3 ผลการตัดยีน *16S rRNA* ด้วยเอนไซม์ *Tas* I

จากการตัดยีน *16S rRNA* ด้วยเอนไซม์ *Tas* I ในตัวอย่างปลาคูก้านจำนวน 200 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองเป็นรูปแบบของตำแหน่งตัดที่เหมือนกัน (ภาพที่ 25) ได้เป็นรูปแบบ A ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 19 พบว่าปลาคูก้านในกลุ่ม A มีชิ้นดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Tas* I ทั้งหมด 8 ชิ้น (ขนาด 425, 350, 260, 225, 215, 135, 110 และ 85 คู่เบส) เมื่อรวมความยาวของแต่ละชิ้นจะได้ความยาวของยีน *16S rRNA* เท่ากับ 1,805 คู่เบส พบว่ากลุ่ม A มีจำนวนสมาชิกทั้งหมด 200 ตัวอย่าง มาจากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 10 จุดในแต่ละอำเภอของทั้ง 2 จังหวัด ดังตารางที่ 20 แสดงว่าเอนไซม์ *Tas* I ไม่แสดงความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอ สอดคล้องกับ Sell and Spirkovski (2004) ศึกษาปลา Ohrid trout โดยเทคนิค PCR-RFLP พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดเมื่อตัดดีเอ็นเอได้รูปแบบของดีเอ็นเอแบบเดียวกัน ไม่แสดงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง



ภาพที่ 25 ผลการทดลองการตัด PCR product ยีน *16S rRNA* โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tas I*

ตารางที่ 19 ผลการตัด PCR product ของยีน *16S rRNA* โดยเอนไซม์ *Tas I*

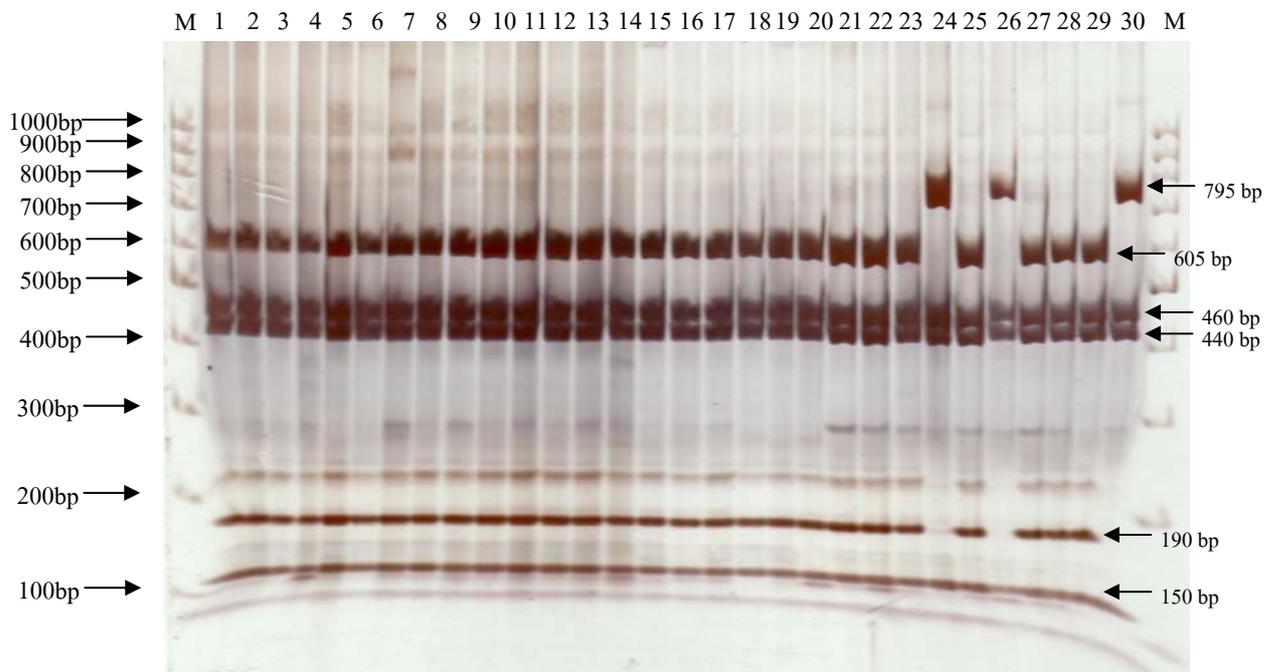
| ขนาด(คู่เบส)     | รูปแบบ <i>16S rRNA</i> กลุ่ม A |
|------------------|--------------------------------|
| 425              | 425                            |
| 350              | 350                            |
| 260              | 260                            |
| 225              | 225                            |
| 215              | 215                            |
| 135              | 135                            |
| 110              | 110                            |
| 85               | 85                             |
| จำนวนชนิดเอ็นเอ  | 8                              |
| ผลรวมจำนวนคู่เบส | 1805                           |

**ตารางที่ 20** ผลการตัด PCR product จากปลาอุกด้าน ด้วยเอนไซม์ *Tas I* ตามอำเภอที่เก็บตัวอย่าง และแสดงจำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละอำเภอ

| รูปแบบ          | สถานที่ |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |  |
|-----------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|--|
|                 | VR      | TS | RS | GT | MA | MS | PB | PS | TK | YC | รวม |  |
| <i>16S rRNA</i> |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |  |
| A               | 20      | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 200 |  |

#### 6.4 ผลการตัดยีน *16S rRNA* ด้วยเอนไซม์ *Msp I*

จากการตัดยีน *16S rRNA* ด้วยเอนไซม์ *Msp I* ในตัวอย่างปลาอุกด้านจำนวน 200 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองเป็นรูปแบบของตำแหน่งตัดที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 26) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่ม A และ B โดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 21 พบว่าปลาอุกด้านในกลุ่ม A จะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Msp I* ทั้งหมด 5 ชิ้น (ขนาด 605, 460, 440, 190 และ 150 คู่เบส) เมื่อรวมความยาวของแต่ละชิ้นจะให้ความยาวของยีน *16S rRNA* เท่ากับ 1,845 คู่เบส ส่วนกลุ่ม B มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Msp I* ทั้งหมด 4 ชิ้น (ขนาด 795, 460, 440 และ 150 คู่เบส) เมื่อรวมความยาวของแต่ละชิ้นจะให้ความยาวทั้งหมด 1,845 คู่เบส กลุ่ม A มีจำนวนสมาชิกมากที่สุด (197 ตัวอย่าง) ให้เป็นรูปแบบการตัดแบบปกติ ส่วนกลุ่ม B เป็นรูปแบบที่เกิดการกลายพันธุ์ออกไปจากกลุ่ม A 1 ครั้ง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันได้แก่ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 795 คู่เบส ที่กลุ่ม A ไม่มี แต่ในกลุ่ม A จะมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 605 กับ 190 คู่เบสแทน (ภาพที่ 26) ในกลุ่ม B ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 795 คู่เบสออกมาจากการรวมกันของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 605 กับ 190 คู่เบส โดยพบว่าเกิดจากการกลายพันธุ์ 1 ครั้งในชิ้น 795 คู่เบส ในกลุ่ม A มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดคือ 197 ตัวอย่าง มาจากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 10 จุดในแต่ละอำเภอของทั้ง 2 จังหวัด และกลุ่ม B มีจำนวนสมาชิก 3 ตัวอย่าง เป็นปลาอุกด้านจากอำเภอพิบูลมังสาหารจุดเดียวดังตารางที่ 22 สอดคล้องกับรายงานของ Chapman *et al.* (1994) ศึกษาปลาในجنัส *Alosa* โดยวิธี RFLP พบว่า เอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณเดียวกันได้รูปแบบแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง โดยขนาดรวมของชิ้นดีเอ็นเอที่มีรูปแบบแตกต่างกัน จะมีความยาวรวมเท่ากัน และที่พบ RFLP pattern แตกต่างกัน เพราะว่ามีเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง restriction site ทำให้มีจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นหรือลดลงและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอบางชิ้นใน RFLP pattern เปลี่ยนแปลงไป



ภาพที่ 26 ผลการทดลองการตัด PCR product ยีน *16S rDNA* โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp I*

ตารางที่ 21 ผลการตัด PCR product ของยีน *16S rDNA* โดยเอนไซม์ *Msp I*

| ขนาด(คู่เบส)      | รูปแบบ <i>16S rDNA</i> กลุ่ม A | รูปแบบ <i>16S rDNA</i> กลุ่ม B |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 795               | -                              | 795                            |
| 605               | 605                            | -                              |
| 460               | 460                            | 460                            |
| 440               | 440                            | 440                            |
| 190               | 190                            | -                              |
| 150               | 150                            | 150                            |
| จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ | 5                              | 4                              |
| ผลรวมจำนวนคู่เบส  | 1845                           | 1845                           |

**ตารางที่ 22** ผลการตัด PCR product จากปลาควักค้ำน ด้วยเอนไซม์ *Msp* I ตามอำเภอที่เก็บตัวอย่าง และแสดงจำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละอำเภอ

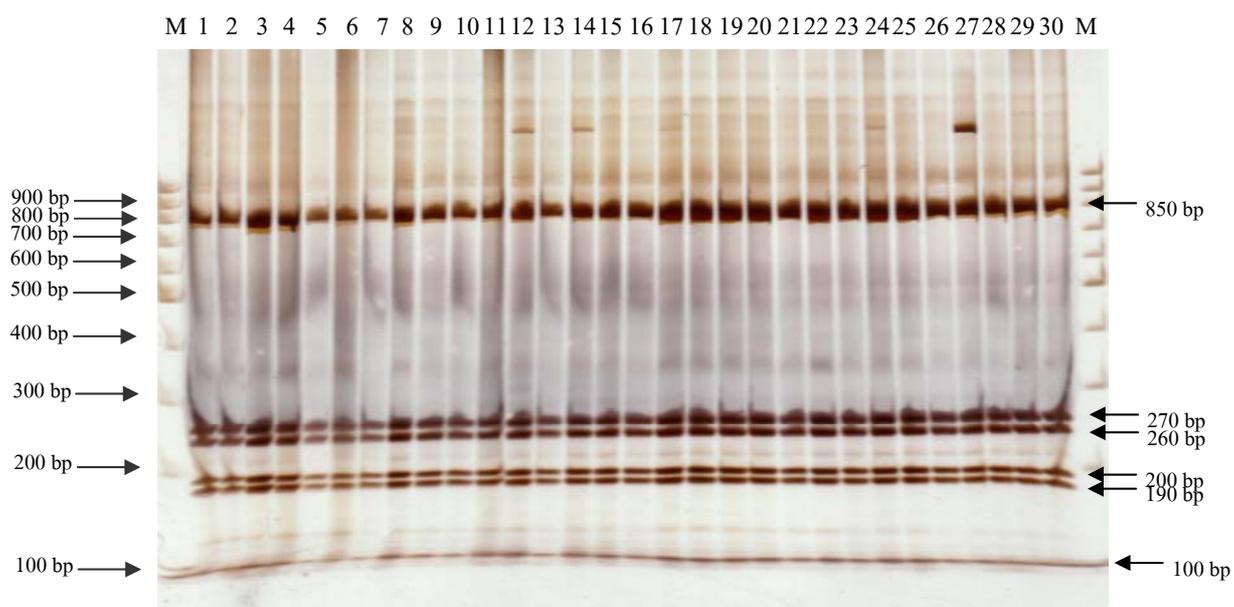
| รูปแบบ          | สถานที่ |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |  |
|-----------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|--|
|                 | VR      | TS | RS | GT | MA | MS | PB | PS | TK | YC | รวม |  |
| <i>16S rRNA</i> |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |  |
| A               | 20      | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 17 | 20 | 20 | 20 | 197 |  |
| B               | -       | -  | -  | -  | -  | -  | 3  | -  | -  | -  | 3   |  |

### 6.5 ผลการตัดยีน *16S rRNA* ด้วยเอนไซม์ *Rsa* I

จากการตัดยีน *16S rRNA* ด้วยเอนไซม์ *Rsa* I ในตัวอย่างปลาควักค้ำนจำนวน 200 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองเป็นรูปแบบของตำแหน่งตัดที่เหมือนกัน (ภาพที่ 27) โดยให้รูปแบบการตัดที่ได้เป็นกลุ่ม A ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 23 พบว่าปลาควักค้ำนในกลุ่ม A มีชิ้นดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa* I ทั้งหมด 6 ชิ้น (ขนาด 850, 270, 260, 200, 190 และ 100 คู่เบส) เมื่อรวมความยาวของแต่ละชิ้นจะให้ความยาวของยีน *16S rRNA* เท่ากับ 1,870 คู่เบส พบว่ากลุ่ม A มีจำนวนสมาชิก 200 ตัวอย่าง มาจากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 10 อำเภอของทั้ง 2 จังหวัด ดังตารางที่ 24 แสดงว่าเอนไซม์ *Rsa* I ไม่แสดงความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอ สอดคล้องกับรายงานของ Brunner *et al.* (1998) ศึกษาปลา Arctic char โดยวิธีการ PCR-RFLP พบว่ามีเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิดที่ตัดดีเอ็นเอได้รูปแบบของดีเอ็นเอเหมือนกัน เนื่องจากบริเวณที่ศึกษาพบการกลายพันธุ์น้อยทำให้ได้ RFLP pattern เหมือนกัน

ตารางที่ 23 ผลการตัด PCR product ของยีน *16S rRNA* โดยเอนไซม์ *Rsa* I

| ขนาด(คู่เบส)     | รูปแบบ <i>16S rRNA</i> กลุ่ม A |
|------------------|--------------------------------|
| 850              | 850                            |
| 270              | 270                            |
| 260              | 260                            |
| 200              | 200                            |
| 190              | 190                            |
| 100              | 100                            |
| จำนวนซันดีเอ็นเอ | 6                              |
| ผลรวมจำนวนคู่เบส | 1870                           |



ภาพที่ 27 ผลการทดลองการตัด PCR product ยีน *16S rRNA* โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa* I

**ตารางที่ 24** ผลการตัด PCR product จากปลาอุกด้าน ด้วยเอนไซม์ *Rsa* I ตามอำเภอที่เก็บตัวอย่าง และแสดงจำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละอำเภอ

| รูปแบบ          | สถานที่ |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |
|-----------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
|                 | VR      | TS | RS | GT | MA | MS | PB | PS | TK | YC | รวม |     |
| <i>16S rRNA</i> |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |
| A               | 20      | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20  | 200 |

จากการเปรียบเทียบรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 5 ชนิด ได้แก่เอนไซม์ *Dpn* II, *Hae* III, *Tas* I, *Msp* I และ *Rsa* I พบว่าการตัดด้วยเอนไซม์ *Dpn* II, *Tas* I และ *Rsa* I ได้รูปแบบชิ้นดีเอ็นเอออกมาเป็นรูปแบบเดียวทำให้ไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมจากการตัดด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดนี้ ส่วนการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III และ *Msp* I พบว่าเอนไซม์ *Hae* III สามารถตัดแล้วเกิดรูปแบบของกลุ่มออกมาได้เป็น 2 รูปแบบ ส่วนเอนไซม์ *Msp* I ตัดแล้วเกิดรูปแบบของกลุ่มเป็น 2 รูปแบบเช่นกัน โดยรูปแบบของกลุ่มที่แตกต่างกันจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III และ *Msp* I นั้นพบเฉพาะอำเภอพิบูลมังสาหารแห่งเดียว

#### 7. ผลการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรปลาอุกด้านใช้ข้อมูลจาก control region

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปลาอุกด้านจากอำเภอแต่ละอำเภอ ที่ทำการทดลองโดยวิธี RFLP แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแทนด้วยสัญลักษณ์ 1 และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏแทนด้วยสัญลักษณ์ 0 แล้วนำผลข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏและไม่ปรากฏหลังการตัดด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด ในบริเวณ control region มาเรียงต่อกันในแต่ละ haplotype เพื่อมาคำนวณ โดยโปรแกรม Arlequin v.3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) วิเคราะห์ nucleotide diversity, AMOVA,  $F_{ST}$  และ nucleotide divergence โดยใช้ค่า nucleotide divergence ที่ได้ในการสร้าง population phylogenetic tree จากวิธี Neighbour-joining โดยใช้โปรแกรม Neighbour ใน Phylip (Felsenstein, 2002)

เมื่อนำตัวอักษรที่แทนรูปแบบการตัดบริเวณ control region จากเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดของปลาแต่ละตัวมาจัดเรียง เพื่อแยกเป็นกลุ่ม haplotype โดยให้อักษรตัวแรกเป็นรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ *Tas* I อักษรตัวที่สองเป็นรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ *Tru1* I อักษรตัวที่สามเป็นรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa* I และอักษรตัวที่สี่เป็นรูปแบบของการตัดด้วย *Hin1* II เมื่อจัดเรียงเป็นกลุ่มจะสามารถแบ่งปลาอุกด้าน ทั้ง 200 ตัวได้เป็น 4 haplotype (ตารางที่ 25) พบว่าทุก

อำเภอมี haplotype AAAA และ AAAB จึงเป็น haplotype หลักในผลการศึกษา ส่วน haplotype BAAA ไม่พบในอำเภวารินชำราบ และกันทรารมย์ แต่พบอำเภอเมืองอุบลราชธานีและพิบูลมังสาหารมี haplotype BAAA เป็นกลุ่มสมาชิกหลักแตกต่างจากอำเภออื่นๆ ส่วน haplotype BAAB พบเพียง 3 อำเภอได้แก่ อำเภวารินชำราบ ตาลชุม และตระการพืชผล ค่า nucleotide diversity ในประชากรปลาชุกค้ำที่ศึกษามีค่าตั้งแต่ 0.0460 ถึง 0.1058 โดยอำเภอเมืองศรีสะเกษ จะมีค่า nucleotide diversity น้อยสุดเมื่อเทียบกับอำเภออื่นแสดงว่ามีความแปรปรวนภายในประชากรน้อยสุด ส่วนอำเภอตระการพืชผลจะมีค่า nucleotide diversity มากสุดเมื่อเทียบกับอำเภออื่นแสดงว่ามีความแปรปรวนภายในประชากรมากที่สุด (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 25 แสดง haplotype ชนิดต่างๆ จำนวน haplotype ต่าง ๆ ที่พบในแต่ละอำเภอ ( $N_{hap}$ ) และค่า nucleotide diversity ( $\pi_n$ ) ของปลาชุกค้ำในแต่ละอำเภอ ( $N$  คือจำนวนตัวอย่างปลาชุกค้ำที่ศึกษา)

|       | haplotype |      |      |      | $N$ | $N_{hap}$ | $\pi_n$         |
|-------|-----------|------|------|------|-----|-----------|-----------------|
|       | AAAA      | AAAB | BAAA | BAAB |     |           |                 |
| VR    | 5         | 9    |      | 6    | 20  | 3         | 0.0881 ± 0.0602 |
| TS    | 10        | 7    | 2    | 1    | 20  | 4         | 0.0814 ± 0.0567 |
| RS    | 5         | 10   | 5    |      | 20  | 3         | 0.0969 ± 0.0648 |
| GT    | 12        | 8    |      |      | 20  | 2         | 0.0532 ± 0.0416 |
| MA    | 1         | 3    | 16   |      | 20  | 3         | 0.0637 ± 0.0473 |
| MS    | 15        | 1    | 4    |      | 20  | 3         | 0.0460 ± 0.0376 |
| PB    | 7         | 1    | 12   |      | 20  | 3         | 0.0637 ± 0.0473 |
| PS    | 15        | 2    | 3    |      | 20  | 3         | 0.0482 ± 0.0388 |
| TK    | 7         | 6    | 3    | 4    | 20  | 4         | 0.1058 ± 0.0694 |
| YC    | 11        | 5    | 4    |      | 20  | 3         | 0.0770 ± 0.0544 |
| Total | 88        | 52   | 49   | 11   |     |           |                 |

ตารางที่ 26 แสดงการวิเคราะห์ AMOVA จากข้อมูลบริเวณ control region ของปลาควักด้าน

| Source of variation | d.f.                                                                      | Sum of squares | Variance components | Percentage of variation |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------|-------------------------|
| Among group         | 1                                                                         | 9.050          | 0.0523              | 5.83                    |
| Among populations   | 8                                                                         | 30.560         | 0.1566              | 17.46                   |
| Within populations  | 190                                                                       | 130.700        | 0.6879              | 76.71                   |
| Total               | 199                                                                       | 170.310        | 0.8968              |                         |
| Fixation Index      | $F_{ST} : 0.2329$                                                         |                |                     |                         |
|                     | $F_{ST} P(\text{rand. value} \leq \text{obs. value}) = 0.0000 \pm 0.0000$ |                |                     |                         |

จากการใช้ข้อมูล RFLP ไปวิเคราะห์ analysis of molecular variance (AMOVA) ผลแสดงไว้ตารางที่ 26 พบว่าความแปรปรวนที่วิเคราะห์ได้จากข้อมูลบริเวณ control region ของปลาควักด้าน มีความแปรปรวนระหว่างกลุ่มคือระหว่างจังหวัดศรีสะเกษกับจังหวัดอุบลราชธานีเท่ากับ 5.83 เปอร์เซ็นต์ ความแปรปรวนระหว่างประชากร (อำเภอ) เท่ากับ 17.46 เปอร์เซ็นต์ และความแปรปรวนภายในประชากร (อำเภอ) เท่ากับ 76.71 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบทางสถิติที่ระดับ 0.05 พบว่าความแตกต่างระหว่างประชากรไม่มีนัยสำคัญ และความแปรปรวนภายในประชากรมีเปอร์เซ็นต์มากที่สุด ซึ่งจากการศึกษาของ Hansen and Mensberg (1998) ศึกษาปลา *Salmo trutta* ในแม่น้ำ 4 สายประกอบด้วยแม่น้ำ Odder, Karup, Gudena และ Bornholm ในประเทศเดนมาร์ก โดยวิธี PCR - RFLP ในยีน *ND1* และ *ND5/6* ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ผลจาก AMOVA พบว่าความแปรปรวนระหว่างแม่น้ำมีค่าเท่ากับ 17.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความแปรปรวนภายในแม่น้ำเดียวกันมีค่าเท่ากับ 13.3 เปอร์เซ็นต์ และความแปรปรวนภายในประชากรมีค่าเท่ากับ 69.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอธิบายได้ว่าปลา *Salmo trutta* ที่ศึกษามีการแพร่กระจายประชากรภายในแม่น้ำสายเดียวกัน เนื่องจากลักษณะภูมิศาสตร์ของแม่น้ำแต่ละสายไม่เชื่อมต่อกัน จึงไม่มีการถ่ายเทยีนระหว่างแม่น้ำคนละสายที่ศึกษา ดังนั้นจากผล AMOVA ของประชากรปลาควักด้าน ซึ่งทำการศึกษาภายในแม่น้ำมูลแม่น้ำเดียว พบความแปรปรวนภายในประชากรมาก ความแปรปรวนระหว่างประชากรหรือแหล่งเก็บตัวอย่างน้อย แสดงว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปลาควักด้านในกลุ่มน้ำมูลของจังหวัดศรีสะเกษกับอุบลราชธานีมีการกระจายค่อนข้างสม่ำเสมอ

ตารางที่ 27 ค่า  $F_{ST}$  และ  $F_{ST}$  P values ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร จากบริเวณ control region ในประชากรปลาอุกด้านทั้ง 10 อำเภอ

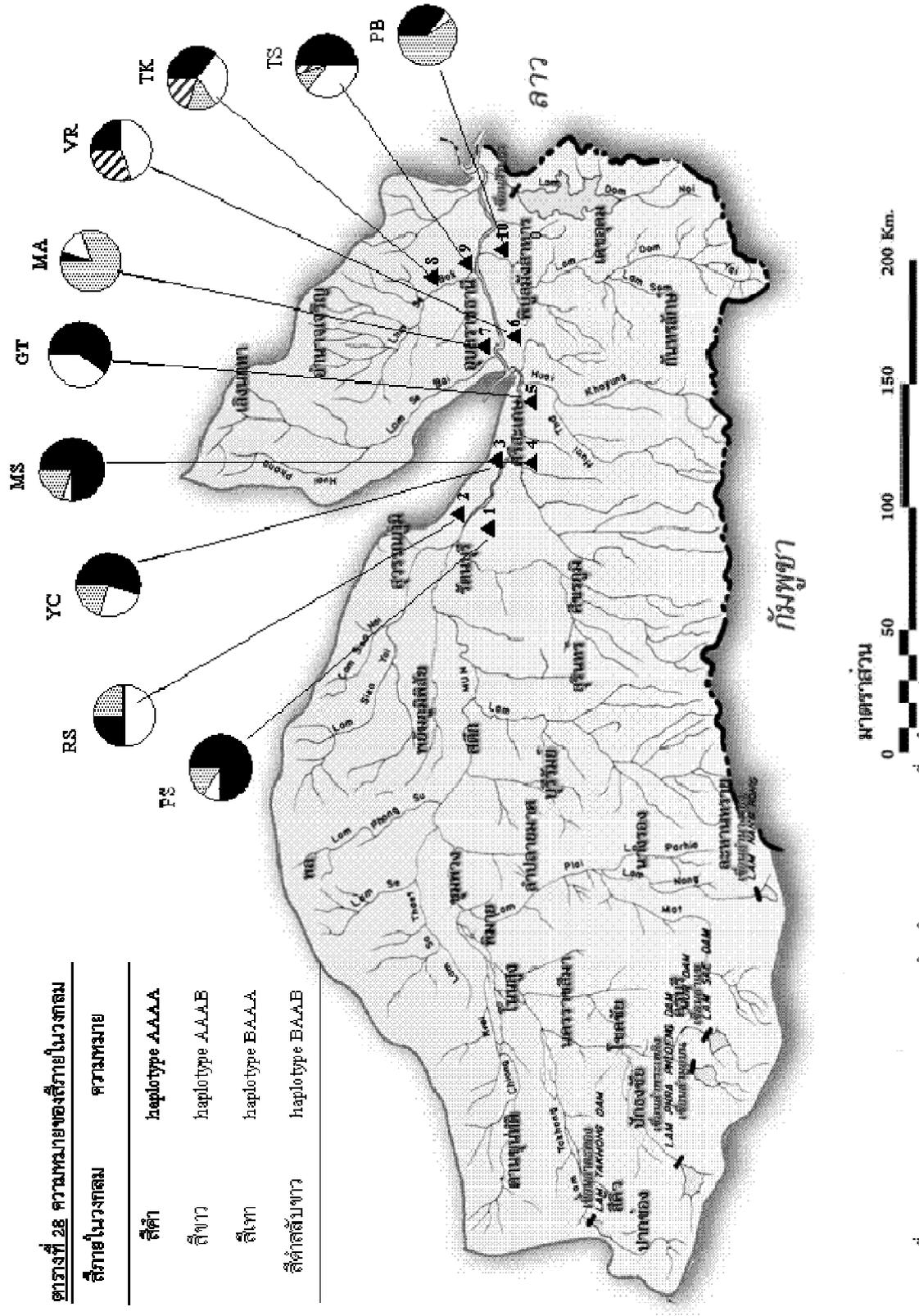
|    | VR      | TS      | RS      | GT      | MA      | MS      | PB      | PS      | TK      | YC      |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| VR |         | 0.1151  | 0.0233  | 0.2105  | 0.4432  | 0.4237  | 0.4300  | 0.3893  | 0.0202  | 0.2197  |
| TS | 0.0540  |         | -0.0271 | -0.0150 | 0.3952  | 0.1353  | 0.2965  | 0.0877  | 0.0062  | -0.0171 |
| RS | 0.3513  | 0.7207  |         | 0.0491  | 0.3364  | 0.2012  | 0.2732  | 0.1643  | -0.0412 | 0.0279  |
| GT | 0.0180* | 0.4595  | 0.1531  |         | 0.5486  | 0.2278  | 0.4502  | 0.1551  | 0.1115  | 0.0486  |
| MA | 0.0000* | 0.0000* | 0.0000* | 0.0000* |         | 0.3976  | 0.0316  | 0.4284  | 0.2612  | 0.3349  |
| MS | 0.0000* | 0.0631  | 0.0000* | 0.0000* | 0.0000* |         | 0.2045  | -0.0404 | 0.2076  | 0.0181  |
| PB | 0.0000* | 0.0000* | 0.0000* | 0.0000* | 0.2432  | 0.0000* |         | 0.2513  | 0.2182  | 0.1995  |
| PS | 0.0000* | 0.0540  | 0.0180* | 0.0180* | 0.0000* | 0.9910  | 0.0000* |         | 0.1826  | -0.0080 |
| TK | 0.3243  | 0.4054  | 0.9099  | 0.0270* | 0.0000* | 0.0000* | 0.0000* | 0.0090* |         | 0.0457  |
| YC | 0.0090* | 0.7387  | 0.3063  | 0.2522  | 0.0000* | 0.3604  | 0.0090* | 0.6306  | 0.1802  |         |

สัญลักษณ์\*คือระหว่างอำเภอที่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ค่าด้านบนเส้นทแยงมุมคือค่า  $F_{ST}$  ค่าด้านล่างเส้นทแยงมุมคือค่า  $F_{ST}$  P values

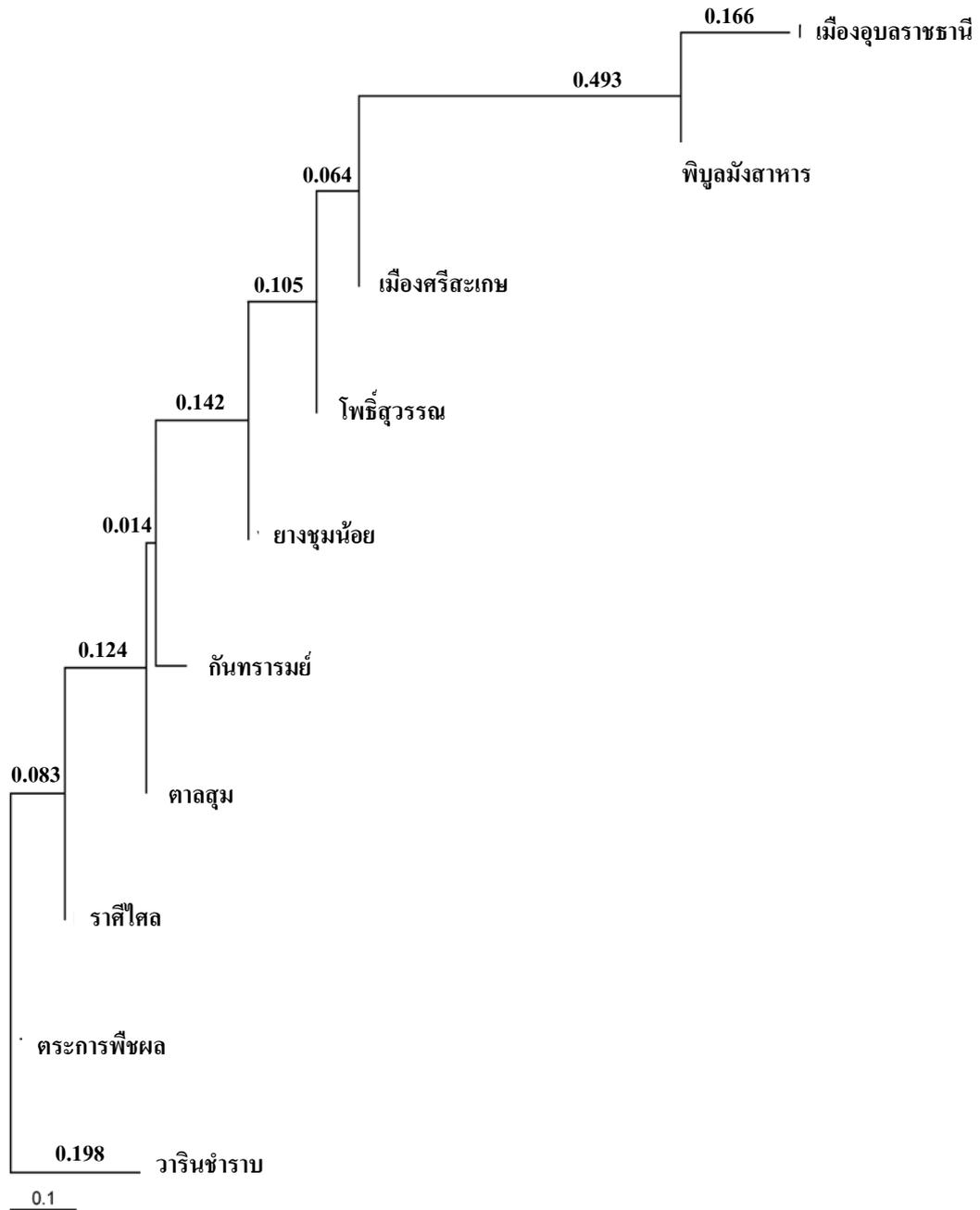
ตารางที่ 27 ด้านบนเส้นทแยงมุมเป็นค่า  $F_{ST}$  ที่คำนวณจากบริเวณ control region แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร จากค่า  $F_{ST}$  จะมี 5 อำเภอที่มีค่า  $F_{ST}$  ต่ำ แสดงให้เห็นว่าอำเภอเหล่านี้มีระยะห่างทางพันธุกรรมค่อนข้างใกล้ชิดกัน ได้แก่ อำเภอราศีไสล ขางชุมน้อย กันทรารมย์ ตระการพืชผล และตาลชุม แต่อำเภอเมืองอุบลราชธานี กับพิบูลมังสาหาร จะมีค่า  $F_{ST}$  สูงแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่าอำเภออื่นเมื่อเปรียบเทียบกัน เนื่องจาก 2 อำเภอนี้พบ haplotype BAAA เป็นกลุ่มสมาชิกหลัก แตกต่างจากอำเภออื่น ที่จะพบ haplotype AAAA หรือ haplotype AAAB เป็นหลัก ดังตารางที่ 25 ทำให้มีค่า  $F_{ST}$  แตกต่างไปจากอำเภออื่น และด้านล่างเส้นทแยงมุมของตารางที่ 27 เป็นค่า  $F_{ST}$  P values จากการทดสอบทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ระหว่างอำเภอที่ไม่มีดอกจันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างอำเภอที่มีดอกจันแสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกันสูง การวิเคราะห์ด้วยค่า  $F_{ST}$  ทำให้ทราบว่าอำเภอใดมีความใกล้ชิดกันหรือมีความห่างกันทางพันธุกรรม

ตารางที่ 28 ความหมายของสีภายในวงกลม

| สีภายในวงกลม | ความหมาย          |
|--------------|-------------------|
| สีฟ้า        | haplotype A.A.A.A |
| สีฟ้า        | haplotype A.A.A.B |
| สีเทา        | haplotype B.A.A.A |
| สีดำ         | haplotype B.A.A.B |



ภาพที่ 28 แสดงภาพกระจายของ haplotype ในบริเวณ control region ที่พบใน 10 อำเภอ



ภาพที่ 29 population phylogenetic tree วิธี Neighbour - joining สร้างจากค่า nucleotide divergence ที่ได้จากข้อมูล control region

ภาพที่ 28 แสดงการกระจายของ haplotype ที่พบใน 10 อำเภอที่ศึกษา จะพบ haplotype AAAA และ AAAB ทั้ง 10 อำเภอ ส่วน haplotype BAAA พบใน 8 อำเภอที่ศึกษา โดยอำเภอเมืองอุบลราชธานี กับพิบูลมังสาหาร จะพบ haplotype BAAA เป็นกลุ่มสมาชิกหลักแตกต่างจากอำเภออื่นๆ ที่จะพบ haplotype AAAA หรือ AAAB เป็นหลัก ส่วน haplotype BAAB จะพบ 3 อำเภอที่อยู่เฉพาะในจังหวัดอุบลราชธานี ได้แก่อำเภอวารินชำราบ ตาลชุม และตระการพืชผล และจากการศึกษาของ Verspoor *et al.* (2002) ศึกษาปลา *Salmo salar* บริเวณตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศแคนาดา โดยวิธี RFLP และ sequencing ยีน *ND1* ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ haplotype ที่พบจะมีรูปแบบการกระจายออกไปตามลักษณะภูมิประเทศในบริเวณที่ศึกษา โดยปลา *Salmo salar* ที่มาจากต่างแม่น้ำกันจะมี haplotype ที่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้น โครงสร้างประชากรจึงขึ้นกับสภาพแวดล้อมบริเวณที่ศึกษาในที่นี้ลักษณะภูมิศาสตร์ของแม่น้ำจะมีความสำคัญ โดยภายในแม่น้ำเดียวกันจะมีการแพร่กระจายประชากรถึงกัน ดังนั้นในการศึกษาโครงสร้างประชากรปลาควักด้าน haplotype ที่พบมีรูปแบบกระจายไปตามอำเภอที่ศึกษา เนื่องจากในฤดูฝนระดับน้ำของแม่น้ำมูลจะสูงขึ้น ทำให้เกิดน้ำท่วมในบริเวณลุ่มน้ำมูล ปลาควักด้านจึงมีการแพร่กระจายไปยังแหล่งน้ำใกล้เคียงที่น้ำท่วมถึงได้ โดยระยะทางระหว่างจุดเก็บตัวอย่างแต่ละจุดไปยังจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ใกล้เคียงกันจะมีระยะทางห่างกันประมาณ 20 กิโลเมตร โดยจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ใกล้กันที่สุดมีระยะทางห่างกันประมาณ 10 กิโลเมตร (ระหว่างอำเภอตาลชุมกับอำเภอพิบูลมังสาหาร) ส่วนระยะห่างระหว่างจุดแรกกับจุดสุดท้ายมีระยะทางประมาณ 120 กิโลเมตร (ระหว่างอำเภอโพธิ์สุวรรณกับอำเภอพิบูลมังสาหาร)

ความสัมพันธ์ทาง phylogenetic เป็นการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตในที่นี้อาศัยข้อมูลจากการวิเคราะห์ RFLP ศึกษาประชากรปลาควักด้าน โดยความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตจะนำเสนอในรูปแบบของแผนภาพต้นไม้เรียกว่า phylogenetic tree รูปแบบของกิ่งที่พบใน phylogenetic tree จะเรียกว่าสัณฐาน แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตตัวอย่างที่ศึกษา (Nei and Kumar, 2000)

เมื่อสร้าง population phylogenetic tree จากค่า nucleotide divergence (ตารางที่ 29) โดยใช้ข้อมูล control region ด้วยวิธี Neighbour - joining (ภาพที่ 29) ค่า nucleotide divergence มีค่าค่อนข้างสูงโดยมีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ 0.014 ถึง 0.493 โดยเฉพาะอำเภอเมืองอุบลราชธานี และพิบูลมังสาหาร มีค่า nucleotide divergence ต่างจากอีก 8 อำเภอเท่ากับ 0.493 (ภาพที่ 29) แสดงว่าประชากรอำเภอเมืองอุบลราชธานี และพิบูลมังสาหารแยกออกมาจากอีก 8 อำเภอที่ศึกษา ซึ่งอีก 8 อำเภอจะมี

ระยะห่างทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากกว่า 2 อำเภอดังกล่าว แต่อำเภวารินชำราบจะมีค่าแยกมาจาก 9 อำเภอเท่ากับ 0.198 ซึ่งค่าค่อนข้างสูง จึงแยกออกมาเป็นอีกประชากรหนึ่ง และจากข้อมูลภาพถ่ายดาวเทียมแสดงให้เห็นว่าลักษณะภูมิประเทศบริเวณจุดเก็บตัวอย่างใน อำเภอเมือง อุบลราชธานี พิบูลมังสาหาร และอำเภวารินชำราบ เป็นพื้นที่ดอนทำให้น้ำท่วมถึงได้ยาก จึงเป็นผลทำให้ประชากรใน 3 อำเภอดังกล่าว มีระยะห่างทางพันธุกรรมแยกออกมาต่างจากอำเภออื่นๆ ดังกล่าว

ตารางที่ 29 ค่า nucleotide divergence และค่า nucleotide diversity (เส้นทแยงมุม) ที่ได้จากข้อมูล control region

|    | VR    | TS     | RS     | GT    | MA    | MS     | PB    | PS     | TK    | YC    |
|----|-------|--------|--------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|
| VR | 0.088 |        |        |       |       |        |       |        |       |       |
| TS | 0.209 | 0.081  |        |       |       |        |       |        |       |       |
| RS | 0.042 | -0.045 | 0.097  |       |       |        |       |        |       |       |
| GT | 0.358 | -0.019 | 0.074  | 0.053 |       |        |       |        |       |       |
| MA | 1.148 | 0.901  | 0.774  | 1.349 | 0.064 |        |       |        |       |       |
| MS | 0.936 | 0.189  | 0.342  | 0.278 | 0.688 | 0.046  |       |        |       |       |
| PB | 1.088 | 0.581  | 0.574  | 0.909 | 0.039 | 0.268  | 0.064 |        |       |       |
| PS | 0.825 | 0.118  | 0.271  | 0.177 | 0.797 | -0.035 | 0.357 | 0.048  |       |       |
| TK | 0.038 | 0.011  | -0.076 | 0.189 | 0.569 | 0.378  | 0.449 | 0.327  | 0.106 |       |
| YC | 0.442 | -0.025 | 0.047  | 0.063 | 0.673 | 0.021  | 0.333 | -0.009 | 0.083 | 0.077 |

จากการวิเคราะห์ RFLP บริเวณ control region ได้คัดเลือกเอนไซม์ที่ใช้ทั้ง 4 ชนิด จากการทดสอบตัดกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ control region ของปลาบึกในคอมพิวเตอร์ แล้วพบตำแหน่งตัดหลายตำแหน่ง เมื่อนำเอนไซม์ 4 ชนิดที่คัดเลือกแล้วมาตัดบริเวณ control region ในปลาบึกด้านพบว่าเอนไซม์ *Tas* I กับเอนไซม์ *Hin*1 II ตัดแล้วแสดงรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้ในประชากรที่ศึกษา แต่เอนไซม์ *Tru*1 I กับเอนไซม์ *Rsa* I ตัดแล้วไม่พบรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งผลการทดลองจากการวิเคราะห์ RFLP ใน control region พบ haplotype ทั้งหมด 4 haplotype และพบแต่ละ haplotype กระจายอยู่ในอำเภอที่ศึกษา ซึ่งจากรายงานของ Meyer (1993) พบว่าไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีอัตราการวิวัฒนาการรวดเร็ว เนื่องจากมีความถี่ของการกลายพันธุ์สูง โดยพบการ

กลายพันธุ์มีความถี่สูงในบริเวณ control region ส่วนตำแหน่งอื่น ๆ ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ จะเกิดการกลายพันธุ์ที่มีความถี่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับบริเวณ control region เพราะฉะนั้น control region จึงนิยมใช้ในการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรภายในชนิดเดียวกัน ซึ่งจากการศึกษา โครงสร้างประชากรปลาควักด้าน ผลจากการวิเคราะห์ RFLP ในบริเวณ control region พบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอจากปลาควักด้านที่ศึกษา

ตารางที่ 30 ขนาดและจำนวนของซันดีเอ็นเอในบริเวณ control region ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อหาความแปรปรวนที่เกิดกับซันดีเอ็นเอ

| เอนไซม์ตัดจำเพาะ | รูปแบบซันดีเอ็นเอ | ขนาด (bp)           |
|------------------|-------------------|---------------------|
| <i>Tas</i> I     | A                 | 425 230 140 90 80   |
|                  | B                 | 425 230 90 80 70    |
| <i>Tru</i> I     | A                 | 188 160 150 147 120 |
| <i>Rsa</i> I     | A                 | 350 275 175 110     |
| <i>Hin</i> I II  | A                 | 530 290 140         |
|                  | B                 | 530 310 140         |

#### 8. ผลการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรปลาควักด้านใช้ข้อมูลจาก *16S rRNA*

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปลาควักด้านจากอำเภอแต่ละอำเภอ ที่ทำการทดลองโดยวิธี RFLP แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแทนด้วยสัญลักษณ์ 1 และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏแทนด้วยสัญลักษณ์ 0 แล้วนำผลข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏและไม่ปรากฏหลังการตัดด้วยเอนไซม์ 5 ชนิด ในยีน *16S rRNA* มาเรียงต่อกันในแต่ละ haplotype คำนวณโดยโปรแกรม Arlequin v 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) วิเคราะห์ nucleotide diversity, AMOVA,  $F_{ST}$  และ nucleotide divergence โดยใช้ค่า nucleotide divergence ที่ได้ในการสร้าง population phylogenetic tree จากวิธี Neighbour - joining โดยใช้โปรแกรม Neighbour ใน Phylip (Felsenstein, 2002)

ตารางที่ 31 แสดง haplotype ชนิดต่าง ๆ จำนวน haplotype ต่างๆ ที่พบในแต่ละอำเภอ ( $N_{hap}$ ) และค่า nucleotide diversity ( $\pi_n$ ) ของปลาอุกค้ำในในแต่ละอำเภอ ( $N$  คือจำนวนตัวอย่างปลาอุกค้ำที่ศึกษา)

|       | haplotype |       | N  | $N_{hap}$ | $\pi_n$         |
|-------|-----------|-------|----|-----------|-----------------|
|       | AAAAA     | ABABA |    |           |                 |
| VR    | 20        |       | 20 | 1         | 0.0000 ± 0.0000 |
| TS    | 20        |       | 20 | 1         | 0.0000 ± 0.0000 |
| RS    | 20        |       | 20 | 1         | 0.0000 ± 0.0000 |
| GT    | 20        |       | 20 | 1         | 0.0000 ± 0.0000 |
| MA    | 20        |       | 20 | 1         | 0.0000 ± 0.0000 |
| MS    | 20        |       | 20 | 1         | 0.0000 ± 0.0000 |
| PB    | 17        | 3     | 20 | 2         | 0.0435 ± 0.0300 |
| PS    | 20        |       | 20 | 1         | 0.0000 ± 0.0000 |
| TK    | 20        |       | 20 | 1         | 0.0000 ± 0.0000 |
| YC    | 20        |       | 20 | 1         | 0.0000 ± 0.0000 |
| Total | 197       | 3     |    |           |                 |

นำตัวอักษรที่แทนรูปแบบการตัดยีน *16S rRNA* จากเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิดของปลาแต่ละตัวมาจัดเรียงเป็น haplotype โดยให้อักษรตัวแรกเป็นรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ *Dpn II* อักษรตัวที่สองเป็นรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae III* อักษรตัวที่สามเป็นรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ *Tas I* อักษรตัวที่สี่เป็นรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ *Msp I* และอักษรตัวที่ห้าเป็นรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa I* เมื่อจัดเรียงเป็นกลุ่มจะสามารถแบ่งปลาอุกค้ำทั้ง 200 ตัวได้เป็น 2 haplotype (ตารางที่ 31) พบ haplotype AAAAA เป็น haplotype หลักที่พบในทุกอำเภอ และมี 9 อำเภอที่มี haplotype AAAAA แบบเดียว ยกเว้นอำเภอพิบูลมังสาหารที่พบ haplotype ABABA ค่า nucleotide diversity ในประชากรปลาอุกค้ำที่ศึกษามีค่าตั้งแต่ 0.0000 ถึง 0.0435 (ตารางที่ 31) พบว่าแต่ละอำเภอมี nucleotide diversity เท่ากับ 0.0000 ยกเว้นอำเภอพิบูลมังสาหารที่มีค่าเท่ากับ 0.0435 เนื่องจากข้อมูลของยีน *16S rRNA* จากอำเภอพิบูลมังสาหาร พบ haplotype รูปแบบเฉพาะที่ไม่พบในอำเภออื่นที่ศึกษา จึงแสดงความแปรปรวนภายในประชากร และจากข้อมูลภาพถ่ายดาวเทียมพบว่าจุดเก็บตัวอย่างในอำเภอพิบูลมังสาหารเป็นพื้นที่ดอน ทำให้ในฤดูฝนเกิดน้ำท่วมถึง

บริเวณดังกล่าวได้ยาก จึงทำให้ปลาคุกด้านในบริเวณนี้ มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมแตกต่างจากอำเภออื่น

ตารางที่ 32 แสดงการวิเคราะห์ AMOVA จากข้อมูลบริเวณ *16S rRNA* ของปลาคุกด้าน

| Source of variation | d.f.                                                                       | Sum of squares | Variance components | Percentage of variation |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------|-------------------------|
| Among group         | 1                                                                          | 0.270          | 0.0000              | 0.00                    |
| Among populations   | 8                                                                          | 2.160          | 0.0095              | 10.53                   |
| Within populations  | 190                                                                        | 15.300         | 0.0805              | 89.47                   |
| Total               | 199                                                                        | 17.730         | 0.0900              |                         |
| Fixation Index      | $F_{ST} : 0.1053$                                                          |                |                     |                         |
|                     | $F_{ST} P (\text{rand. value} \leq \text{obs. value}) = 0.0068 \pm 0.0023$ |                |                     |                         |

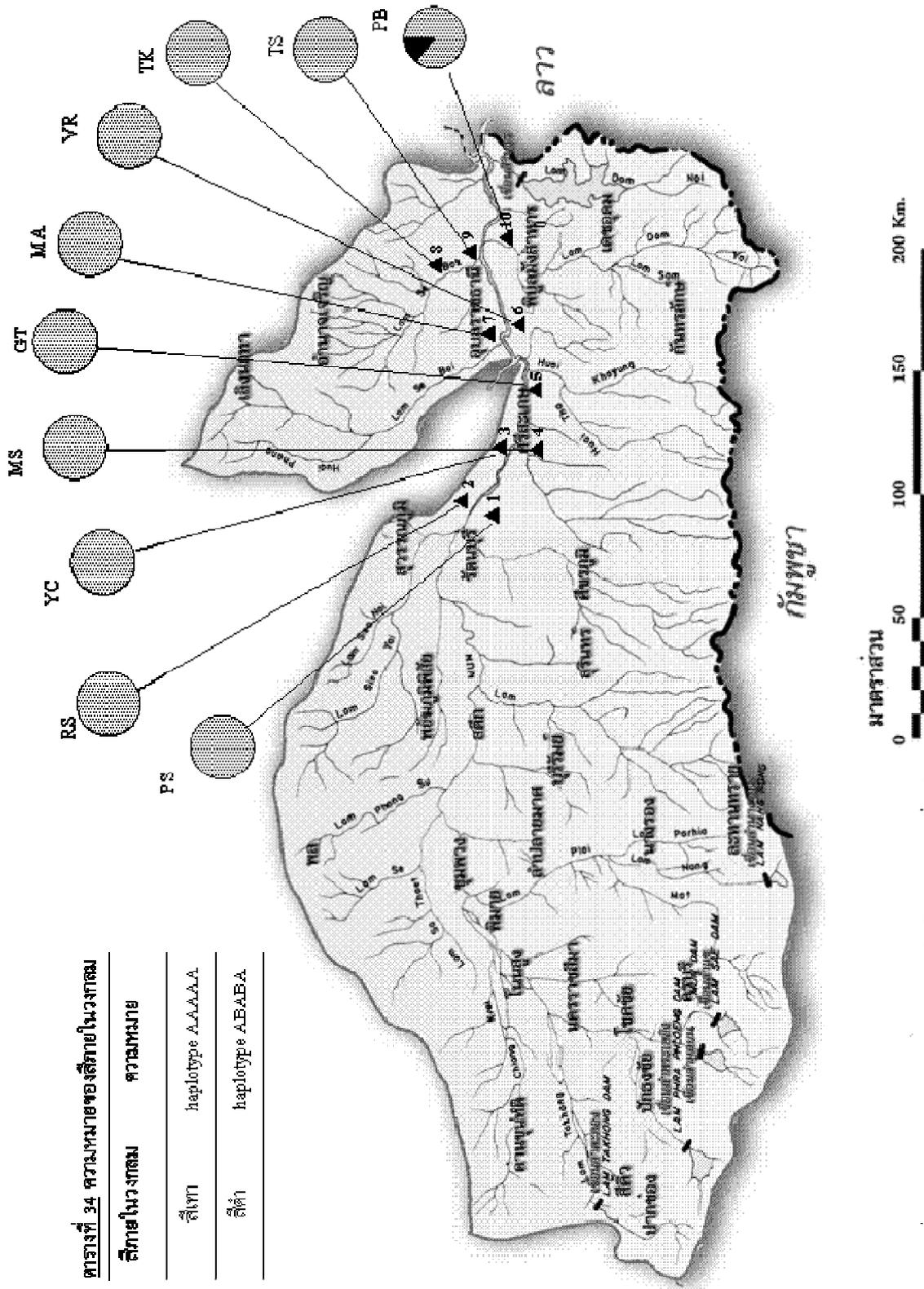
จากการใช้ข้อมูล RFLP ไปวิเคราะห์ AMOVA ผลแสดงไว้ตารางที่ 32 พบว่าความแปรปรวนที่วิเคราะห์ได้จากข้อมูลยีน *16S rRNA* ของปลาคุกด้าน มีความแปรปรวนระหว่างกลุ่มคือระหว่างจังหวัดศรีสะเกษกับจังหวัดอุบลราชธานีเท่ากับ 0.00 เปอร์เซ็นต์ ความแปรปรวนระหว่างประชากร (อำเภอ) เท่ากับ 10.53 เปอร์เซ็นต์ และความแปรปรวนภายในประชากร (อำเภอ) เท่ากับ 89.47 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบทางสถิติที่ระดับ 0.05 พบว่าความแตกต่างระหว่างประชากรไม่มีนัยสำคัญ และความแปรปรวนภายในประชากรมีเปอร์เซ็นต์มากที่สุด โดยจากการศึกษาของ Aboim *et al.* (2005) ศึกษาปลา *Helicolenus dactylopterus* ในมหาสมุทรแอตแลนติก โดยวิธี sequencing บริเวณ control region และยีน *cytochrome b* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ผลการวิเคราะห์ AMOVA จากข้อมูล control region พบความแปรปรวนระหว่างกลุ่มเท่ากับ 39.86 เปอร์เซ็นต์ และความแปรปรวนภายในประชากรเท่ากับ 60.13 เปอร์เซ็นต์ และจากข้อมูลยีน *cytochrome b* พบความแปรปรวนระหว่างกลุ่มเท่ากับ 42.52 เปอร์เซ็นต์ และความแปรปรวนภายในประชากรเท่ากับ 57.76 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงว่าประชากรส่วนน้อยเท่านั้นที่ส่งผลต่อประชากรเฉพาะถิ่นทั้งนี้เพราะโดยอุปนิสัยแล้วปลาชนิดนี้ไม่มีการย้ายถิ่นแต่อาจเกิดจากการเคลื่อนย้ายของตัวอ่อน ดังนั้นผล AMOVA ของประชากรปลาคุกด้าน ซึ่งทำการศึกษาภายในแม่น้ำมูลสายเดียว ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจะขึ้นกับประชากรเริ่มต้นของปลาคุกด้านมีความแปรปรวนสม่ำเสมอแล้วกระจายไปยังส่วนต่าง ๆ หรือว่ามีการผสมผสานของประชากรปลาคุกด้านในกลุ่มน้ำมูลที่ศึกษา ดังนั้นจึงพบความแปรปรวนระหว่างประชากรน้อย

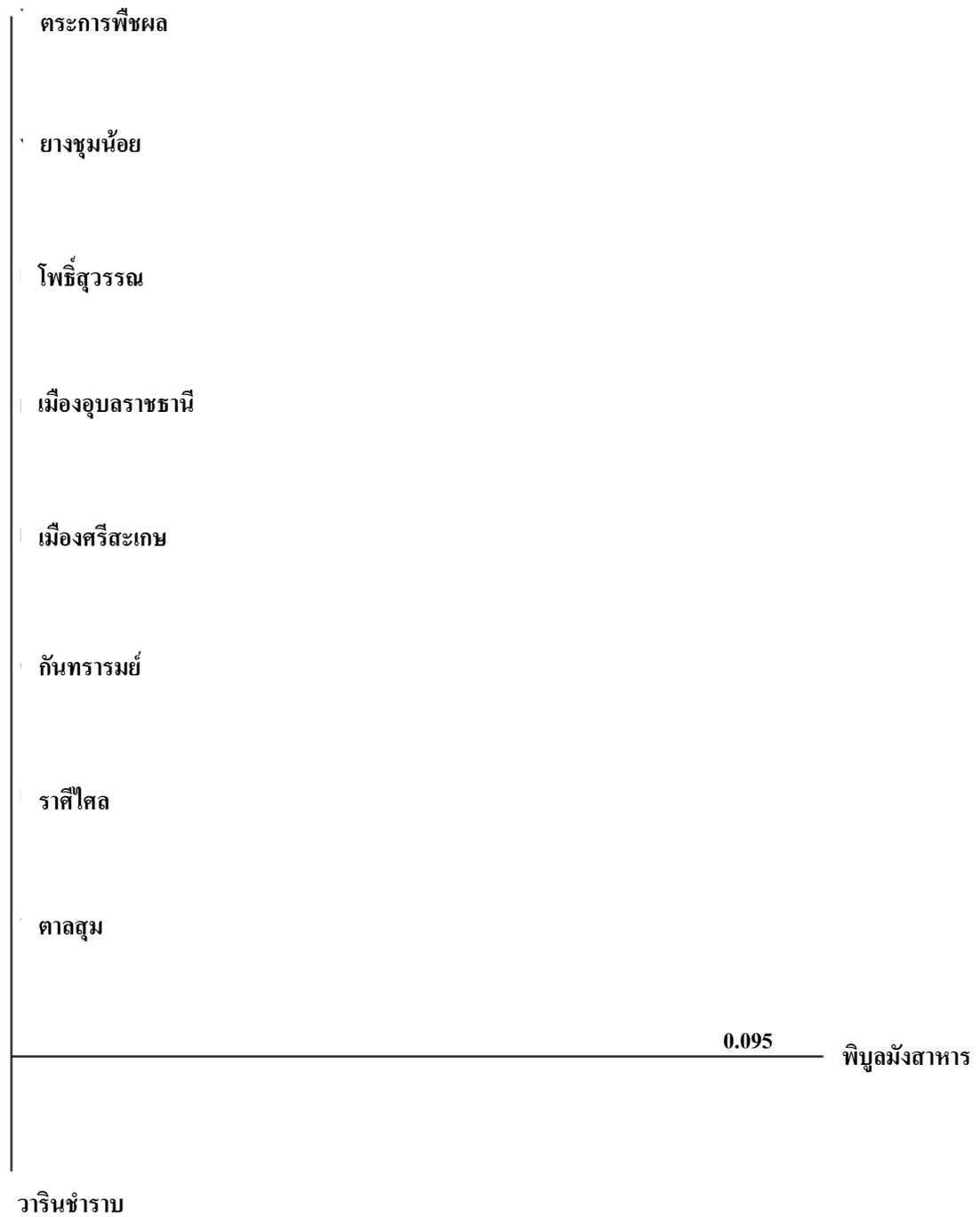
ตารางที่ 33 ด้านบนเส้นทแยงมุม เป็นค่า  $F_{ST}$  ที่คำนวณจากยีน *16S rRNA* แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร จากค่า  $F_{ST}$  พบว่ามี 9 อำเภอที่มีค่า  $F_{ST}$  เท่ากับ 0.0000 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างอำเภอดังกล่าว แต่อำเภอพิบูลมังสาหารเมื่อเทียบกับอีก 9 อำเภอ จะมีค่า  $F_{ST}$  เท่ากับ 0.1053 เนื่องจากมี haplotype ABABA ดังตารางที่ 31 พบเฉพาะอำเภอพิบูลมังสาหารในปลาตัวอย่าง 3 ตัว ทำให้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมเมื่อเทียบกับอำเภออื่น และด้านล่างเส้นทแยงมุมของตารางที่ 33 เป็นค่า  $F_{ST}$  P values จากการทดสอบทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ระหว่างอำเภอที่ไม่มีดอกจันที่แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนระหว่างอำเภอที่มีดอกจันที่แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งข้อมูลจากยีน *16S rRNA* ไม่พบความแตกต่างระหว่างประชากรอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 33 ค่า  $F_{ST}$  และ  $F_{ST}$  P values ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากยีน *16S rRNA* ในประชากรปลาคูกด้านทั้ง 10 อำเภอ

|    | VR     | TS     | RS     | GT     | MA     | MS     | PB     | PS     | TK     | YC     |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| VR |        | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1053 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| TS | 0.9910 |        | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1053 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| RS | 0.9910 | 0.9910 |        | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1053 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| GT | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 |        | 0.0000 | 0.0000 | 0.1053 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| MA | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 |        | 0.0000 | 0.1053 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| MS | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 |        | 0.1053 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| PB | 0.1441 | 0.2883 | 0.1531 | 0.2252 | 0.2883 | 0.2162 |        | 0.1053 | 0.1053 | 0.1053 |
| PS | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.1982 |        | 0.0000 | 0.0000 |
| TK | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.2432 | 0.9910 |        | 0.0000 |
| YC | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.9910 | 0.2252 | 0.9910 | 0.9910 |        |

สัญลักษณ์\*คือระหว่างอำเภอที่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ค่าด้านบนเส้นทแยงมุมคือค่า  $F_{ST}$  ค่าด้านล่างเส้นทแยงมุมคือค่า  $F_{ST}$  P values





ภาพที่ 31 population phylogenetic tree วิธี Neighbour - joining สร้างจากค่า nucleotide divergence ที่ได้จากข้อมูลยีน *16S rRNA*

ตารางที่ 35 ค่า nucleotide divergence และค่า nucleotide diversity (เส้นทแยงมุม) ที่ได้จากข้อมูล ยีน *16S rRNA*

|    | VR    | TS    | RS    | GT    | MA    | MS    | PB    | PS    | TK    | YC    |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| VR | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| TS | 0.000 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| RS | 0.000 | 0.000 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |
| GT | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |
| MA | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |       |       |       |       |       |
| MS | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |       |       |       |       |
| PB | 0.095 | 0.095 | 0.095 | 0.095 | 0.095 | 0.095 | 0.043 |       |       |       |
| PS | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.095 | 0.000 |       |       |
| TK | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.095 | 0.000 | 0.000 |       |
| YC | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.095 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

ภาพที่ 30 แสดงการกระจายของ haplotype ต่างๆ ใน 10 อำเภอที่ศึกษา จะพบ haplotype AAAAA ทั้ง 10 อำเภอทั้งหมด 197 ตัว และ haplotype ABABA พบในอำเภอพิบูลมังสาหารเพียงแห่งเดียวทั้งหมด 3 ตัว เนื่องจากยีน *16S rRNA* มีการกลายพันธุ์ต่ำ และการกลายพันธุ์พบเฉพาะในอำเภอพิบูลมังสาหารแห่งเดียว ทำให้ haplotype ที่ปรากฏเกือบทั้งหมดเหมือนกัน แสดงว่าผลการวิเคราะห์ด้วย RFLP ในยีน *16S rRNA* แสดงความแตกต่างของขนาดและชั้นดีเอ็นเอในประชากรปลาคุกด้านที่ศึกษาได้น้อยมาก จึงไม่สามารถอธิบายโครงสร้างประชากรปลาคุกด้านในบริเวณที่ศึกษาได้

เมื่อสร้าง population phylogenetic tree จากค่า nucleotide divergence (ตารางที่ 35) โดยใช้ข้อมูลยีน *16S rRNA* ด้วยวิธี Neighbour - joining (ภาพที่ 31) จากภาพ phylogenetic tree แสดงค่า nucleotide divergence ระหว่างอำเภอ พบว่าอำเภอพิบูลมังสาหารเพียงอำเภอเดียวที่มีค่า nucleotide divergence แตกต่างจากอำเภออื่นเท่ากับ 0.095

จากการวิเคราะห์ RFLP ในยีน *16S rRNA* โดยการใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดพบว่า ปลา 197 ตัว มี haplotype AAAAA และมีปลาเพียง 3 ตัวที่มี haplotype ABABA แสดงว่าเกิดการกลาย

พันธุ์ตำโนยีน *16S rRNA* เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ control region จึงพบการกลายพันธุ์น้อยกว่า แสดงให้เห็นว่ายีน *16S rRNA* มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อย เนื่องจากผลของ haplotype เกือบทั้งหมดที่ได้เหมือนกัน โดยพบ haplotype AAAAA มากถึง 197 ตัว ซึ่งแตกต่างจาก control region ที่พบการกลายพันธุ์มากกว่า ซึ่งพบ haplotype AAAA, AAAB, BAAA และ BAAB กระจาย อยู่ในอำเภอที่ศึกษา เพราะฉะนั้น control region จึงมีความเหมาะสมต่อการใช้เป็นเครื่องมือในการ วิเคราะห์โครงสร้างประชากรมากกว่ายีน *16S rRNA*

**ตารางที่ 36** ขนาดและจำนวนของซันดิเอ็นเอในยีน *16S rRNA* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อ หาความแปรปรวนทั่วไปที่เกิดกับซันดิเอ็นเอ

| เอนไซม์ตัดจำเพาะ | รูปแบบซันดิเอ็นเอ | ขนาด (bp)                       |
|------------------|-------------------|---------------------------------|
| <i>Dpn</i> II    | A                 | 500 380 290 270 130 120 95 80   |
| <i>Hae</i> III   | A                 | 360 275 270 250 200 150 145 100 |
|                  | B                 | 630 275 250 200 150 145 100     |
| <i>Tas</i> I     | A                 | 425 350 260 225 215 135 110 85  |
| <i>Msp</i> I     | A                 | 605 460 440 190 150             |
|                  | B                 | 795 460 440 150                 |
| <i>Rsa</i> I     | A                 | 850 270 260 200 190 100         |

### 9. ผลวิเคราะห์โครงสร้างประชากรปลาอุกด้านใช้ข้อมูลจาก control region และยีน *16S rRNA*

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปลาอุกด้านจากอำเภอแต่ละอำเภอ ที่ทำการทดลองโดยวิธี RFLP แถบดิเอ็นเอที่ปรากฏแทนด้วยสัญลักษณ์ 1 และแถบดิเอ็นเอที่ไม่ปรากฏแทนด้วยสัญลักษณ์ 0 แล้วนำผลข้อมูลแถบดิเอ็นเอที่ปรากฏและไม่ปรากฏหลังการตัดด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด และ 5 ชนิด ในบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ตามลำดับมาเรียงต่อกันเป็นแต่ละ haplotype มา คำนวณ เพื่อวิเคราะห์รูปแบบดิเอ็นเอทั้งหมดที่พบในการศึกษา ว่ามีผลสอดคล้องกันหรือแตกต่างกันเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์แยกกันในแต่ละตำแหน่ง โดยโปรแกรม Arlequin v 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) วิเคราะห์ nucleotide diversity, AMOVA,  $F_{ST}$  และ nucleotide divergence โดยใช้ค่า nucleotide divergence ที่ได้ในการสร้าง population phylogenetic tree จากวิธี Neighbour - joining โดยใช้โปรแกรม Neighbour ใน Phylip (Felsenstein, 2002) โดยโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์เหมือนกับ

การศึกษาของ Amato and Carvalho (2005) ใช้โปรแกรม Arlequin (Schneider *et al.*, 2000) และใช้โปรแกรม phylip (Felsenstein, 2002) ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง จากการทำ RFLP ในยีน *ND5* และ *ND6* ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในปลา *Macruronus magellanicus*

นำตัวอักษรที่แทนรูปแบบการตัดบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ที่ตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะของปลาแต่ละตัวมาจัดเรียง เพื่อวิเคราะห์ผลร่วมกันระหว่างบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* โดยใช้อักษรเรียงเหมือนเดิม โดย 4 ตัวแรกจาก control region และต่อด้วย 5 ตัวหลังจากยีน *16S rRNA* มาจัดเรียงเป็นกลุ่มสามารถแบ่งได้เป็น 5 haplotype (ตาราง 37) ใช้ อักษรย่อแทนรูปแบบ haplotype กลุ่มต่าง ๆ ที่พบดังนี้ haplotype A (AAAAAAAAA), haplotype B (AAABAAAAA), haplotype C (BAAAAAAAAA), haplotype D (BAABAAAAA) และ haplotype E (AAAAABABA) โดย haplotype A และ B เป็น haplotype หลักพบในทุกอำเภอที่ศึกษา แต่ haplotype E พบในอำเภอพิบูลมังสาหารเพียงอำเภอเดียว ค่า nucleotide diversity ในประชากรปลา คุณค้ำานที่ศึกษามีค่าตั้งแต่ 0.0156 ถึง 0.0504 (ตารางที่ 37) โดยอำเภอเมืองศรีสะเกษจะมีค่า nucleotide diversity น้อยสุด (0.0156) เมื่อเทียบกับอำเภออื่นแสดงว่ามีความแปรปรวนภายใน ประชากรน้อยสุด ส่วนอำเภอพิบูลมังสาหารจะมีค่า nucleotide diversity มากที่สุด (0.0504) เมื่อ เทียบกับอำเภออื่น ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากข้อมูลของ control region เพียงอย่างเดียวที่อำเภอตระการ พิษผลแสดงค่า nucleotide diversity มากที่สุด เหตุเนื่องจากอำเภอพิบูลมังสาหารเป็นอำเภอเดียวที่ พบความแปรปรวนในยีน *16S rRNA* เพราะฉะนั้นเมื่อรวมผลของความแปรปรวนภายในประชากร จาก control region และยีน *16S rRNA* ทั้ง 2 ตำแหน่ง จึงทำให้ค่า nucleotide diversity ในอำเภอ พิบูลมังสาหาร (0.0504) มีค่ามากกว่าอำเภอตระการพิษผล (0.0359)

จากการใช้ข้อมูล RFLP ไปวิเคราะห์ AMOVA ผลแสดงไว้ดังตารางที่ 38 พบว่าค่าความ แปรปรวนที่วิเคราะห์ได้จากข้อมูลบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ของปลาคุดค้ำาน มี ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มคือระหว่างจังหวัดศรีสะเกษกับจังหวัดอุบลราชธานีเท่ากับ 5.30 เปอร์เซ็นต์ ความแปรปรวนระหว่างประชากร (อำเภอ) เท่ากับ 16.83 เปอร์เซ็นต์ และความ แปรปรวนภายในประชากร (อำเภอ) เท่ากับ 77.87 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบทางสถิติที่ระดับ 0.05 พบว่าความแตกต่างระหว่างประชากรไม่มีนัยสำคัญ และความแปรปรวนภายในประชากรมี เปอร์เซ็นต์มากที่สุด ซึ่งจากการศึกษาของ Hickerson and Ross (2001) ศึกษาปลา *Gobiosox maeandricus* ทางตอนเหนือของมหาสมุทรแปซิฟิกในเขตประเทศจอร์เจีย ใช้วิธีการ sequencing บริเวณ control region ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ผลจาก AMOVA พบความแปรปรวนระหว่าง

กลุ่มเท่ากับ 24.7 เปอร์เซ็นต์ ความแปรปรวนระหว่างประชากรเท่ากับ 7.2 เปอร์เซ็นต์ และความแปรปรวนภายในประชากรเท่ากับ 68.10 เปอร์เซ็นต์ โดยปลา *Gobbiosox maeandricus* เป็นปลาที่อาศัยอยู่ในทะเลเปิดจึงมีการเคลื่อนย้ายประชากรได้ง่ายกว่าปลาที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำซึ่งมีสภาพแวดล้อมเชิงปิด จึงเกิดการกระจายตัวของประชากรปลา *Gobbiosox maeandricus* โดยมีการถ่ายเทยีนระหว่างกลุ่มของประชากรที่ศึกษา ดังนั้นจากผล AMOVA ของประชากรปลาคุกด้านซึ่งเป็นผลจากภาพรวมของประชากรที่ศึกษาทั้งหมด ซึ่งพบความแปรปรวนภายในประชากรมากกว่าความแปรปรวนระหว่างประชากรหรือแหล่งเก็บตัวอย่างน้อย แสดงว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปลาคุกด้านมีการกระจายค่อนข้างสม่ำเสมอในบริเวณที่ศึกษา

ตารางที่ 37 แสดง haplotype ชนิดต่างๆ จำนวน haplotype ต่างๆ ที่พบในแต่ละอำเภอ ( $N_{hap}$ ) และค่า nucleotide diversity ( $\pi_n$ ) ของปลาคุกด้านในแต่ละอำเภอ ( $N$  คือจำนวนตัวอย่างปลาคุกด้านที่ศึกษา)

|       | haplotype |    |    |    |   | N  | $N_{hap}$ | $\pi_n$         |
|-------|-----------|----|----|----|---|----|-----------|-----------------|
|       | A         | B  | C  | D  | E |    |           |                 |
| VR    | 5         | 9  |    | 6  |   | 20 | 3         | 0.0299 ± 0.0204 |
| TS    | 10        | 7  | 2  | 1  |   | 20 | 4         | 0.0276 ± 0.0192 |
| RS    | 5         | 10 | 5  |    |   | 20 | 3         | 0.0329 ± 0.0220 |
| GT    | 12        | 8  |    |    |   | 20 | 2         | 0.0180 ± 0.0141 |
| MA    | 1         | 3  | 16 |    |   | 20 | 3         | 0.0216 ± 0.0160 |
| MS    | 15        | 1  | 4  |    |   | 20 | 3         | 0.0156 ± 0.0127 |
| PB    | 4         | 1  | 12 |    | 3 | 20 | 3         | 0.0504 ± 0.0310 |
| PS    | 15        | 2  | 3  |    |   | 20 | 3         | 0.0163 ± 0.0132 |
| TK    | 7         | 6  | 3  | 4  |   | 20 | 4         | 0.0359 ± 0.0236 |
| YC    | 11        | 5  | 4  |    |   | 20 | 3         | 0.0261 ± 0.0185 |
| Total | 85        | 52 | 49 | 11 | 3 |    |           |                 |

ตารางที่ 38 แสดงการคำนวณ AMOVA จากข้อมูลบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ของปลาคูก้าน

| Source of variation | d.f.                                                                           | Sum of squares | Variance components | Percentage of variation |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------|-------------------------|
| Among group         | 1                                                                              | 9.320          | 0.0523              | 5.30                    |
| Among populations   | 8                                                                              | 32.720         | 0.1661              | 16.83                   |
| Within populations  | 190                                                                            | 146.000        | 0.7684              | 77.87                   |
| Total               | 199                                                                            | 188.040        | 0.9868              |                         |
| Fixation Index      | $F_{ST} : 0.2213$                                                              |                |                     |                         |
|                     | $F_{ST} P \text{ (rand. value } \leq \text{ obs. value) } = 0.0000 \pm 0.0000$ |                |                     |                         |

ตารางที่ 39 ค่า  $F_{ST}$  และ  $F_{ST} P$  values แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ร่วมกันในประชากรปลาคูก้านทั้ง 10 อำเภอ

|    | VR      | TS      | RS      | GT      | MA      | MS      | PB      | PS      | TK      | YC      |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| VR |         | 0.1151  | 0.0234  | 0.2105  | 0.4432  | 0.4237  | 0.3448  | 0.3893  | 0.0202  | 0.2197  |
| TS | 0.0540  |         | -0.0271 | -0.0150 | 0.3952  | 0.1353  | 0.2363  | 0.0877  | 0.0062  | -0.0171 |
| RS | 0.2883  | 0.6757  |         | 0.0491  | 0.3364  | 0.2012  | 0.2228  | 0.1643  | -0.0412 | 0.0279  |
| GT | 0.0090* | 0.4685  | 0.1351  |         | 0.5486  | 0.2278  | 0.3439  | 0.1551  | 0.1115  | 0.0486  |
| MA | 0.0000* | 0.0000* | 0.0000* | 0.0000* |         | 0.3976  | 0.0624  | 0.4284  | 0.2612  | 0.3349  |
| MS | 0.0000* | 0.0180* | 0.0000* | 0.0000* | 0.0000* |         | 0.1641  | -0.0404 | 0.2076  | 0.0181  |
| PB | 0.0000* | 0.0000* | 0.0090* | 0.0000* | 0.0811  | 0.0090* |         | 0.1946  | 0.1838  | 0.1665  |
| PS | 0.0000* | 0.0811  | 0.0180* | 0.0270* | 0.0000* | 0.9910  | 0.0000* |         | 0.1826  | -0.0080 |
| TK | 0.3784  | 0.3874  | 0.9099  | 0.0270* | 0.0090* | 0.0090* | 0.0000* | 0.0090* |         | 0.0457  |
| YC | 0.0000* | 0.6577  | 0.3153  | 0.2522  | 0.0000* | 0.3513  | 0.0000* | 0.6486  | 0.1982  |         |

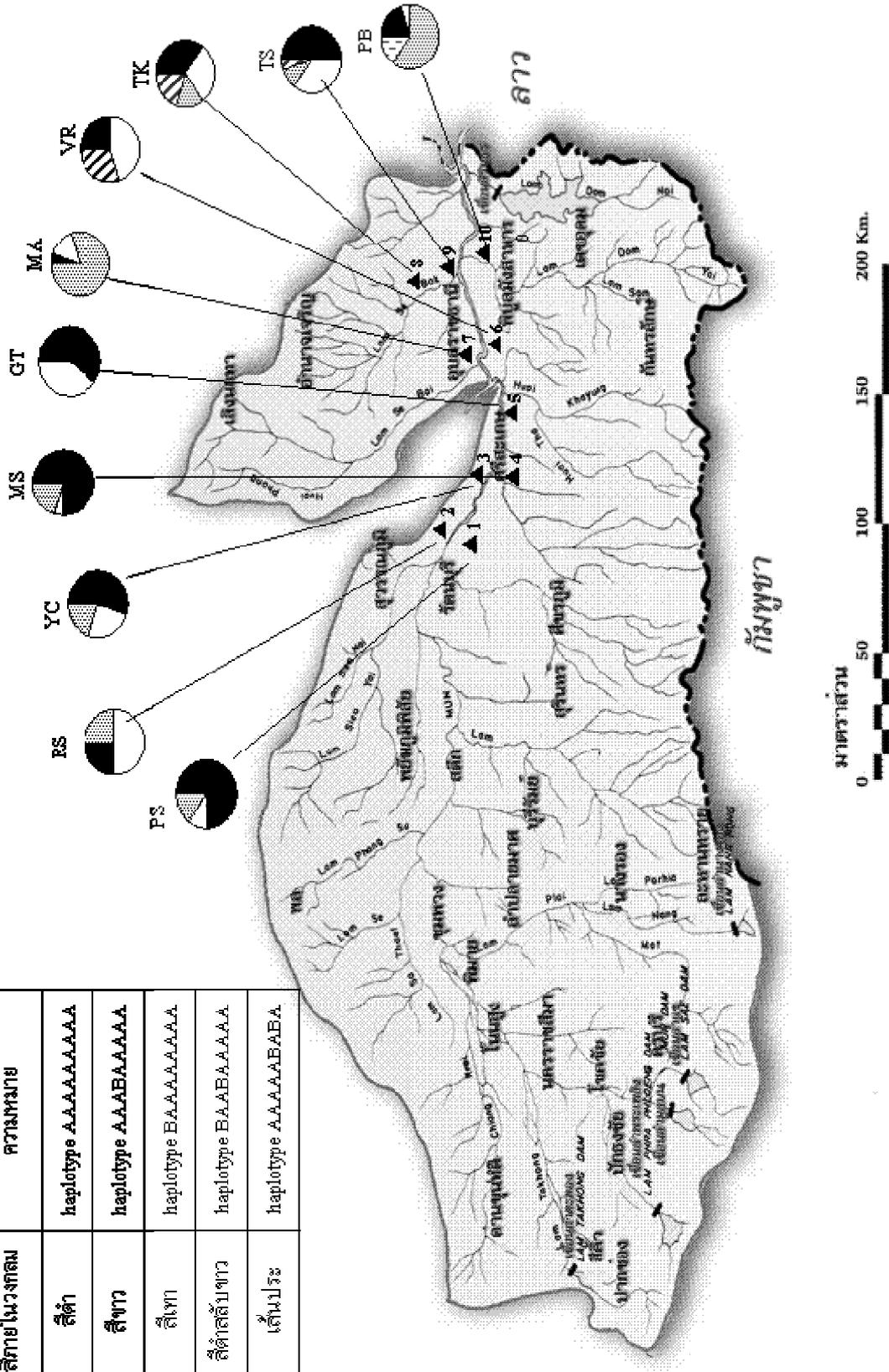
สัญลักษณ์\* คือระหว่างอำเภอที่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ค่าด้านบนเส้นทแยงมุมคือค่า  $F_{ST}$  ค่าด้านล่างเส้นทแยงมุมคือค่า  $F_{ST} P$  values

ตารางที่ 39 ด้านบนเส้นทแยงมุมเป็นค่า  $F_{ST}$  ที่คำนวณจากบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ร่วมกัน แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร จากค่า  $F_{ST}$  จะมีอยู่ 5 อำเภอ

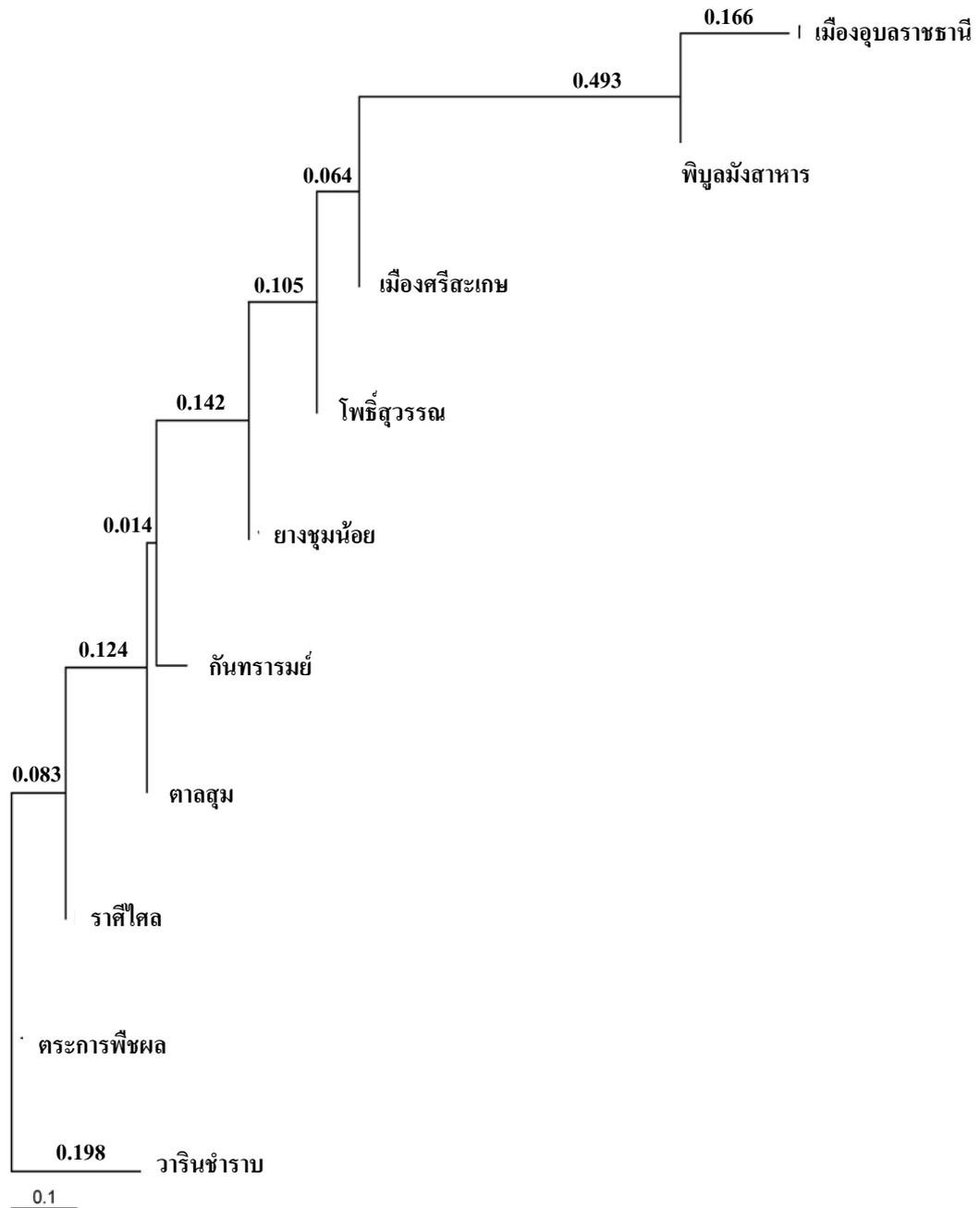
ที่มีค่า  $F_{ST}$  ต่ำ แสดงว่าในอำเภอเหล่านี้มีระยะห่างทางพันธุกรรมค่อนข้างใกล้เคียงกัน ได้แก่ อำเภอราษีไศล ยางชุมน้อย กันทรารมย์ ตระการพืชผล และतालसुम ส่วนอำเภอเมืองอุบลราชธานี กับพิบูลมังสาหาร จะมีค่า  $F_{ST}$  สูงแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่าอำเภออื่นเมื่อเปรียบเทียบกัน ซึ่งน่าจะเกิดจากปลาตกค้างในอำเภอดังกล่าวมีการเคลื่อนย้ายไปยังอำเภอใกล้เคียงน้อย ทำให้มีระยะห่างทางพันธุกรรมแตกต่างจากอำเภออื่นที่ศึกษา และใน 2 อำเภอดังกล่าวจะพบ haplotype C เป็นกลุ่มสมาชิกหลัก แตกต่างจากอำเภออื่นๆ ที่จะพบ haplotype A หรือ haplotype B เป็นหลัก ดังตารางที่ 37 ผลที่ได้จากค่า  $F_{ST}$  จะเห็นว่ามีผลคล้ายคลึงกับผล  $F_{ST}$  ที่คำนวณจากบริเวณ control region ตำแหน่งเดียว เพราะว่าการกลายพันธุ์ที่พบจากการทดลองเกือบทั้งหมดพบในบริเวณ control region ส่วนยีน *16S rRNA* พบการกลายพันธุ์น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ control region ผลที่ได้จึงสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์จากบริเวณ control region ตำแหน่งเดียว และด้านล่างเส้นทแยงมุมของตารางที่ 39 เป็นค่า  $F_{ST}$  P values จากการทดสอบทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ระหว่างอำเภอที่ไม่มีดอกจันทึบแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างอำเภอที่มีดอกจันทึบแสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกันสูง ซึ่งจากการศึกษาของ Camona *et al.* (2000) ศึกษาปลา *Chondrostoma lemmingii* ในบริเวณ Iberian peninsula ของประเทศสเปน โดยใช้วิธี allozyme และ sequencing ยีน *cytochrome b* ผลของ  $F_{ST}$  แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมระหว่างประชากร โดยค่า  $F_{ST}$  เฉลี่ยเท่ากับ 0.737 ซึ่งประชากรจากบริเวณ Duero จะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงกว่าบริเวณอื่นที่ศึกษา จะเห็นได้ว่าค่า  $F_{ST}$  สามารถบอกระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรที่ศึกษาได้ โดยในการศึกษาประชากรปลาตกค้างภายในลุ่มน้ำมูลของจังหวัดศรีสะเกษกับอุบลราชธานี อำเภอที่มีค่า  $F_{ST}$  สูงได้แก่อำเภอเมืองอุบลราชธานี ( $F_{ST}$  เฉลี่ย 0.3564) พิบูลมังสาหาร ( $F_{ST}$  เฉลี่ย 0.2132) และวารินชำราบ ( $F_{ST}$  เฉลี่ย 0.2433) ซึ่งผลจากค่า  $F_{ST}$  ที่ได้สอดคล้องกับผลจาก population phylogenetic tree ที่แบ่งประชากรปลาตกค้างที่ศึกษาได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยประชากรจากอำเภอเมืองอุบลราชธานี และพิบูลมังสาหาร กลุ่มที่ 2 เป็นประชากรจากอำเภวารินชำราบ และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยประชากรจากอีก 7 อำเภอที่ศึกษา จะเห็นว่าอำเภอเมืองอุบลราชธานี พิบูลมังสาหาร และวารินชำราบมีการแยกตัวออกมาจากกลุ่มประชากรหลักที่ศึกษา ซึ่งทั้ง 3 อำเภอดังกล่าวมีค่า  $F_{ST}$  สูงแตกต่างจากอีก 7 อำเภอที่ศึกษาด้วย

ตารางที่ 40 ความหมายของสี่เหลี่ยมวงกลม

| สี่เหลี่ยมวงกลม | ความหมาย             |
|-----------------|----------------------|
| สี่ดำ           | haplotype AAAAAAAAAA |
| สี่ขาว          | haplotype AAABAAAAA  |
| สี่เทา          | haplotype BAAAAAAAAA |
| สี่ดำสลับขาว    | haplotype BAABAAAAA  |
| เส้นประ         | haplotype AAAAAABABA |



รูปที่ 32 แสดงการกระจายของ haplotype ในบริเวณ control region ร่วมกับ 10 control ที่พบใน 10 อำเภอ



ภาพที่ 33 population phylogenetic tree วิธี Neighbour - joining สร้างจากค่า nucleotide divergence ที่ได้จากข้อมูล control region และยีน *16S rRNA*

ตารางที่ 41 ค่า nucleotide divergence และค่า nucleotide diversity (เส้นทแยงมุม) ที่ได้จากข้อมูล control region และยีน *16S rRNA*

|    | VR    | TS     | RS     | GT    | MA    | MS     | PB    | PS     | TK    | YC    |
|----|-------|--------|--------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|
| VR | 0.030 |        |        |       |       |        |       |        |       |       |
| TS | 0.209 | 0.028  |        |       |       |        |       |        |       |       |
| RS | 0.042 | -0.045 | 0.033  |       |       |        |       |        |       |       |
| GT | 0.358 | -0.019 | 0.074  | 0.018 |       |        |       |        |       |       |
| MA | 1.148 | 0.901  | 0.774  | 1.349 | 0.022 |        |       |        |       |       |
| MS | 0.936 | 0.189  | 0.342  | 0.278 | 0.688 | 0.016  |       |        |       |       |
| PB | 1.183 | 0.676  | 0.668  | 1.004 | 0.134 | 0.363  | 0.050 |        |       |       |
| PS | 0.825 | 0.118  | 0.271  | 0.177 | 0.797 | -0.035 | 0.452 | 0.016  |       |       |
| TK | 0.038 | 0.011  | -0.076 | 0.189 | 0.569 | 0.378  | 0.544 | 0.327  | 0.036 |       |
| YC | 0.442 | -0.025 | 0.047  | 0.063 | 0.673 | 0.022  | 0.428 | -0.009 | 0.083 | 0.026 |

ภาพที่ 32 แสดงการกระจายของ haplotype ต่างๆ ใน 10 อำเภอที่ศึกษา จะพบ haplotype กลุ่ม A และกลุ่ม B ทั้ง 10 อำเภอและ haplotype กลุ่ม C พบใน 8 อำเภอที่ศึกษา โดยอำเภอเมือง อุบลราชธานี กับพิบูลมังสาหาร จะพบ haplotype C เป็นกลุ่มสมาชิกหลักแตกต่างจากอำเภออื่นๆ ที่ จะพบ haplotype A หรือ B เป็นหลัก ส่วน haplotype D จะพบ 3 อำเภอที่อยู่เฉพาะในจังหวัด อุบลราชธานี และ haplotype E พบในอำเภอพิบูลมังสาหารแห่งเดียว ดังนั้นในการศึกษาโครงสร้าง ประชากรปลาชุกด้าน haplotype ที่พบมีรูปแบบการกระจายไปตามอำเภอที่ศึกษาเนื่องจากในฤดูฝน ระดับน้ำของแม่น้ำมูลจะสูงขึ้น ทำให้เกิดน้ำท่วมในบริเวณลุ่มน้ำมูล ปลาชุกด้านจึงมีการ แพร่กระจายไปยังแหล่งน้ำใกล้เคียงที่น้ำท่วมถึงได้

ตารางที่ 42 ขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอ ในบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ เพื่อหาความแปรปรวนที่เกิดขึ้นกับชิ้นดีเอ็นเอ

| ชิ้นดีเอ็นเอ    | เอนไซม์        | รูปแบบดีเอ็นเอ | ขนาดดีเอ็นเอที่ตัดได้ (bp)      |
|-----------------|----------------|----------------|---------------------------------|
| control region  | <i>Tas</i> I   | A              | 425 230 140 90 80               |
|                 |                | B              | 425 230 90 80 70                |
| control region  | <i>TruI</i> I  | A              | 188 160 150 147 120             |
| control region  | <i>Rsa</i> I   | A              | 350 275 175 110                 |
| control region  | <i>Hin1</i> II | A              | 530 290 140                     |
|                 |                | B              | 530 310 140                     |
| <i>16S rRNA</i> | <i>Dpn</i> II  | A              | 500 380 290 270 130 120 95 80   |
| <i>16S rRNA</i> | <i>Hae</i> III | A              | 360 275 270 250 200 150 145 100 |
|                 |                | B              | 630 275 250 200 150 145 100     |
| <i>16S rRNA</i> | <i>Tas</i> I   | A              | 425 350 260 225 215 135 110 85  |
| <i>16S rRNA</i> | <i>Msp</i> I   | A              | 605 460 440 190 150             |
|                 |                | B              | 795 460 440 150                 |
| <i>16S rRNA</i> | <i>Rsa</i> I   | A              | 850 270 260 200 190 100         |

เมื่อสร้าง population phylogenetic tree จากค่า nucleotide divergence (ตารางที่ 41) โดยใช้ข้อมูล control region และยีน *16S rRNA* วิเคราะห์ผลร่วมกัน ด้วยวิธี Neighbour - joining (ภาพที่ 33) ค่า nucleotide divergence ค่อนข้างสูง โดยมีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ 0.014 ถึง 0.493 โดยเฉพาะอำเภอเมืองอุบลราชธานี และพิบูลมังสาหาร มีค่า nucleotide divergence ต่างจากอีก 8 อำเภอเท่ากับ 0.493 แสดงว่าประชากรอำเภอเมืองอุบลราชธานี และพิบูลมังสาหารแยกออกมาจากอีก 8 อำเภอที่ศึกษา ซึ่งอีก 8 อำเภอจะมีระยะห่างทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากกว่า 2 อำเภอดังกล่าว แต่อำเภวารินชำราบจะมีค่าแยกมาจาก 9 อำเภอเท่ากับ 0.198 ซึ่งค่าค่อนข้างสูง เพราะฉะนั้นจากการทำ population phylogenetic tree จึงสามารถแบ่งประชากรปลาคุกด้านที่ศึกษาได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยประชากรจากอำเภอเมืองอุบลราชธานี และอำเภอพิบูลมังสาหาร กลุ่มที่ 2 เป็นประชากรจากอำเภวารินชำราบ และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยประชากรจากอีก 7 อำเภอที่ศึกษา ได้แก่ อำเภอโพธิ์สุวรรณ ราศีไศล ขางชุมน้อย เมืองศรีสะเกษ กันทรารมย์ ตระการพืชผล และตาลชุม จากผลดังกล่าวเมื่อพิจารณาผลร่วมกับลักษณะภูมิประเทศที่ได้จากข้อมูลภาพถ่ายดาวเทียมให้ผลไปใน

ทิศทางเดียวกัน เนื่องจากอำเภอเมืองอุบลราชธานี พิบูลมังสาหาร และวารินชำราบ มีลักษณะภูมิประเทศเป็นพื้นที่ดอน เพราะฉะนั้นเมื่อถึงฤดูฝนทำให้น้ำท่วมถึงบริเวณดังกล่าวได้ยาก ทำให้การแพร่กระจายของประชากรปลาคุกด้านใน 3 อำเภอดังกล่าว มีน้อยกว่าในอีก 7 อำเภอ ซึ่งมีลักษณะภูมิประเทศเป็นพื้นที่ลุ่ม ทำให้ในฤดูฝนเกิดน้ำท่วมถึงได้ง่ายกว่า ดังนั้นประชากรใน 7 อำเภอดังกล่าวจึงสามารถแพร่กระจายประชากรไปยังแหล่งน้ำใกล้เคียงได้ดีกว่า และจากการศึกษาของ Alves *et al.* (2001) ศึกษาปลา *Anaocypris hispanica* ในแม่น้ำ 4 สายได้แก่ Caia, Degebe, Andila และ Odeleite ใน Iberian Peninsula โดยวิธีการ RFLP และ sequencing จากบริเวณ control region และยีน *cytochrome b* ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ นำค่า genetic divergence ที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี Neighbour - joining สามารถแบ่งประชากรปลา *Anaocypris hispanica* ออกได้เป็น 4 กลุ่ม ตามลักษณะภูมิประเทศของแม่น้ำแต่ละสายที่ไม่เชื่อมต่อกัน จึงเกิดการแบ่งประชากรตามลักษณะภูมิประเทศดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าลักษณะภูมิประเทศในบริเวณที่ศึกษาเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการแบ่งแยกของประชากรออกเป็นกลุ่ม จึงต้องใช้พิจารณาพร้อมกับการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรปลาที่ศึกษา

#### 10. ผลและวิจารณ์การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรปลาคุกด้านบริเวณที่ศึกษา

สรุปผลจากค่า nucleotide diversity ในประชากรปลาคุกด้านจากอำเภอที่ศึกษา มีค่าตั้งแต่ 0.0156 ถึง 0.0504 ซึ่งอำเภอเมืองศรีสะเกษจะมีค่า nucleotide diversity น้อยสุด (0.0156) และอำเภอพิบูลมังสาหารจะมีค่ามากที่สุด (0.0504) เมื่อเทียบกับอำเภออื่น ซึ่งค่า nucleotide diversity ที่ได้จะมีค่าต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการศึกษาปลา *Clarias gariepinus* ในแอฟริกาตะวันออกของ Giddelo *et al.* (2002) โดยใช้วิธี RFLP ศึกษา ยีน *ND5/6* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ได้ค่าตั้งแต่ 0.000 ถึง 0.246 โดยเฉพาะบางแหล่งที่ศึกษา เช่นจากทะเลสาบ Mtera มีค่าเท่ากับ 0.246 และทะเลสาบ Vukoni มีค่าเท่ากับ 0.0402 ซึ่งเป็นแหล่งที่มีค่า nucleotide diversity สูง ซึ่งทะเลสาบ Mtera และ Vukoni จะมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากแหล่งอื่น ๆ ที่ศึกษาด้วย และจากการศึกษาของ Krieg *et al.* (2000) ที่ศึกษาปลา *Silurus glanis* ในทวีปยุโรป โดยใช้วิธี PCR - RFLP ศึกษา control region, *ND5/6* และ *cytochrome b* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ได้ค่า nucleotide diversity ตั้งแต่ 0.00 ถึง 0.29 ประชากรที่ศึกษาประกอบด้วยปลา *Silurus glanis* ในธรรมชาติ 13 ประชากรและปลาเลี้ยง 8 ประชากร พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาธรรมชาติถึง 79 เปอร์เซ็นต์ จากประชากรที่ศึกษา แสดงให้เห็นว่าปลาธรรมชาติมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าปลาเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบค่า nucleotide diversity กับประชากรปลาคุกด้านที่ศึกษาจึงพบว่ามีหลากหลาย

ทางพันธุกรรมภายในประชากรน้อยกว่าปลาครัสเซีย *Clarias gariepinus* และปลา *Silurus glanis* แสดงว่าปลาคูกด้านที่ศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง ส่งผลให้ความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่อาจเปลี่ยนแปลงไปลดลง จึงมีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์จากธรรมชาติ

เมื่อสร้าง population phylogenetic tree จากค่า nucleotide divergence (ตารางที่ 41) โดยใช้ข้อมูล control region และยีน *16S rRNA* ด้วยวิธี Neighbour - joining (ภาพที่ 33) ค่า nucleotide divergence ค่อนข้างสูง โดยมีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ 0.014 ถึง 0.493 ซึ่งเมื่อเทียบกับการศึกษาปลาคูกด้านในประเทศไทยของ อธิยา (2545) ศึกษาอินควมคุมเอนไซม์จำนวน 22 โลไซด้วยวิธีวิเคราะห์ allozyme ได้ค่า nucleotide divergence ตั้งแต่ 0.00042 ถึง 0.15598 แสดงว่าปลาคูกด้านที่เราศึกษามีค่า nucleotide divergence ค่อนข้างสูง เนื่องจากอัตราการเคลื่อนย้ายของประชากรปลาคูกด้านแตกต่างกัน โดยเฉพาะอำเภอเมืองอุบลราชธานี และพิบูลมังสาหาร มีค่า nucleotide divergence ต่างจากอีก 8 อำเภอเท่ากับ 0.493 (ภาพที่ 33) แสดงว่าประชากรอำเภอเมืองอุบลราชธานี และพิบูลมังสาหาร แยกออกมาจากอีก 8 อำเภอที่ศึกษา มีปลาคูกด้านเคลื่อนย้ายไปยังอำเภอใกล้เคียงน้อย ทำให้ระยะห่างทางพันธุกรรมแตกต่างจากอีก 8 อำเภอที่ศึกษาสูง ปลาคูกด้านมีการเคลื่อนย้ายแตกต่างกัน อาจเกี่ยวข้องกับลักษณะภูมิประเทศของจุดเก็บตัวอย่างในอำเภอที่ศึกษามีลักษณะแตกต่างกัน ซึ่งอีก 8 อำเภอปลาคูกด้านจะเคลื่อนย้ายไปยังอำเภอใกล้เคียงกันได้มากกว่าทำให้มีระยะห่างทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากกว่า 2 อำเภอดังกล่าว แต่อำเภวารินชำราบจะมีค่าแยกมาจาก 9 อำเภอเท่ากับ 0.198 ซึ่งค่าค่อนข้างสูง

ค่า  $F_{ST}$  ที่คำนวณได้จากข้อมูลบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ได้ค่าใกล้เคียงกันในแต่ละอำเภอ ซึ่งค่า  $F_{ST}$  ที่ได้มีค่าตั้งแต่ 0.008 ถึง 0.549 ซึ่งค่าที่ได้มีค่าน้อยกว่าในการศึกษาปลา *Clarias gariepinus* ในแอฟริกาตะวันออกของ Giddelo *et al.* (2002) ที่ศึกษา ยีน *ND5* และ *ND6* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ด้วยวิธี RFLP ได้ค่า  $F_{ST}$  ตั้งแต่ 0.014 ถึง 0.973 แสดงว่าปลาคูกด้านในจังหวัดศรีสะเกษและอุบลราชธานีมีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยกว่าปลา *Clarias gariepinus* ในแอฟริกาตะวันออก แต่ก็มีอำเภอที่มีค่า  $F_{ST}$  แตกต่างจากอำเภออื่นค่อนข้างสูง ได้แก่อำเภอเมืองอุบลราชธานี พิบูลมังสาหาร และวารินชำราบ ซึ่งผลจากค่า  $F_{ST}$  สอดคล้องกับผลจาก population phylogenetic tree ที่ 3 อำเภอดังกล่าวมีการแยกออกมาจากอีก 7 อำเภอที่ศึกษา และจากค่า  $F_{ST}$  Pvalues ทดสอบทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ผลที่ได้ก็สอดคล้องกับค่า  $F_{ST}$  โดยอำเภอเมือง

อุบลราชธานี พิบูลมังสาหาร และวารินชำราบ จะพบความแตกต่างระหว่างประชากรอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอำเภออื่นที่ศึกษา

การวิเคราะห์ AMOVA จากข้อมูลบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* โดยทดสอบทางสถิติที่ระดับ 0.05 พบว่าความแตกต่างระหว่างประชากรไม่มีนัยสำคัญ ได้เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มและระหว่างประชากรเท่ากับ 5.30 เปอร์เซ็นต์ และ 16.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับความแปรปรวนภายในประชากรซึ่งมีค่าเท่ากับ 77.87 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรน้อย แต่มีความแตกต่างภายในประชากรสูง ผลจาก AMOVA แสดงให้เห็นว่าปลาอุกด้านบริเวณที่ศึกษามีการแพร่ถึงกันระหว่างประชากร จึงคาดว่ามีปลาอุกด้านอพยพในจังหวัดศรีสะเกษและอุบลราชธานี ซึ่งอำเภอที่เป็นแหล่งเก็บตัวอย่างเมื่อถึงฤดูฝนน้ำจะท่วมขังที่นา สอดคล้องกับลักษณะภูมิประเทศในบริเวณใกล้ลุ่มแม่น้ำมูลจะเป็นพื้นที่ราบน้ำท่วมถึง (กวี, 2547) และข้อมูลระดับน้ำจากสถานีตรวจวัดน้ำที่ได้จากกรมชลประทาน ซึ่งใช้ประกอบการพิจารณาขอภาพถ่ายดาวเทียมจากสำนักงานพัฒนาเทคโนโลยีอวกาศและภูมิสารสนเทศ พบว่าปลาอุกด้านมีการเคลื่อนย้ายประชากรไปในบริเวณใกล้เคียงที่มีน้ำท่วมถึงได้ ผลจากการวิเคราะห์ RFLP แสดงให้เห็นว่าปลาจากต่างอำเภอมี haplotype ปรากฏร่วมกัน และค่า nucleotide diversity ภายในประชากรที่ค่อนข้างต่ำ แต่ค่า nucleotide divergence ระหว่างประชากรมีค่าสูงเมื่อนำไปสร้าง phylogenetic tree พบว่าประชากรเหล่านี้ถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มประชากรจากอำเภอวารินชำราบ กับกลุ่มเมืองอุบลราชธานี และพิบูลมังสาหาร และกลุ่มประชากรจากอีก 7 อำเภอที่ศึกษา (อำเภอโพธิ์สุวรรณ ราษีไศล ยางชุมน้อย เมืองศรีสะเกษ กันทรารมย์ ตระการพืชผล และตาลชุม)

จากค่า nucleotide diversity แสดงว่าความหลากหลายภายในประชากรน้อย และจากค่า nucleotide divergence แสดงว่าความหลากหลายระหว่างประชากรมีค่าสูงกว่า ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากผลของ AMOVA เพราะค่า nucleotide diversity และ nucleotide divergence จะคำนวณแยกแต่ละอำเภอ ส่วน AMOVA จะคิดทุกอำเภอรวมกัน ทำให้ผลที่ได้แตกต่างกัน และจากการทดลองพบว่ารูปแบบของดีเอ็นเอในบริเวณ control region จะแตกต่างกันมากกว่าในยีน *16S rRNA* แสดงว่าบริเวณ control region มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับยีน *16S rRNA*

## สรุป

1. สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปลาจากด้าน โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ AquaPure Genomic DNA Isolation Kit ของบริษัท Bio Rad สามารถสกัด total genomic DNA ได้ทั้งหมด 200 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับเพิ่มปริมาณบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ในไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR สามารถเพิ่มปริมาณ PCR product ได้

2. การวิเคราะห์ RFLP บริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ทั้ง 200 ตัวอย่าง ในบริเวณ control region จะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิดในการตัดคือ *Tas I*, *TruI*, *Rsa I*, *Hin1 II* และในยีน *16S rRNA* จะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดในการตัดคือ *Dpn II*, *Hae III*, *Tas I*, *Msp I* และ *Rsa I* เมื่อวิเคราะห์ผลรวมกันทั้ง 2 ตำแหน่ง พบว่ามี haplotype ทั้งหมด 5 แบบ และได้ค่า nucleotide diversity อยู่ในช่วง 0.0156 ถึง 0.0504 ซึ่งค่า nucleotide diversity ภายในประชากรที่ใดมีค่าค่อนข้างต่ำ แสดงว่าปลาจากด้านที่ศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชานน้อย

3. การวิเคราะห์ AMOVA จากข้อมูลบริเวณ control region และยีน *16S rRNA* ของปลาจากด้านร่วมกัน มีความแปรปรวนระหว่างกลุ่มเท่ากับ 5.30 เปอร์เซ็นต์ ความแปรปรวนระหว่างประชานเท่ากับ 16.83 เปอร์เซ็นต์ และความแปรปรวนภายในประชานเท่ากับ 77.87 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบทางสถิติที่ระดับ 0.05 พบว่าความแตกต่างระหว่างประชานไม่มีนัยสำคัญ และความแปรปรวนภายในประชานมีเปอร์เซ็นต์มากที่สุด

4. ผลจากค่า  $F_{ST}$  จะมีอยู่ 5 อำเภอ ที่มีค่า  $F_{ST}$  ต่ำ ได้แก่อำเภอราษีไศล ขางชุมน้อย กันทรารมย์ ตรีการพิชผล และตาลชุม ส่วนอำเภอเมืองอุบลราชธานี พิบูลมังสาหาร และวารินชำราบ มีค่า  $F_{ST}$  สูงแสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมจากอำเภออื่นค่อนข้างสูง จากผลดังกล่าวทำให้ทราบว่าอำเภอใดมีความใกล้ชิดกันหรือมีความห่างกันทางพันธุกรรม

5. ผลการวิเคราะห์ RFLP แสดงให้เห็นว่าปลาจากต่างอำเภอมี haplotype ปรากฏร่วมกัน และค่า nucleotide diversity ภายในประชานต่ำ แต่ค่า nucleotide divergence ระหว่างประชานมีค่าสูงเมื่อนำไปสร้าง population phylogenetic tree พบว่าประชานเหล่านี้แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยประชานจากอำเภอเมืองอุบลราชธานี และอำเภอพิบูลมังสาหาร กลุ่มที่ 2 เป็นประชานจากอำเภวารินชำราบ และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยประชานจากอีก 7 อำเภอที่ศึกษา

### ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน endangered species พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับ non-endangered species (Frankham, 2002) ซึ่งปลาคูก้านเป็นปลาที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (สำนักนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, 2540) จากการศึกษาพบความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงจึงมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เมื่อสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป จึงควรรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้ (Frankham, 2003) ดังเช่นการศึกษาของ Mccusker *et al.* (2000) ศึกษาปลา *Oncorhynchus mykiss* บริเวณตะวันตกเฉียงเหนือของอเมริกา โดยใช้วิธี RFLP วิเคราะห์บริเวณ control region, ND5/6 และยีน *cytochrome b* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ จากการศึกษาผลของโครงสร้างประชากรจะช่วยวางแผนอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้ ซึ่งต้องคำนึงถึงสภาพแวดล้อมของระบบนิเวศวิทยาและแหล่งที่อยู่อาศัยของปลาที่ศึกษา เพราะมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม และการศึกษาของ Jones *et al.* (1996) ศึกษาปลา *Salvelinus fontinalis* ใน national park 5 แห่งทางตะวันออกของประเทศแคนาดา โดยวิธี allozyme ศึกษาไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอทั้งจีโนม พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่ำ เนื่องจากมีการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร ซึ่งทำให้ความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปลดลง จึงควรจัดการอนุรักษ์ปลา *Salvelinus fontinalis* ในบริเวณที่ศึกษา ซึ่งการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมต้องคำนึงถึงโครงสร้างประชากรของปลาที่ศึกษาและสภาพแวดล้อมในบริเวณแหล่งที่อยู่อาศัย จากการศึกษาพบความแปรปรวนระหว่างประชากรมีระดับแตกต่างกันสูง เนื่องจากการถ่ายเทยีนระหว่างประชากรมีน้อยมาก จึงให้ปลา *Salvelinus fontinalis* ที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเป็นตัวแทนสำหรับการอนุรักษ์ จากรายงานดังกล่าว จะเห็นว่าโครงสร้างประชากรมีความสำคัญต่อการอนุรักษ์ ซึ่งโครงสร้างประชากรปลาคูก้านจากการศึกษา สามารถแบ่งประชากรปลาคูก้านที่ศึกษาได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยประชากรจากอำเภอเมืองอุบลราชธานี และพิบูลมังสาหาร กลุ่มที่ 2 เป็นประชากรจากอำเภวารินชำราบ และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยประชากรจากอีก 7 อำเภอที่ศึกษา ได้แก่อำเภอโพธิ์สุวรรณ ราษีไศล ยางชุมน้อย เมืองศรีสะเกษ กันทรารมย์ ตระการพืชผล และตาลชุม ดังนั้นการวางแผนอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรปลาคูก้านบริเวณที่ศึกษา จึงควรอนุรักษ์ประชากรปลาคูก้านทั้ง 3 กลุ่มในบริเวณที่ศึกษาไว้เป็นแหล่งพันธุกรรมในถิ่นที่อยู่อาศัยเดิม โดยคำนึงถึงลักษณะภูมิประเทศกับสภาพแวดล้อมเพราะมีผลต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรม การถ่ายเทยีน หรือการเกิด genetic drift ในประชากรปลาคูก้านได้ ซึ่งการอนุรักษ์จะช่วยรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาคูก้านในอนาคต

### เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรรณิการ์ เชิดฉาย และชมพูนุช ประสานนาม. 2523. การศึกษาสถานภาพเกี่ยวกับทรัพยากรน้ำ  
ป่าไม้และแร่ จังหวัดศรีสะเกษ. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.  
40 น.
- กวี วรกวิน. 2547. แผนที่ความรู้ท้องถิ่นไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. บริษัทพัฒนาคุณภาพ  
วิชาการ (พว.) จำกัด, กรุงเทพฯ. 124 น.
- โกวิทย์ ทับที่สุด, ทรงวุฒิ ศรีเสน, ประยงค์ วัฒนานุกิตติ์, ชิด แสงน้อย และสุพิน วิติภูธรอักษร.  
2522. รายงานการสำรวจสภาพการใช้ที่ดินจังหวัดอุบลราชธานี. กรมพัฒนาที่ดิน  
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 33 น.
- เจดนั้น อมาตยกุล, สืบพงษ์ นัตร์มาลัย, สุรางค์ สุมโนจิตราภรณ์, ประดิษฐ์ ศรีภัทรประสิทธิ์,  
ยรรยงตัน ตาปกุล, สันติชัย รังสิยาภิรมย์, สง่า ลีสง่า, อัญชติ ตันติกุล, สุภรณ์ กิมสงวน  
และวัชรินทร์ รัตนชู. 2538. ปลาอุก. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์,  
กรุงเทพฯ. 171 น.
- ไชยา อัยสูงเนิน. 2531. การเลี้ยงปลาอุก. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน, กรุงเทพฯ. 72 น.
- ธีรพัฒน์ ทองคำ, วราวัฒน์ เตมียาจล, วีระศักดิ์ เทพอวยชัย และสุพิชัย ดิษฐบุตร. 2534.  
การศึกษาสถานะทรัพยากรประมงและเศรษฐกิจสังคมในแม่น้ำมูลตอนล่าง. การไฟฟ้าฝ่าย  
ผลิตแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 49 น.
- ธีรพัฒน์ ทองคำ, สรวงสุดา รัตนวิภาณนท์ และโสธรา พวงประโคน. 2535. การศึกษาคุณภาพน้ำ  
ในแม่น้ำมูลตอนล่างจังหวัดอุบลราชธานี. การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย, นนทบุรี.  
56 น.

- นุชรี มงคลเจริญมิตร. 2544. ผลกระทบของโครงการเขื่อนปากมูลต่อทรัพยากรธรรมชาติและสภาพเศรษฐกิจสังคมในจังหวัดอุบลราชธานี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิภาพร ก้านทอง. 2539. สภาวะหลากหลายรูปแบบของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอในปลาดุกอูย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ไมตรี ดวงสวัสดิ์ และสันทนา ดวงสวัสดิ์. 2535. ทรัพยากรประมงและสถานะการประมงในแม่น้ำมูล. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด, กรุงเทพฯ. 53 น.
- โยธิน ลีนานนท์. 2524. ชีวิตประวัติของปลาดุกด้าน. กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ. 50 น.
- ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547. ชีวิตวิทยาของเซลล์. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 250 น.
- วิทย์ ชารชานุกิจ, เวียง เชื้อโพธิ์หัก, ประวิทย์ สุรณีนาถ และอุทัยรัตน์ ณ นคร. 2530. การเพาะเลี้ยงปลาดุก. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 58 น.
- สันทนา ดวงสวัสดิ์, ถวัลย์ ชูขจร 2534. สภาวะการประมง ชนิด และการแพร่กระจายของปลาในแม่น้ำมูล. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ. 12 น.
- สันทนา ดวงสวัสดิ์, ถวัลย์ ชูขจร, จรัสธาดา กรรณสูต, บุญรัตน์ จันทร์สว่าง, โยธิน ลีนานนท์ และบุญส่ง ศรีเจริญธรรม. 2536. การสำรวจชนิดและปริมาณปลาในบริเวณที่จะก่อสร้างเขื่อนปากมูล. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ. 52 น.
- สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม. 2540. รายงานการประชุมเพื่อจัดสถานภาพทรัพยากรชีวภาพของประเทศไทย. กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ. 52 น.

- सनาน ริมาณิช. 2528. **แผนการใช้ที่ดินจังหวัดอุบลราชธานี**. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 70 น.
- สุเทพ ชุติรัตน์พันธุ์. 2527. **แผนการใช้ที่ดินจังหวัดศรีสะเกษ**. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 203 น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดี และเอเอฟแอลพี**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 116 น.
- อัชยา อรรถอินทรีย์. 2545. **ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดุกค้ำ (Clarias batrachus) ในประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2544. **ปลาดุก**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 140 น.
- อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2543. **พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 203 น.
- อรรถ สมร่าง, บัณฑิต ตันศิริ, พร้อมจิตร์ ตระกูลศิษฐ์, วลัยรัตน์ วรรณปิยะรัตน์, บุญรักษ์ พัฒนกัน และสุเทพ ชุติรัตน์พันธุ์. 2545. **การใช้เทคนิครีโมทเซนซิงและระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์เพื่อประเมินผลผลิตข้าวนาปี 2545**. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 76 น.
- Aboim, M.A., G.M. Menezes, T. Schlitt and A.D. Rogers. 2005. Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequence analysis. **Mol. Ecol.** 14: 1343-1354.
- Alberts, B., D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter. 2004. **Essential Cell Biology**. 2<sup>nd</sup> Ed. Garland Science, New York. p740.

- Alves, M., J.H. Coelho, M.J. Collares-pereira and M.M. Coelho. 2001. Mitochondrial DNA variation in the highly endangered cyprinid fish *Anaocypris hispanica*: importance for conservation. **Heredity** 87: 463-473.
- Amato, M.E.D and G.R. Carvalho. 2005. Population genetic structure and history of the long-tailed hake, *Macruronus magellanicus*, in the SW Atlantic as revealed by mtDNA RFLP analysis. **Journal of Marine Sci.** 62: 247-255.
- Aquadro, C.F. and B.D. Greenberg. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. **Genet.** 103: 287-312.
- Avise, J.C., G.S. Helfman, N.C. saunders and L.S. Hales. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 83: 4350-4354.
- Beaumont, A.R. and K. Hoare. 2003. **Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture.** Blackwell Science, UK. p158.
- Bermingham, E., T. Lamb and J.C. Avise. 1986. Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. **The Journal of Heredity** 77: 249-252.
- Brien, S.J.O. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91: 5748-5755.
- Brunner, P.C., M.R. Douglas and L. Bernatchez. 1998. Microsatellite and mitochondrial DNA assessment of population structure and stocking effects in Arctic char *Salvelinus alpinus* (teleostei: Salmonidae) from central Alpine lakes. **Mol. Ecol.** 7: 209-223.
- Brzuzan, P., M. Luczynski and P.A. Kuzniar. 1998. Mitochondrial DNA variation in two samples of northern pike, *Esox Lucius L.* **Aquaculture Res.** 29: 521-526.

- Camona, J.A., J. Dominguez and I. Doadrio. 2000. Congruence between allozyme and *Cytochrome b* gene sequence data in assessing genetic differentiation within the Iberian endemic *Chondrostoma lemmingii* (Pisces: Cyprinidae). **Heredity** 84: 721-732.
- Chapman, R.W., C.J.C. Patton and B. Eleby. 1994. Comparisons of Mitochondrial DNA Variation in Four *Alosa* Species as Revealed by the total Genome, The NADH Dehydrogenase I and *Cytochrome b* Regions, pp. 249-263. In P.W. Hochachka and T.P. Monnssen (ed.). **Molecular Biology Frontiers**. Elsevier Science Publishers, Netherlands.
- Chen, I.S., C.H. Hsu, C.F. Hui, K.T. Shao, P.J. Miller and L.S. Fang. 1998. Sequence length and variation in the mitochondrial control region of two freshwater gobiid fishes belonging to *Rhinogobius* (Teleostei: Gobioidae). **J. Fish Biol.** 53: 179-191.
- Chen, J.Z., P.D.N. Hebert. 1999. Intraindividual sequence diversity and a hierarchical approach to the study of mitochondrial DNA mutations. **Mutation Res.** 434: 205-217.
- Dias, C.K.S., C. Oliveira, R.E. Reis and F. Foresti. 2004. Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). **Mol. Phylogenet. Evolut.** 32: 152-163.
- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2005. **ARLEQUIN ver 3.0; an integrated software package for population genetics data analysis.** (Dept. of Zoology, Univ. of Berne, Switzerland).
- Felsenstein, J. 2002. **PHYLIP (phylogeny inference package) version 3.63.**  
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
- Frankham, R. 2003. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendus Biologies.** 326: 22-29.

- Frankham, R., J.D. Ballou and D.A. Briscoe. 2002. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge University press, UK. p617.
- Giddelo, C.S., A.D. Arndt and F.A.M. Volckaert. 2002. Impact of rifting and hydrography on the genetic structure of *Clarias gariepinus* in eastern Africa. **J. Fish Biol.** 60: 1252-1266.
- Halliburton, R. 2004. **Introduction to Population Genetics**. Pearson Prentice Hall, New Jersey. p650.
- Hansen, M.M. and K.D. Mensberg. 1998. Genetic differentiation and relationship between genetic and geographical distance in Danish sea trout (*Salmo trutta* L.) populations. **Heredity** 81: 493-504.
- Hedrick, P.W. 2000. **Genetics of populations**. 2<sup>nd</sup> Ed. Jones and Bartlett Publishers, London. p553.
- Hedrick, P.W. 2005. **Genetics of populations**. 3<sup>rd</sup> Ed. Jones and Bartlett Publishers, USA. p737.
- Hickerson, M.J. and J.R.P. Ross. 2001. Post-glacial population history and genetic structure of the northern clingfish (*Gobiosox maeandricus*), revealed from mtDNA analysis. **Marine Biology** 138: 407-419.
- Ikeda, M. and N. Taniguchi. 2002. Genetic variation and divergence in populations of ayu *Plecoglossus altivelis*, including endangered subspecies, inferred from PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA D-loop region. **Fisheries Sci.** 68: 18-26.

- Ikeda, M., M. Nunokawa and N. Taniguchi. 2003. Lack of mitochondrial gene flow between populations of the endangered amphidromous fish *Plecoglossus altivelis ryukyuensis* inhabiting Amami-Oshima Island. **Fisheries Sci.** 69: 1162-1168.
- Jones, M.W., D. Clay and R.G. Danzmann. 1996. Conservation genetics of brook trout (*Salvelinus fontinalis*): population structuring in Fundy National Park, New Brunswick, and eastern Canada. **Can. J. Fish Aquat. Sci.** 53: 2776-2791.
- Jondeung, A., P. Sangthong and R. Zardoya. 2007. The complete mitochondrial DNA sequence of the Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*), and the phylogenetic relationships among Siluriformes. **Gene** 387: 49-57.
- Kocher, T.D. and C.A. Stepien. 1997. **Molecules and morphology in studies of fish evolution.** Molecular systematics of Fishes. Academic press, San Diego. p313.
- Krieg, F., A. Triantafyllidis and R. Guyomard. 2000. Mitochondrial DNA variation in European populations of *Silurus glanis*. **J. Fish Biol.** 56: 713-724.
- Kubota, H. and K. Watanabe. 2003. Genetic diversity in wild and reared populations of the Japanese bitterling *Tanakia tanago* (Cyprinidae). **Ichthyological Res.** 50: 123-128.
- Lu, G., D.J. Basley and L. Bernatchez. 2001. Contrasting patterns of mitochondrial DNA and microsatellite introgressive hybridization between lineages of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*); relevance for speciation. **Mol. Ecol.** 10: 965-985.
- Mamuris, Z., M.T. Stoumboudi, C. stamatis, R. Barbicri and K.A. Moutou. 2005. Genetic variation in populations of the endangered fish *Ladigesocypris ghigii* and its implications for conservation. **Freshwater Biol.** 50: 1441-1453.

- Mccusker, M.R., E. Parkinson and E.B. Taylor. 2000. Mitochondrial DNA variation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across its native range: testing biogeographical hypotheses and their relevance to conservation. **Mol. Ecol.** 9: 2089-2108.
- Meyer, A., T.D. Kocher, P. Basasibwaki and A.C. Wilson. 1990. Monophyletic origin of lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. **Nature** 347: 550-553.
- Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes, pp. 1-38. In P.W. Hochachka and T.P. Monnsen (ed.). **Molecular Biology Frontiers**. Elsevier Science Publishers, Netherlands.
- Meyer, A. 1994. DNA technology and phylogeny of fish, pp. 219-249. In A.R. Beaumont (ed.). **Genetic and Evolution of Aquatic Organisms**. Chapman & Hall, London.
- Nei, M. and W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76: 5269-5273.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press, New York. p333.
- Randi, E. 2000. Mitochondrial DNA, pp. 136-167. In A.J. Baker (ed.). **Molecular Methods in Ecology**. Blackwell Science, London.
- Sell, J. and Z. Spirkovski. 2004. Mitochondrial DNA differentiation between two forms of trout *Salmo letnica*, endemic to the Balkan Lake Ohrid, reflects their reproductive isolation. **Mol. Ecol.** 13: 3633-3644.
- Smith, H.M. 1945. **The Fresh-water Fishes of Siam, or Thailand**. United States Government Printing office, Washington. p622.

- Sturmbauer, C. and A. Meyer. 1992. Genetic divergence, speciation and morphological stasis in a lineage of African cichlid fishes. **Nature** 358: 578-581.
- Takahashi, D. and K. Ohara. 2004. Genetic variations estimated from PCR-RFLP analysis of two morphs of the freshwater goby *Rhinogobius* in the Lake Biwa water system. **Ichthyological Res.** 51: 99-105.
- Verspoor, E., M. Sullivan, A. Arnold, D. Knox and P. Amiro. 2002. Restricted matrilineal gene flow and regional differentiation among Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations within the Bay of Fundy, eastern Canada. **Heredity** 89: 465-472.
- Vrijenhoek, R.C. 1998. Conservation genetics of freshwater fish. **J. Fish Biol.** 53: 394-412.
- Waters, J.M. and G.P. Wallis. 2001. Mitochondrial DNA phylogenetics of the *Galaxias vulgaris* complex from South Island, New Zealand: Rapid radiation of a species flock. **J. Fish Biol.** 58: 1166-1180.