



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และการประยุกต์ในการศึกษาพันธุศาสตร์
ประชากรปลาทู *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) และปลาลัง
R. kanagurta (Cuvier, 1816)

Development of Microsatellite Markers and Their Application in
Population Genetics Studies of Short Mackerel *Rastrelliger brachysoma*
(Bleeker, 1851) and Indian Mackerel *R. kanagurta* (Cuvier, 1816)

นามผู้วิจัย

นายณัฐ หมั่นพลศรี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สุภาวดี พุ่มพวง, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์วงศ์ปฐม กมลรัตน์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์วันศุกร์ เสนานานู, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วัน

เดือน

พ.ศ.

สิงสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และการประยุกต์ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร
ปลาทุ Rastrelliger brachysoma (Bleeker, 1851)
และปลาลัง R. kanagurta (Cuvier, 1816)

Development of Microsatellite Markers and Their Application in Population Genetics
Studies of Short Mackerel *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851)
and Indian Mackerel *R. kanagurta* (Cuvier, 1816)

โดย

นายณัฐ หมั่นพลศรี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2557

ณัฐ หมั่นพลศรี 2557: การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ และการประยุกต์ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรปลาทุบ *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) และปลาลัง *R. kanagurta* (Cuvier, 1816) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุภาวดี พุ่มพวง, Ph.D. 90 หน้า

การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจากปลาทุบเพื่อใช้ศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรปลาทุบและปลาลังทางฝั่งทะเลอันดามันของประเทศไทย เนื่องจากปลาทุบและปลาลังมีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากจึงใช้การวิเคราะห์ระบบ Truss ยืนยันการระบุชนิดปลา ตัวอย่างปลาทุบและปลาลังที่ใช้ศึกษาทั้งหมด 212 ตัว และ 201 ตัว มีขนาดความยาวเฉลี่ย 15.51 ± 1.14 เซนติเมตร และ 18.77 ± 1.19 เซนติเมตร ความกว้างลำตัวเฉลี่ย 4.31 ± 0.38 เซนติเมตร และ 4.64 ± 0.31 เซนติเมตร และ สัดส่วนความยาวเว้าหางต่อความกว้างลำตัว มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.60 ± 0.16 และ 4.04 ± 0.18 ตามลำดับ การแยกกลุ่มตัวอย่างปลาทั้งสองชนิดสามารถใช้ตัวประกอบหลัก (Principal Component: PC) เพียง 2 ตัว

การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์โดยวิธี Enriched-library ได้สุ่มเลือกโคลนผลบวก 64 โคลนไปวิเคราะห์และตรวจพบไมโครแซทเทลไลท์ 18 ตำแหน่ง ซึ่งออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ 11 ตำแหน่ง ผลการทดสอบไพรเมอร์พบว่ามีเพียง 6 ตำแหน่งที่มีเบสซ้ำแบบไดนิวคลีโอไทด์สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ การทดสอบคุณลักษณะของไพรเมอร์ทั้ง 6 ตำแหน่งในตัวอย่างปลาทุบจากอ่าวไทย 52 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งตั้งแต่ 4-10 อัลลีลเครื่องหมายทั้ง 6 ตำแหน่ง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาลังได้เช่นเดียวกัน แต่ปรากฏว่าเครื่องหมาย 2 ตำแหน่งไม่เป็นอิสระต่อกัน ($P < 0.05$) การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรปลาทุบและปลาลัง จึงใช้ไมโครแซทเทลไลท์เพียง 4 ตำแหน่งคือ *Rbr-7*, *Rbr-8*, *Rbr-13* และ *Rbr-14* ผลการศึกษาประชากรปลาทุบฝั่งอ่าวไทย (สมุทรสงครามและเพชรบุรี) และฝั่งทะเลอันดามัน (ระนองและสตูล) พบความหลากหลายทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันในระดับปานกลาง คือ จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งตั้งแต่ 5.75-7.00 อัลลีล ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตีตั้งแต่ 0.44-0.5 และมีค่าต่ำกว่าค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี ปลาทุบทั้ง 4 ประชากรไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ($F_{ST} = -0.0043$) แต่ผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้แบบ UPGMA ระหว่างปลาทุบ 4 ประชากรสามารถจัดกลุ่มปลาทุบจากอ่าวไทยและอันดามันแยกจากกันได้โดยมีค่า Bootstrap เท่ากับ 68.9 และ 71.2 ตามลำดับ ส่วนปลาลังทั้ง 4 ประชากรทางฝั่งอันดามัน (ระนอง พังงา ภูเก็ตและสตูล) มีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงใกล้เคียงกัน และสูงกว่าเมื่อเทียบกับปลาทุบ ปลาลังมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งตั้งแต่ 7.50-9.75 อัลลีล ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตีตั้งแต่ 0.64 -0.72 และมีค่าต่ำกว่าค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี และปลาลังทั้ง 4 ประชากรไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ($F_{ST} = 0.0073$)

Nut Munpholsri 2014: Development of Microsatellite Markers and Their Application in Population Genetics Studies of Short Mackerel *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) and Indian Mackerel *R. kanagurta* (Cuvier, 1816). Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Supawadee Poompuang, Ph.D. 90 pages

The aim of this study was to develop microsatellite markers for population genetics of *R. brachysoma* and its congener *R. kanagurta* from the Andaman Sea of Thailand. Because the two species share very similar morphology, Truss system analysis was used to confirm their identification. A total of 413 fish were measured. Mean values ($\pm$ SD) were 15.51 ± 1.14 cm and 18.77 ± 1.19 cm for fork length, 4.31 ± 0.38 cm and 4.64 ± 0.31 cm for body depth, and 3.60 ± 0.16 and 4.04 ± 0.18 for ratio between fork length and body depth of *R. brachysoma* and *R. kanagurta*, respectively. Two principal components clearly separated fish samples into two groups.

Microsatellites were isolated from an enriched library, of which 64 positive clones from 331 contained 18 microsatellite loci. Primers were designed for 11 loci and six loci with dinucleotide repeats amplified DNA samples of *R. brachysoma*. Characterization of these six loci in *R. brachysoma* from the Gulf of Thailand (N = 52) revealed that the average number of alleles per locus ranged from four to ten alleles. Cross-amplification of six microsatellites was observed in *R. kanagurta*. However, two loci were in linkage disequilibrium ($P < 0.05$). Population genetics studies of short mackerel and Indian mackerel were based on data from four loci, including *Rbr-7*, *Rbr-8*, *Rbr-13* and *Rbr-14*. All four populations of *R. brachysoma*, two from the Gulf of Thailand (Samutsongkram and Petchaburee) and two from the Andaman Sea (Ranong and Satul), displayed similar and moderate genetic variation with an average of 5.7 to 7 alleles per locus and average observed heterozygosity at all loci of 0.44 to 0.5. There was no genetic differentiation among populations ($F_{ST} = -0.0043$). Two groups of *R. brachysoma* were displayed by the UPGMA dendrogram, with bootstrap values of 68.9 and 71.2 respectively for the Gulf of Thailand and the Andaman Sea. Populations of Indian mackerel exhibited similar and relatively high levels of genetic variation an average of 7.50 to 9.75 alleles per locus and average observed heterozygosity at all loci of 0.64 to 0.72. There was no evidence to support genetic differentiation between the Andaman Sea populations of Indian mackerel ($F_{ST} = 0.0073$).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุภาวดี พุ่มพวง ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ดร.วงศ์ปฐม กมลรัตน์ ดร.วันศุกร์ เสนานาญ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ดูแลให้คำปรึกษา
ตลอดเวลาการทำงานวิจัย รวมถึงคำแนะนำในการเรียบเรียงรูปเล่มวิทยานิพนธ์ ขอกราบ
ขอบพระคุณ รศ.ดร.นนทวิทย์ อารีรักษ์ ประธานในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และดร.เชษฐ
เกษตรระทัต ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้ให้คำแนะนำในการแก้ไขเนื้อหาในเล่มเพิ่มเติม พร้อมคำ
อบรมแนะนำ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณคุณคุณฉลอง เหลืองทอง เจ้าของโป๊ะปลาทุแม่กลอง จ.สมุทรสงคราม และ
เจ้าหน้าที่ประมงศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงทะเลฝั่งอันดามัน กรมประมง จ.ภูเก็ต ที่ได้ช่วยรวบรวม
ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณ ผศ.ดร.ธนาทิพย์ แหลมคม จากมหาวิทยาลัย
อุบลราชธานี และพี่ๆ ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
บางเขน ที่ได้ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และเอื้อเฟื้อสถานที่ในระหว่างการพัฒนาเครื่องหมายไม-
โครแซทเทลไลท์ ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
กำแพงแสน ที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือวิจัยที่ครบครัน สถานที่วิจัยที่สะดวกปลอดภัยเป็นสังคมนักวิจัย
และเจ้าหน้าที่ศูนย์ฯ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกตลอดเวลาที่ข้าพเจ้าทำงานวิจัยอยู่ที่นี่ ขอขอบคุณ
สมาชิกห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพและจีโนมสัตว์น้ำ (A311) และเพื่อนๆ พี่ๆ จาก
ห้องปฏิบัติการข้างเคียงที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และกำลังใจตลอดเวลาโดยเฉพาะอย่างยิ่ง
Dr. Hugo Volkaert ที่คอยให้คำปรึกษาในการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ต่างๆ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนัก
พัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
กระทรวงศึกษาธิการ และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ทุน
ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปีการศึกษา 2555 สัญญาเลขที่ ภค./2555-ธท.08

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณการสนับสนุนและกำลังใจที่มีอยู่เสมอมาจากครอบครัวของ
ข้าพเจ้า

ณัฐ หมั่นพลศรี

กรกฎาคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	18
ผลและวิจารณ์	29
สรุปและข้อเสนอแนะ	53
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	55
ภาคผนวก	67
ภาคผนวก ก รูปภาพและตารางข้อมูล	68
ภาคผนวก ข บทความวิจัยที่ตีพิมพ์	77
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	90

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 จุดเก็บตัวอย่างปลาทุ (R. brachysoma) และปลาลัง (R. kanagurta)	18
2 ขนาดความยาวเฉลี่ย ความกว้างเฉลี่ย และสัดส่วนของความยาวต่อความกว้าง	29
3 ค่าไอเกน (λ) ของตัวประกอบหลัก ค่าร้อยละความแปรปรวน และค่าร้อยละความแปรปรวนสะสม	31
4 แสดงค่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Loading) ในแต่ละตัวประกอบหลัก (PC)	32
5 สภาพที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	36
6 คุณลักษณะเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และหมายเลข (Accession number)	37
7 เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่ง เมื่อทดสอบในปลาทุสมุทรสงคราม	38
8 ค่า P-value (เหนือแนวทแยง) และค่า S.E. ในการทดสอบความเป็นอิสระต่อกันของเครื่องหมาย 6 ตำแหน่ง ในปลาทุสมุทรสงครามจากโปรแกรม Genepop	39
9 คุณลักษณะเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่ง เมื่อทดสอบในปลาลังระนอง	40
10 ค่า P-value (เหนือแนวทแยง) และค่า S.E. ในการทดสอบความเป็นอิสระต่อกันของเครื่องหมาย 6 ตำแหน่ง ในปลาลังระนอง จากโปรแกรม Genepop version 4.2.2	40
11 ค่าระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทุ (R. brachysoma) เมื่อใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 4 ตำแหน่ง	44
12 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ปรับค่าแล้วของ Nei [Nei's unbiased measurement of genetic distance (1978)] จากโปรแกรม PopGene V.1.31. ค่า Pairwise F_{ST} จากโปรแกรม Genepop V.4.2 และค่า P-value ของ Pairwise F_{ST} ระหว่างปลาทุ 4 ประชากร จากโปรแกรม Arlequin V.3.11	45
13 ค่าสัมประสิทธิ์ F ในเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง ของข้อมูลปลาทุ (R. brachysoma) รวม 4 ประชากร	45
14 ค่าประมาณ N_e ของประชากรปลาทุจากโปรแกรม NeEstimator V.2.01	46
15 ค่าระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาลัง (R. kanagurta) เมื่อใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 4 ตำแหน่ง	50

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
16 ค่า Pairwise F_{ST} (เหนือแนวทแยง) จากโปรแกรม Genepop และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ปรับค่าแล้วของ Nei [Nei's unbiased measurement of genetic distance (1978)] ระหว่างปลาลัง (<i>R. kanagurta</i>) ทั้ง 4 ประชากร คำนวณโดยโปรแกรม PopGene V.1.3	51
17 ค่าสัมประสิทธิ์ F ในเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง ของข้อมูลปลาลัง (<i>R. kanagurta</i>) รวม 4 ประชากร	51
18 ค่าประมาณ N_e ของปลาลังจากโปรแกรม NeEstimator V.1.3	52
 ตารางผนวกที่	
1 ตารางเปรียบเทียบผลการศึกษาช่วงฤดูวางไข่ และขนาดความยาวแม่ปลาเมื่อเริ่มวางไข่ของปลาทุในทะเลอันดามัน	75
2 ข้อมูลแหล่งเก็บตัวอย่างปลาทุและปลาลังฝั่งทะเลอันดามัน	76

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ภาพปลาตัวเต็มวัย ก.ปลาทุ (R. brachysoma) ข.ปลาลัง (R. kanagurta)	4
2 การกระจายตัวของปลาทุและปลาลัง	7
3 จุดเก็บตัวอย่างปลาทุ (R. brachysoma) และปลาลัง (R. kanagurta)	19
4 บันทึกภาพตัวอย่างปลาเทียบกับไม้บรรทัด	20
5 การวิเคราะห์ข้อมูลสัณฐานวิทยาด้วยวิธี Truss network analysis พร้อมจุดที่กำหนดทั้ง 10 จุด และเส้นแสดงระยะห่างระหว่างจุดทั้ง 19 เส้น (เส้น A ถึง S)	20
6 แผนภาพแสดงค่าความแปรปรวน (λ) ของตัวประกอบหลัก (PC)	30
7 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Loading) ในแต่ละตัวประกอบหลัก (PC) แสดงบนตัวปลา	33
8 แผนภาพกระจายของการวิเคราะห์รูปร่างระหว่างปลาทุ (สัญลักษณ์ ○) และปลาลัง (สัญลักษณ์ △)	34
9 แผนภาพกระจายของการวิเคราะห์รูปร่างระหว่างปลาทุและปลาลัง 8 ประชากร (สัญลักษณ์ ●: ปลาทุสมุทรสงคราม, ■: ปลาทุเพชรบุรี, ◊: ปลาทุระนอง, △: ปลาทุตรัง, ○: ปลาลังระนอง, □: ปลาลังพังงา, ◇: ปลาลังภูเก็ต, △: ปลาลังสตูล)	34
10 แผนภูมิต้นไม้แบบ UPGMA ระหว่างปลาทุ 4 ประชากรสร้างโดยโปรแกรม TFPGA V.1.3	46
11 แผนภูมิต้นไม้แบบ UPGMA ระหว่างปลาลัง 4 ประชากรสร้างโดยโปรแกรม TFPGA V.1.3	52
12 แผนภูมิต้นไม้แบบ UPGMA ระหว่างปลาทุ 4 ประชากรและปลาลัง 4 ประชากรสร้างโดยโปรแกรม TFPGA V.1.3	52

ภาพผนวกที่

1 ปริมาณการจับปลาทุและปลาลังในน่านน้ำไทย ปีพ.ศ. 2542 ถึงปีพ.ศ. 2554	69
2 มูลค่าการทำประมงปลาทุและปลาลังในน่านน้ำไทย ปีพ.ศ. 2542 ถึงปีพ.ศ. 2554	69
3 สถิติการจับปลาทุและปลาลังฝั่งอ่าวไทย ปีพ.ศ. 2542 ถึงปีพ.ศ. 2554	70

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
4	สถิติการจับปลาและปลาลังฝั่งทะเลอันดามัน ปีพ.ศ. 2542 ถึงปีพ.ศ. 2554	70
5	แผนที่แสดงพื้นที่มาตรการอนุรักษ์ ทางฝั่งทะเลอันดามัน	71
6	การแบ่งเขตพื้นที่ทำการประมง ทางฝั่งอ่าวไทย	72
7	แบ่งเขตพื้นที่ทำการประมง ทางฝั่งทางฝั่งทะเลอันดามัน	73
8	ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอข้ามชนิด ด้วยเครื่องหมาย Rbr-12	74
9	ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอข้ามชนิด ด้วยเครื่องหมาย Rbr-13	74
10	ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอข้ามชนิด ด้วยเครื่องหมาย Rbr-14	74

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

λ	=	Eigenvalue
μg	=	Micogram
μl	=	Microlitre
A	=	Number of allele
Ar	=	Alleleic richness
bp	=	base pairs
ddH ₂ O	=	Double-distilled water
DNA	=	Deoxynucleic acid
dNTPs	=	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
g	=	Gram
H _E	=	Expected heterozygosity
H _O	=	Observed heterozygosity
HWE	=	Hardy-Weinberg Equilibrium
l	=	Litre
M	=	Molar
mg	=	Milligram
ml	=	Millilitre
mM	=	Millimolar
Ne	=	Effective population size
ng	=	Nanogram
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PC	=	Principal component
PCA	=	Principal component Analysis
SSR	=	Simple Sequence Repeat
SSLP	=	Simple Sequence Length Polymorphism
STMS	=	Sequence Tagged Microsatellite Site

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และการประยุกต์ในการศึกษาพันธุศาสตร์
ประชากรปลา *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851)
และปลาลัง *R. kanagurta* (Cuvier, 1816)

Development of Microsatellite Markers and Their Application in
Population Genetics Studies of Short Mackerel *Rastrelliger*
brachysoma (Bleeker, 1851) and Indian Mackerel
R. kanagurta (Cuvier, 1816)

คำนำ

ปลา *Rastrelliger brachysoma* และปลาลัง (*R. kanagurta*) เป็นทรัพยากรประมงที่สำคัญในน่านน้ำไทย ทั้งในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน ในปี พ.ศ. 2551 ปริมาณการจับปลาที่มีมูลค่า 3,300 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 24.5 ของมูลค่าปลาผิวน้ำทั้งหมดที่จับได้ โดยทางฝั่งทะเลอันดามันนั้นปลามีมูลค่าการจับสูงเป็นอันดับหนึ่งคิดเป็นร้อยละ 16.23 จากปลาผิวน้ำที่มีการทำประมงทั้งสิ้น 19 ชนิด อย่างไรก็ตามปริมาณปลาลัง ที่จับได้จากฝั่งทะเลอันดามันมีแนวโน้มลดลงตลอดช่วงเวลา 10 ปี ที่ผ่านมา โดยปริมาณปลาที่จับได้ในปี พ.ศ. 2551 มีปริมาณลดลงจากที่เคยจับได้ในปี พ.ศ. 2542 ถึงร้อยละ 29.89 (กรมประมง, 2553) การบริหารจัดการประมงที่มีประสิทธิภาพจึงมีความจำเป็นในการรักษากำลังผลิตของปลาให้ยั่งยืน ซึ่งแนวทางการบริหารจัดการทรัพยากรปลาและปลาลังที่กรมประมงซึ่งเป็นหน่วยงานผู้รับผิดชอบ ได้ดำเนินการมาโดยตลอด คือ การกำหนดห้ามใช้เครื่องมือทำการประมงบางชนิดในฤดูที่ปลาไข่ วางไข่และเลี้ยงตัวอ่อนในท้องที่บางแห่ง เช่น ในท้องที่ของเขตจังหวัด ภูเก็ต พังงา กระบี่และตรัง ซึ่งการออกมาตรการเหล่านี้กรมประมงได้ใช้ข้อมูลลักษณะทางชีววิทยา เช่น (1) ชีววิทยาการสืบพันธุ์ ได้แก่ ขนาดที่เริ่มสืบพันธุ์ (size at first maturity) อัตราส่วนเพศ (sex ratio) แหล่งวางไข่และฤดูวางไข่ (2) การแพร่กระจายและปริมาณลูกปลาวัยอ่อน และ (3) แหล่งเลี้ยงตัววัยอ่อน (ไพเราะ, 2541; ทศพล และคณะ 2550)

อย่างไรก็ตาม การบริหารจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำที่มีประสิทธิภาพและให้ยั่งยืน มีความจำเป็นต้องใช้ข้อมูลโครงสร้างของประชากรสัตว์น้ำนั้นๆ ด้วย เนื่องจากสัตว์น้ำที่อยู่ในแหล่งทำการประมงส่วนใหญ่เกิดจากหลายประชากร (Mixed stocks) ซึ่งอาจจะมีขนาดและโครงสร้างที่แตกต่างกันในแต่ละแหล่งและช่วงเวลา การบริหารการประมงโดยไม่ได้คำนึงถึงข้อเท็จจริงนี้อาจนำไปสู่การ

ล่มสลาย ดังมีตัวอย่างในปลาทะเลหลายชนิดในต่างประเทศ การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรจึงมีความสำคัญต่อการกำหนดแนวทางการจัดการบริการทรัพยากรประมง และเมื่อใช้ร่วมกับข้อมูลลักษณะทางชีววิทยา จะช่วยสนับสนุนให้การวางแผนการจัดการบริการทรัพยากรประมงมีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของปลาทุยยังมีน้อยมากและยังมีข้อมูลไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ส่วนในปลาลังยังไม่มีผู้ศึกษา ด้วยเหตุผลที่กล่าวมานี้จึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรปลาทุยและปลาลังในแหล่งประมงทางฝั่งทะเลอันดามันเพิ่มเติมเพื่อรวบรวมข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลเชิงปริมาณที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางชีววิทยาให้มากพอที่จะใช้ประโยชน์ในการจัดการทรัพยากรได้ชัดเจนขึ้น

การจัดการทรัพยากรประมงในปัจจุบันได้ใช้ประโยชน์จากเครื่องหมายดีเอ็นเอในการวิเคราะห์โครงสร้างประชากร ศึกษาการอพยพและการประเมินจำนวนประชากรที่เจริญพันธุ์ (Effective population size) ไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความนิยมใช้กันแพร่หลาย มีคุณลักษณะที่ดีกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นหลายประการ เช่น เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดข่มร่วม มีความหลากหลายอัลลีลสูง ผลที่ได้น่าเชื่อถือสามารถทำซ้ำได้ แม้ว่าการพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง แต่เป็นที่ยอมรับกันว่าการพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์เป็นการลงทุนที่คุ้มค่า สำหรับปลาในวงศ์สละคอมบริดีซึ่งมีปลาทุยเป็นสมาชิก ได้มีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในปลาชนิดอื่นๆ เช่น ปลา Spanish mackerel (*Scomberomorus brasiliensis*) (Renshaw *et al.* 2008) ปลา blue mackerel (*Scomber australasicus*) และ ปลา chub mackerel (*Scomber japonicus*) (Yagashita and Kobayashi, 2008; Tang *et al.* 2009) แต่ยังไม่มีการศึกษาในปลาทุย เนื่องจากปลาทุยและปลาลังมีลักษณะภายนอกค่อนข้างใกล้เคียงกัน ในขณะเก็บตัวอย่างอาจถูกระบุชนิดสลับกันได้ ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์ผลข้อมูลทางพันธุกรรมผิดพลาด เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าว จึงใช้การวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานช่วยแยกแยะที่ต่างกันระหว่างปลาทั้งสองชนิด

วัตถุประสงค์

1. พัฒนาชุดเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสำหรับปลาทุ และปลาลัง
2. ศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร และประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทุและปลาลังทางฝั่งทะเลอันดามัน



การตรวจเอกสาร

ชีวประวัติของปลาสกุลทู-ลิ่ง (*Rastrelliger* spp.)



ภาพที่ 1 ภาพปลาตัวเต็มวัย ก.ปลาทุ (*R. brachysoma*) ข.ปลาลัง (*R. kanagurta*)

ปลาทุและปลาลัง (ภาพที่ 1) จัดอยู่ในวงศ์สcombeบริดี (Family Scombridae) ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับ ปลาโอ ปลาหูฉลาม และปลาอินทรี อยู่ในสกุลราสเทรลลิเกอ (*Rastrelliger*) ซึ่งมีสมาชิกอยู่ 3 ชนิดได้แก่ ปลาทุ *R. brachysoma* (Bleeker, 1851) ปลาลัง *R. kanagurta* (Cuvier, 1816) และ ปลาลังปากจิ้งจก *R. faughni* (Matsui, 1967) มีการแพร่กระจายทั่วไปในทะเลเขตร้อนแถบอินโดแปซิฟิก และมหาสมุทรอินเดีย รวมทั้งในน่านน้ำไทยทั้งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน (ภาพที่ 2) อาศัยรวมกันเป็นฝูงบริเวณกลางน้ำถึงผิวน้ำ ตั้งแต่บริเวณชายฝั่งถึงความลึกระดับ 200 เมตร อุณหภูมิผิวน้ำอยู่ในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส (Carpenter and Niem, 2001) ปลาทุและปลาลัง เป็นปลาผิวน้ำสองชนิดในสกุลนี้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย ส่วนปลาลังปากจิ้งจกพบได้น้อยมาก (ทัศนพล และคณะ 2550)

ในปี พ.ศ. 2551 การทำประมงปลาทุและปลาลังมีปริมาณการจับรวมกันเท่ากับ 202,000 ตันเป็นมูลค่ากว่า 7,111 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 40 ของมูลค่าการจับปลาผิวน้ำทั้งหมด จากสถิติการทำประมงของกรมประมงการทำประมงปลาทุและปลาลังเคยมีปริมาณสูงถึง 212,000 ตันในปี พ.ศ. 2542 และ พ.ศ. 2548 แต่หลังจากนั้นในปีต่อมาปริมาณการจับก็จะค่อยๆ ลดลงจนเคยต่ำสุดที่ 145,000 ตัน หรือคิดเป็นร้อยละ 68 ของปริมาณที่เคยจับได้สูงสุด เมื่อพิจารณาแยกฝั่งทะเลพบว่า ปริมาณการจับจากฝั่งอ่าวไทยมีแนวโน้มลดลงตลอดช่วงเวลาสิบปีจาก 150,000 ตัน ในปี พ.ศ. 2542 เหลือ 93,859 ตันในปี พ.ศ. 2552 แต่อีกสองปีต่อมาปริมาณการจับก็พุ่งสูงขึ้นไปถึง 116,769 ตันในปี พ.ศ. 2554 หรือเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 77 ส่วนปริมาณการจับทางฝั่งทะเลอันดามันนั้นมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับฝั่งอ่าวไทย และมีปริมาณการจับที่ผันผวนในแต่ละปีอยู่ในช่วง 35,000 ถึง 75,000 ตัน

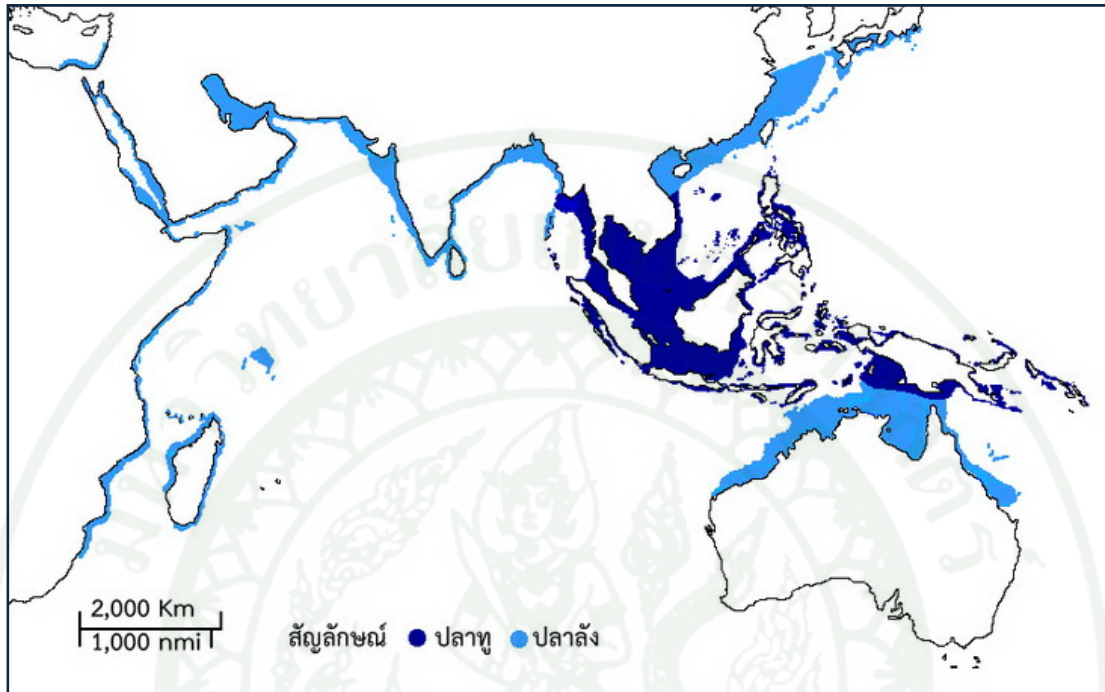
ปลาทุมมีรูปร่างเพรียวยาวคล้ายกระสวย จะงอยปากแหลม มีฟันละเอียดบนขากรรไกรทั้งสอง ไม่มีฟันบนเพดานปาก เกล็ดโดยทั่วไปขนาดเล็ก ยกเว้นเกล็ดบริเวณแก้ม ใต้ครีบอก และท้องจะมีขนาดใหญ่กว่า ครีบหลังมีสองครีบ ครีบหลังอันแรกมีก้านครีบแข็ง 10-11 ก้าน ครีบหลังที่สองมีก้านครีบอ่อน 12-13 ก้าน ครีบกันมีก้านครีบอ่อน 12 ก้าน ถัดจากครีบหลังและครีบกัน เป็นครีบฝอยข้างละ 5 ครีบ หางรูปแฉกเว้าลึก สีพื้นลำตัวด้านบนเป็นสีเขียว ด้านท้องเป็นสีเงินวาว มีจุดสีดำใต้ฐานครีบหลัง เรียงกัน 12-14 จุด ครีบทุกครีบมีสีขาวยellow ยกเว้นครีบหลังอันแรกและครีบหางมีสีคล้ำ ส่วนปลาลัง (*R. kanagurta*) มีรูปร่างคล้ายปลาทุมมาก จนบางครั้งแยกจากกันได้ยาก แต่ลักษณะเด่นคือตาโตกว่า ลำตัวเรียวยาวกว่า และจุดสีดำที่ฐานครีบหลังมีประมาณ 16 จุด (กรมประมง, 2507) นอกจากนี้จุดแตกต่างระหว่างรูปร่างปลาทั้งสองเมื่อพิจารณาจากภายนอกคือ ปลาทุมจะมีช่วงหัวยาวน้อยกว่าหรือเท่ากับความลึกลำตัว สัดส่วนความยาวส้อมหางต่อความลึกลำตัวบริเวณช่องเปิดเหงือกมีค่า 3.7 - 4.3 ขณะที่ปลาลัง มีช่วงหัวยาวมากกว่าความลึกลำตัว สัดส่วนความยาวส้อมหางต่อความลึกลำตัวบริเวณช่องเปิดเหงือกมีค่า 4.3 - 5.2 และเมื่อพิจารณาความยาวลำไส้กับความยาวส้อมหาง ปลาทุมจะมีลำไส้ยาว 3.2 - 3.6 เท่าของความยาวส้อมหาง ส่วนปลาลังจะมีค่าเพียง 1.4 - 1.8 เท่า (Carpenter and Niem, 2001)

นอกจากความคล้ายคลึงของลักษณะร่างกายภายนอกแล้ว ในระดับพันธุกรรมปลาทุมและปลาลังมีขนาดไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอใกล้เคียงกันมาก ปลาทุมมีขนาด 16,539 bp และปลาลังมีขนาด 16,537 bp (Chen *et al.*, 2013; Jondeung and Karinthanyakit, 2010) เมื่อเทียบกับปลาชนิดอื่นในวงศ์เดียวกัน ปลา Atlantic chub mackerel (*Scomber colias*) มีขนาด 16,568 bp ปลา chub mackerel (*S. japonicas*) และปลา blue mackerel (*S. australasicus*) มีขนาดเท่ากันที่ 16,570 bp (Catanese *et al.*, 2010) ส่วนปลา Atlantic bluefin tuna (*Thynnus thynnus*) มีขนาด 16,526 bp (Manchado *et al.*, 2004) ปลา Australian spotted mackerel (*Scomberomorus munroi*) มีขนาด 16,796 bp ปลา broadbarred king mackerel (*Scomberomorus semifasciatus*) มีขนาด 16,548 bp (Morgan *et al.*, 2013) ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของปลาทุม และปลาลัง มีการเรียงตัวของยีนสอดคล้องกับสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไป มีองค์ประกอบคือ rRNA 2 ยีน tRNA 22 ยีน ยีนที่แปรหัสเป็นโปรตีน 13 ยีน และส่วนที่ไม่มีการแปรหัส (control region และ D-loop) (Chen *et al.*, 2013; Jondeung and Karinthanyakit, 2010) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างปลาทั้งสองชนิด โดยเปรียบเทียบส่วนของยีน *cytB* และยีน *nd2* พบปลาทั้งสองถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันบนแผนภาพต้นไม้ และมีความใกล้ชิดกับปลาสกุล *Scomber* มากที่สุด (Jondeung and Karinthanyakit, 2010)

การศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ปลาหูหางผีทะเลอันดามันของ ทศพล (2550) ได้เสนอสมการความสัมพันธ์ระหว่างความยาวตลอดตัวกับน้ำหนักตัวเท่ากับ $W=0.0142TL^{2.9402}$ และพบว่าปลาหูมีการวางไข่เกือบตลอดทั้งปี แต่มี 2 ช่วงใหญ่คือ ระหว่างเดือน พฤศจิกายน ถึงพฤษภาคม และระหว่างเดือนกรกฎาคม ถึงกันยายน ส่วนการศึกษาของ ไพเราะ (2531) พบว่าฤดูวางไข่ของปลาหูในเขตการประมงที่ 1 เริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ หอยวางไข่เรื่อยไปถึงกรกฎาคม ส่วนในเขตการประมงที่ 2 และ 3 พบการวางไข่แบ่งเป็น 2 ช่วง ในเขตที่ 2 ช่วงแรกเริ่มจากเดือนธันวาคม ถึงมิถุนายน ช่วงที่สองเริ่มจากเดือนสิงหาคม ถึงพฤศจิกายน สำหรับในเขตที่ 3 มีช่วงเวลาใกล้เคียงกัน ช่วงแรกเริ่มจากเดือนธันวาคม ถึงมีนาคม ช่วงที่สองเริ่มจากเดือนพฤษภาคม ถึงพฤศจิกายน ส่วนขนาดความยาวแม่ปลาที่เริ่มวางไข่ครั้งแรกในเขตการประมงที่ 1 มีค่าเท่ากับ 19.0 เซนติเมตร ส่วนในเขตที่ 2 และ 3 มีค่าใกล้เคียงกันคือ 17.8 และ 17.9 เซนติเมตร ตามลำดับ ต่อมาในปี 2541 ไพเราะ ได้ศึกษาชีววิทยาปลาหูหางผีทะเลอันดามันอีกครั้ง โดยรวบรวมข้อมูลตั้งแต่ปี พ.ศ. 2529-2538 รวมเวลา 10 ปี ใช้ตัวอย่างปลาหูทั้งหมด 32,737 ตัว พบว่ามีความเปลี่ยนแปลงของช่วงเวลาวางไข่ในแต่ละเขตแต่ละปี สอดคล้องกับผลการศึกษาในอ่าวไทย ที่พบว่าอาจจะช้าหรือเร็วกว่าเดิมประมาณ 1 เดือน (พัชรี และนพรัตน์, 2545) โดยทางฝั่งอันดามันนี้พบว่าอาจมีการวางไข่ก่อนหรือหลัง 1-3 เดือน ซึ่งความคลาดเคลื่อนนี้อาจเกิดจากความผันแปรของสิ่งแวดล้อมในแต่ละปี จึงเป็นการยากที่จะระบุช่วงเวลาการวางไข่ที่แน่นอนในแต่ละปีของปลาหูในสามเขตการประมงนี้ ส่วนผลการศึกษานขนาดแรกเริ่มสืบพันธุ์ยังคงสอดคล้องกับการศึกษาเดิมคือ ในเขตการประมงที่ 1 (19.3 เซนติเมตร) มีขนาดแตกต่างจากเขตการประมงที่ 2 และ 3 (16.95 และ 16.79 เซนติเมตร ตามลำดับ) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกัน จากข้อมูลช่วงเวลาการวางไข่ และขนาดแม่ปลาเมื่อเริ่มวางไข่ จะพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรจากฝั่งอันดามันตอนบน (เขตการประมงที่ 1) และฝั่งอันดามันตอนล่าง (เขตการประมงที่ 2 และ 3) ซึ่งความต่างนี้อาจเกิดจากการมีกลุ่มประชากรปลาหูที่ต่างกัน (ไพเราะ, 2541)

มีการศึกษาพฤติกรรมการอพยพของปลาหูหางผีทะเลอันดามันของ ดำริห์ และคณะ (2527) โดยการปล่อยปลาหูที่ติดเครื่องหมายและจับคืน ได้ทำการทดลองในเขตการประมงที่ 2 และ 3 ผลพบว่าปลาที่จับคืนได้จะเดินทางวนเวียนใกล้จุดที่ปล่อย (รัศมี 7-10 ไมล์ทะเล) และมีแนวโน้มเคลื่อนที่เข้าหาฝั่ง ในเขตการประมงที่ 2 นั้นจะจับคืนได้ในบริเวณ เกาะยาวใหญ่ เกาะพิพิตอน เกาะลันตาใหญ่ ที่มีระดับน้ำตื้นและมีเกาะแก่งมากมาย ส่วนในเขตการประมงที่ 3 พบว่าช่วงเดือนมกราคม ถึงมีนาคม ปลาหูส่วนใหญ่จะเดินทางไปในทิศตะวันออกเฉียงเหนือเข้าสู่่านน้ำจังหวัดตรัง ส่วนเดือนเมษายน ถึงพฤษภาคมจะเดินทางขนานแนวชายฝั่งลงไปทางทิศตะวันตกเฉียงใต้เข้าสู่

น่านน้ำประเทศมาเลเซีย การศึกษาไม่พบการเดินทางข้ามระหว่างเขตการประมงที่ 2 และ 3 จึงคาดว่าน่าจะเป็นปลาหูต่างกลุ่มประชากรกัน



ภาพที่ 2 การกระจายตัวของปลาหูและปลาลัง

ที่มา: ดัดแปลงจาก <http://www.fao.org/figis/geoserver/factsheets/species.html?species=RAB-m&prj=4326>

การจำแนกชนิดปลาโดยใช้ข้อมูลสัณฐานวิทยา

วิธี Truss network analysis

การวิเคราะห์ข้อมูลสัณฐานวิทยาด้วยวิธี TRUSS network analysis เป็นการศึกษาสัณฐานวิทยาเชิงเรขาคณิต (Geometric morphometrics) โดยจะวัดความแตกต่างของรูปร่าง (body form) แบบต่างๆ แทนการวัดเพียงระยะห่างระหว่างจุดสังเกตแต่ละจุดแบบเดิมเริ่มต้นโดยกำหนดจุดสังเกต (landmark) ที่สังเกตได้ง่าย และมีร่วมกันในทุกตัวอย่างที่ศึกษา ให้ครอบคลุมตัวปลา จากนั้นลากเส้นเป็นโครงร่างครอบคลุมทั่วร่างกาย ให้แสดงถึงรูปร่างของปลาที่ศึกษา แล้ววัดความยาวของเส้นโครงร่างเหล่านั้น (Jayasankar *et al.*, 2004; Strauss and Bookstein, 1982)

การศึกษา Truss Network อาศัยการวิเคราะห์ตัวประกอบหลัก (Principal Component Analysis) เป็นหลักทางสถิติในการลดจำนวนตัวแปรที่มีมากเกินไป ให้เหลือเพียงตัวแปรหลักที่มีจำนวนลดลงและสามารถอธิบายความแปรปรวนของข้อมูลชุดเดิมที่ต้องการศึกษานั้นได้สะดวกขึ้น โดยตัวแปรใหม่ที่สร้างขึ้นเป็นฟังก์ชันเชิงเส้นของตัวแปรเดิม และมีจำนวนน้อยกว่าหรือเท่ากับจำนวนตัวแปรเดิม ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีตัวแปรจำนวนมาก ตัวแปรใหม่ หรือตัวประกอบหลัก (PC) จะถูกสร้างจากการรวบรวมเอาค่าความแปรปรวนจากตัวแปรเดิมทุกตัวมาไว้ใน ตัวประกอบหลักตัวแรก (PC_1) ให้มากที่สุด ส่วนตัวประกอบหลักตัวที่สอง (PC_2) จนถึงตัวประกอบหลักตัวสุดท้าย ($PC_{\text{สุดท้าย}}$) ก็จะรวบรวมเอาค่าความแปรปรวนส่วนที่เหลือ และตัวประกอบหลักเหล่านี้จะมีความสัมพันธ์กัน จากวิธีการนี้ค่าความแปรปรวนของตัวประกอบหลักตัวแรก (PC_1) จะมีค่าสูงที่สุด และลดหลั่นลงไปจนถึงตัวประกอบหลักตัวสุดท้าย ($PC_{\text{สุดท้าย}}$) (กัลยา, 2548)

ค่าความแปรปรวนของตัวประกอบหลักแต่ละตัวเรียกว่า Eigenvalue (λ) เพื่อบอกว่าตัวประกอบหลักนั้นจะสามารถอธิบายความผันแปรแทนตัวแปรเดิมได้มากน้อยเพียงใด ส่วนการพิจารณาจำนวนตัวประกอบหลักที่เหมาะสม จะพิจารณาจากจำนวนตัวประกอบหลักลำดับต้นที่มีสัดส่วนค่าความแปรปรวนสะสมอย่างต่ำร้อยละ 80 หรือตัวประกอบหลักลำดับต้นที่มีค่าความแปรปรวนสูงกว่าค่าความแปรปรวนเฉลี่ย และเนื่องจากตัวประกอบหลักที่สร้างใหม่เกิดจากการรวมเอาความแปรปรวนของตัวแปรเดิมเอาไว้ ค่าที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรเก่าและใหม่นี้เรียกว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Loading) ซึ่งจะแสดงถึงอิทธิพลของตัวแปรเดิมแต่ละตัวที่มีต่อตัวประกอบหลักนั้น ในตัวประกอบหลักใดๆ ถ้าค่า loading ของตัวแปรเดิมตัวใดมีค่ามาก (มากกว่า 0.5) แสดงว่าตัวแปรเดิมนั้นมีอิทธิพลมากในการสร้างตัวประกอบหลักนั้น ซึ่งจะถูกใช้เป็นคำอธิบายความหมายของตัวประกอบหลักนั้นๆ ด้วย (กัลยา, 2548)

ตัวอย่างการใช้ข้อมูลพื้นฐานในการศึกษารูปร่างปลาเช่น การศึกษาโครงสร้างประชากรปลาลังของอินเดียใช้ข้อมูลพื้นฐานจากวิธี TRUSS network analysis ร่วมกับข้อมูลพันธุกรรมจากเครื่องหมาย RAPD พบว่าความแปรปรวนของรูปร่างปลาลังจากอินเดีย เกิดจากสัดส่วนความกว้างของลำตัวช่วงครีบหลังที่สองถึงครีบกัน แต่ไม่พบความแตกต่างในระดับพันธุกรรม (Jayasankar *et al.*, 2004) การศึกษาปลาซาร์ดีน (*Sardina pilchardus*) ด้วยข้อมูลพื้นฐานจากวิธี TRUSS network analysis พบความแตกต่างของรูปร่างปลาระหว่างประชากรตอนเหนือและตอนใต้ของชายฝั่งทะเลแอตแลนติกของโมร็อกโก แต่ข้อมูลพันธุกรรมจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 4 ตำแหน่ง และลำดับเบสส่วน control region ในไมโทคอนเดรียแสดงว่าทั้งหมดเป็นประชากรเดียวกัน (Baibai *et al.*, 2012)

การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร

พันธุศาสตร์ประชากรเป็นการศึกษาองค์ประกอบ และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของประชากร ที่เกิดจากปัจจัยต่างๆ โดยเน้นศึกษาความถี่ยีน และสาเหตุการเปลี่ยนแปลงความถี่ยีน (สมชัย และ พิระศักดิ์, 2546; อุทัยรัตน์, 2543) โดยความเข้าใจในกระบวนการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมระดับประชากรนี้ทำให้นักเพาะเลี้ยง นักจัดการทรัพยากร หรือนักอนุรักษ์สามารถวางแผนการจัดการประชากรสัตว์น้ำในทิศทางที่จะรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ (วันศุกร์, 2551)

ประชากรในอุดมคติสำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ตามที่ฮาร์ดีและไวน์เบิร์กกล่าวไว้มีเงื่อนไขคือ 1) เป็นประชากรขนาดใหญ่ 2) มีการผสมพันธุ์อย่างสุ่ม 3) ไม่มีการคัดเลือกทั้งทางตรงและทางอ้อม 4) ไม่มีการกลายพันธุ์ และ 5) สมาชิกไม่มีการอพยพเข้าออก หากประชากรอยู่ในเงื่อนไขนี้แล้วจะทำให้ความถี่ยีน และความถี่จีโนไทป์คงที่ในทุกชั่วอายุ (อุทัยรัตน์, 2543)

โครงสร้างของประชากร เกิดจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันถูกแยกออกเป็นกลุ่มประชากรย่อย และลดระดับการถ่ายเทยีนระหว่างกัน เนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น สิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ ระยะห่างระหว่างถิ่นครอบครองของแต่ละประชากร พฤติกรรมการอพยพ เป็นต้น โครงสร้างที่เกิดขึ้นสามารถอธิบายได้ด้วยแบบจำลองหลายแบบ เช่น Mainland-island model, Island model, Stepping stone model และ Metapopulation model (Frankham, 2002)

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร ใช้ตัวแปรหลายตัว ได้แก่

จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (Average number of allele per locus) โดยนับจำนวนอัลลีลที่มีทั้งหมดจากเครื่องหมายทุกตำแหน่ง แล้วหารด้วยจำนวนตำแหน่งเครื่องหมายทั้งหมด

ค่า Allelic richness (A_r) บอกถึงจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่เป็นอิสระจากจำนวนตัวอย่าง ใช้เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลในกรณีที่ตัวอย่างมีจำนวนไม่เท่ากัน (Kalinowski, 2004)

ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (Heterozygosity) บอกจำนวนความถี่ยีนที่มีสภาพเป็นเฮเทอโรไซกัส แบ่งได้เป็นสองค่าคือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (observed heterozygosity, H_O) ที่ได้จากการนับจำนวนตัวอย่างโดยตรงที่มีสภาพเป็นเฮเทอโรไซกัส และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหมาย (expected heterozygosity, H_E) ที่ได้จากการคำนวณจากความถี่อัลลีล โดยตั้งสมมติฐานว่าประชากรนั้นอยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

ส่วนค่าที่ใช้แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ได้แก่

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ได้จากการวัดความแตกต่างทางพันธุกรรมของความถี่อัลลีลของสองประชากร (Frankham *et al.*, 2002)

ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficients) แสดงถึงความสัมพันธ์ของอัลลีลภายในประชากร ซึ่งสามารถบอกได้ว่าประชากรนั้นแบ่งออกเป็นประชากรย่อยหรือไม่ โดยแบ่งความผันแปรทางพันธุกรรมเป็นระดับสามระดับ ระดับประชากรทั้งหมด ระดับประชากรย่อย และระดับตัวอย่าง

F_{ST} เป็นค่าที่วัดระดับความแตกต่างของความถี่อัลลีลในประชากรต่างๆ เพื่อดูว่ามี การแบ่งเป็นประชากรย่อยจริงหรือไม่

F_{IS} และ F_{IT} เป็นค่าที่วัดระดับความเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรย่อย และประชากรทั้งหมด ตามลำดับ หากมีค่าเป็นบวกแสดงถึงมีความถี่ของเฮเทอโรไซโกตน้อยกว่าที่ควร ซึ่งอาจเป็นผลของการผสมเลือดชิดในประชากร หรือการรวมตัวอย่างมากกว่าหนึ่งแหล่งเข้าด้วยกัน (Wahlund's effect) แต่หากมีค่าเป็นลบหมายถึงมีความถี่ของเฮเทอโรไซโกตมากกว่าที่ควรจะเป็น มีสูตรคำนวณดังนี้ (Allendorf and Luikart, 2007)

$$F_{ST} = 1 - (H_S/H_T) \quad (1)$$

$$F_{IS} = 1 - (H_O/H_S) \quad (2)$$

$$F_{IT} = 1 - (H_O/H_T) \quad (3)$$

เมื่อ H_S เป็นค่าเฉลี่ยของค่าคาดหวังเฮตเทอไซโกซิตีของแต่ละประชากรย่อย

เมื่อ H_T เป็นค่าเฉลี่ยของค่าคาดหวังเฮตเทอไซโกซิตีรวมทั้งประชากร

เมื่อ H_O เป็นค่าเฉลี่ยของค่าสังเกตเฮตเทอไซโกซิตีของแต่ละประชากรย่อย

นอกจากใช้ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมแล้วยังมีค่าอื่นๆ ที่ใช้ประเมินสถานะทางพันธุกรรมของประชากรปลาที่ศึกษา ดังนี้

ค่า Effective population size (N_e) เป็นค่าที่สะท้อนจำนวนสมาชิกที่มีโอกาสถ่ายทอดพันธุกรรมสู่รุ่นต่อไปสำเร็จ แสดงถึงจำนวนพ่อแม่พันธุ์ในประชากรนั้น ใช้เพื่อคำนวณความยั่งยืนของประชากรปลา ค่านี้จะต่ำกว่าจำนวนประชากรจากการเจนนับ สิ่งที่มีผลต่อค่า N_e ได้แก่ สัดส่วนเพศของพ่อแม่พันธุ์ จำนวนลูกที่ได้จากแต่ละครอบครัวที่ไม่เท่ากัน จำนวนพ่อแม่พันธุ์ในแต่ละชั่วอายุที่ไม่เท่ากัน การมีชั่วอายุที่มากกว่าหนึ่งชั่วปนกันในประชากร (Allendorf and Luikart, 2007)

การทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบอร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) เพื่อดูว่าประชากรที่ศึกษานั้นได้รับอิทธิพลจากสาเหตุใดบ้างที่ทำให้พันธุกรรมของประชากรนั้นเปลี่ยนแปลง ประชากรตามทฤษฎีของฮาร์ดีและไวน์เบอร์กนี้มีเงื่อนไขอยู่ 5 ประการคือ 1) ประชากรมีขนาดใหญ่ 2) มีการผสมพันธุ์อย่างสุ่ม 3) ไม่มีการคัดเลือก 4) ไม่มีการกลายเกิดขึ้น และ 5) ประชากรไม่มีการอพยพ หากเป็นไปตามเงื่อนไขเหล่านี้แล้วประชากรนั้นจะมีความถี่ยีน และความถี่อัลลีลคงที่จากชั่วอายุหนึ่งสู่ชั่วอายุหนึ่ง เรียกว่าประชากรนั้นอยู่ในสมดุลฮาร์ดีและไวน์เบอร์ก แต่ในความเป็นจริงแล้วประชากรในธรรมชาติอาจจะไม่เป็นไปตามเงื่อนไขทั้งหมด (Allendorf and Luikart, 2007)

การทดสอบความเป็นอิสระของเครื่องหมาย (Linkage disequilibrium) เป็นการทดสอบว่าจีโนไทป์ที่เครื่องหมายตำแหน่งหนึ่งเป็นอิสระจากจีโนไทป์ของเครื่องหมายตำแหน่งอื่นหรือไม่ หากเครื่องหมายที่ศึกษาไม่เป็นอิสระต่อกันแล้ว การนำเครื่องหมายนั้นมาใช้ก็ไม่มีประโยชน์

การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรปลาทะเล

ปลาทะเลทั่วไปทั้งปลาหน้าดินและปลาผิวน้ำมักพบความแตกต่างระหว่างประชากรน้อยหรือเป็นประชากรเดียว เนื่องจากปัจจัยชีววิทยาหลายประการ เช่น มีประชากรขนาดใหญ่ การแพร่กระจายของไข่และลูกปลาวัยอ่อนเป็นระยะไกล และปัจจัยภูมิศาสตร์ เช่น การไหลของกระแสน้ำ และการที่ไม่มีสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ ปัจจัยเหล่านี้ล้วนเกื้อหนุนให้มีการถ่ายเทยีนระหว่างประชากร ทำให้ไม่มีความแตกต่างระหว่างประชากร หรือมีโครงสร้างประชากรที่ไม่ชัดเจนซึ่งมีรายงานในปลาหลายชนิด เช่น ปลา Red snapper (*Lutjanus campechanus*) จากบริเวณแหลมฟลอริดาและอ่าวเม็กซิโก ซึ่ง Gerber *et al.* (2004) ยืนยันด้วยผลการศึกษาในส่วนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอว่าปลาในบริเวณที่เก็บตัวอย่างทั้งหมดเป็นประชากรเดียว ส่วนปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*) โดย Carr *et al.* (1995) ศึกษาโครงสร้างในแหล่งประมงสองแหล่งบริเวณ Newfoundland ประเทศแคนาดา ทั้งนี้เคยมีรายงานว่าประชากรในอ่าว Trinity Bay มีการอพยพและมีพฤติกรรมวางไข่ที่แตกต่างจากประชากรบริเวณชายฝั่ง Grand Bank แต่จากการวิเคราะห์ ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างปลาทั้งสองกลุ่ม นอกจากนี้มีหลักฐานสนับสนุนจากการทำเครื่องหมายกายภาพ จึงคาดว่าปลาทั้งสองกลุ่มมีการเคลื่อนย้ายระหว่างกลุ่มค่อนข้างสม่ำเสมอ

ในประชากรปลา Walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) นั้นมีรายงานว่าพบความแตกต่างเล็กน้อยระหว่างประชากรที่อยู่ใกล้ชิดกัน ในบริเวณมหาสมุทรแปซิฟิกเหนือและทะเลแบเร็นตส์บริเวณรัฐอะลาสกา แต่มีความต่างสูงระหว่างประชากรที่ห่างกันมาก (ประชากรจากประเทศญี่ปุ่น เทียบกับประเทศสหรัฐอเมริกา) และสรุปว่าประชากรปลากลุ่มนี้มีรูปแบบการถ่ายเทยีนแบบ stepping-stone model (O'Reilly *et al.*, 2004)

สำหรับปลาในวงศ์สคอมบริดีมีตัวอย่างการศึกษาโดย Zardoya *et al.* (2004) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ control region บนไมโทคอนเดรีย ขนาด 272 คู่เบสในปลา Mackerel (*Scomber scombrus*) และขนาด 387 คู่เบสในปลา Chub mackerel (*S. japonicus*) เพื่อศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของปลาทั้งคูในทะเลเมดิเตอร์เรเนียนที่ครอบคลุมตั้งแต่ประเทศกรีซ อิตาลี ถึงประเทศสเปน ซึ่งปลาทั้งสองชนิดเป็นปลาที่อยู่รอบครีวเดียวกับปลาทู ผลการศึกษาพบว่ามีการถ่ายเทยีนระหว่างปลา Chub mackerel ในทะเลเมดิเตอร์เรเนียนและประชากรมหาสมุทรแอตแลนติกทำให้ปลาทั้งสองแหล่งไม่มีความแตกต่างระหว่างประชากร ในขณะที่ปลา Mackerel ที่อาศัยในบริเวณเดียวกันแบ่งเป็นกลุ่มย่อยสองกลุ่มคือ กลุ่มเมดิเตอร์เรเนียนตะวันออก (กรีซ-อิตาลี) และกลุ่มเมดิเตอร์เรเนียนตะวันตก (สเปน) ซึ่งประชากรกลุ่มสเปนไม่มีความแตกต่างกับประชากรใน

มหาสมุทรแอตแลนติก สรุปว่าปลาทั้งสองชนิดแม้ว่าจะมีความใกล้เคียงกันมากเพราะอยู่ในสกุลเดียวกันคือสกุลสคอมเบอร์ และอาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกัน แต่มีชีวประวัติหรือแบบแผนการอพยพต่างกันจนส่งผลต่อการเกิดโครงสร้างประชากรได้

การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรปลาทุในอ่าวไทย

การศึกษาโครงสร้างประชากรปลาทุในอ่าวไทย เริ่มจากการใช้ลักษณะภายนอก ได้แก่ ลักษณะสัดส่วนลำตัว (มุศติ และวีระวัฒน์, 2508; วีระวัฒน์ และรัตน, 2515 ถูกอ้างใน รัตน, 2528) และลักษณะที่นับได้ เช่น จำนวนก้านครีบ จำนวนซี่เหงือก (บุญชัย, 2523) การตีเครื่องหมายปลาทุเพื่อตรวจสอบการอพยพ (Somjaiwong and Chullasorn, 1974; คำริห์, 2523) แต่ผลการศึกษาเหล่านี้ไม่อาจสรุปผลได้ชัดเจนเกี่ยวกับการพบโครงสร้างประชากร อาจเนื่องจากลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะปรากฏที่ขึ้นกับขนาดและอายุปลาที่นำมาศึกษา รวมทั้งปัจจัยอื่นจากสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ต่อมาจึงมีการศึกษาจากซีรัมโปรตีนชนิดทรานส์เฟอริน (Transferrin serum protein) (รัตน, 2524) โดยใช้ปลาทุจากจังหวัดชุมพรและตราด ผลการศึกษาพบว่าทั้งสองประชากรมีความถี่อัลลีลเหมือนกัน และไม่อยู่ในสมดุลของฮาร์ดีไวน์เบิร์ก จึงคาดว่ามีประชากรปลาทุมากกว่าหนึ่งอนุประชากรผสมกันอยู่ แต่ยังไม่สามารถสรุปได้เนื่องจากข้อมูลไม่เพียงพอ ต่อมา รัตน (2525) ได้เปลี่ยนมาใช้ไอโซไซม์ LDH (Lactate dehydrogenase) ในการศึกษาแทน เพราะมีความสะดวกมากกว่าในการเก็บตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่า ประชากรปลาทุจากชุมพรและตราดมีความถี่อัลลีลเหมือนกัน จึงคาดว่าเป็นกลุ่มประชากรเดียวกัน แต่ก็ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าประชากรปลาทุจากทั้งสองฝั่งอ่าวไทยเหมือนกัน เนื่องจากผลที่ได้เกิดจากการเก็บตัวอย่างเพียงครั้งเดียวจากจุดเดียว นอกจากนี้ผลการศึกษาโดยใช้ไอโซไซม์ชนิดแอลดีเอชของ รัตน (2524, 2525) ยังพบความเป็นไปได้ที่จะเกิดลูกผสมข้ามสายพันธุ์ ระหว่างปลาทุและปลาลัง จึงแนะนำให้มีการทดลองผสมเทียม หรือศึกษาการไอโทป์ เพื่อดูความเป็นไปได้ที่จะมีการผสมข้าม ต่อมาในปี 2528 รัตน ได้ใช้ ไอโซไซม์ชนิดแอลดีเอช ศึกษาโครงสร้างประชากรปลาทุจากอ่าวไทยตอนใน บริเวณอำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี และจังหวัดสมุทรสงคราม ผลพบว่ามีโครงสร้างประชากร พบอนุประชากรมากกว่าหนึ่งกลุ่มอยู่ร่วมกัน

ต่อมาได้มีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทุด้วยเทคนิค Inter-simple sequence repeat (ISSR) จำนวน 49 ตำแหน่งของ ชีระรักษ์ (2551) โดยเก็บตัวอย่าง จากอ่าวไทย (สงขลา สุราษฎร์ธานี ประจวบคีรีขันธ์ สมุทรสงคราม ระยอง จันทบุรี) และทะเลอันดามัน (สตูล และ กระบี่) พบว่ามีความหลากหลายค่อนข้างสูง และมีความแตกต่าง

ระหว่างประชากรอ่าวไทยและอันดามัน และแบ่งประชากรปลาทุเป็นสามกลุ่มคือ อ่าวไทยตอนบน (สุราษฎร์ธานี ประจวบคีรีขันธ์ สมุทรสงคราม ระยอง จันทบุรี) อ่าวไทยตอนล่าง (สงขลา) และทะเลอันดามัน (สตูล และ กระบี่) แต่ผลการศึกษาี้กลับตรวจไม่พบโครงสร้างประชากรปลาทุบริเวณอ่าวไทยตอนใน ตามที่ รัตนา (2528) ได้รายงานไว้

ในการศึกษาพฤติกรรมการอพยพของปลาทุในอ่าวไทยของ Somjaiwong and Chullasorn (1974) ที่ทดลองติดเครื่องหมายปลาทุแล้วปล่อยคืน โดยทำการทดลองตั้งแต่ปี พ.ศ. 2503 ถึง พ.ศ. 2508 ได้ติดเครื่องหมายปลาจำนวน 26,864 ตัว และปล่อยปลาในสามพื้นที่ได้แก่ พื้นที่ที่ 1 อ่าวไทยฝั่งตะวันออก (ระยอง จันทบุรี และตราด) พื้นที่ที่ 2 อ่าวไทยตอนใน (ชลบุรี สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และเพชรบุรี) และพื้นที่ที่ 3 อ่าวไทยฝั่งตะวันตก (ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี) สามารถจับปลาคืนได้ 4,191 ตัว (15.6%) ผลการศึกษพบว่าปลาทุมีการว่ายน้ำเฉลี่ย 1.3 ไมล์ทะเลต่อวัน และมีพฤติกรรมการอพยพแตกต่างกันตามขนาดของปลา กล่าวคือปลาขนาดเล็กจะมีอัตราการอพยพที่ช้าและมักจับคืนได้ใกล้กับบริเวณที่ปล่อย เนื่องจากว่ายน้ำเพื่อหาอาหารเท่านั้น ต่างจากปลาขนาดใหญ่ที่อพยพด้วยอัตราเร็ว และระยะทางที่มากกว่าเพื่อไปสู่พื้นที่วางไข่บริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันตก (พื้นที่ที่ 3) ส่วนทิศทางการอพยพนั้นพบว่าปลาที่ปล่อย ณ จุดปล่อยที่ 1 และ 3 จะอพยพเข้าสู่พื้นที่ที่ 2 ส่วนปลาจากจุดปล่อยที่ 2 จะอพยพเข้าสู่พื้นที่ที่ 3 เท่านั้น ไม่พบการอพยพไปสู่พื้นที่ที่ 1 และไม่พบการอพยพข้ามระหว่างพื้นที่ที่ 1 และ 3 จึงเกิดสมมติฐานว่าปลาทุจากอ่าวไทยฝั่งตะวันออกและฝั่งตะวันตก เป็นคนละกลุ่มประชากรย่อยกัน ซึ่งสอดคล้องกับมุศดีและวีระวัฒน์ (2508) ที่ตั้งข้อสันนิษฐานว่าปลาทุในอ่าวไทยน่าจะมีการแยกเป็นสองกลุ่มคือฝั่งตะวันออกและตะวันตก เนื่องจากความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและน้ำหนักของปลาทุจากทั้งสองแหล่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และสอดคล้องกับ อรุพันธ์ (2509) ที่กล่าวว่าแหล่งวางไข่ของปลาทุในอ่าวไทยมีสองแหล่ง คือบริเวณจังหวัดตราดลำเข้าไปในน่านน้ำกัมพูชาแหล่งหนึ่ง ส่วนอีกแหล่งคือบริเวณชายฝั่งตะวันตกตั้งแต่ประจวบคีรีขันธ์ เรื่อยลงมาถึงสุราษฎร์ธานี

การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรปลาทุทางฝั่งทะเลอันดามัน

ส่วนทางฝั่งทะเลอันดามันผลการศึกษาดูวางไข่ และขนาดแม่ปลาเมื่อเริ่มวางไข่ (ไพเราะ, 2531; ไพเราะ, 2541) พบว่าปลาทุทางฝั่งอันดามันตอนบน (เขตการประมงที่ 1) น่าจะเป็นคนละกลุ่มประชากรกับปลาทุทางฝั่งทะเลอันดามันตอนล่าง (เขตการประมงที่ 2 และ 3) และผลการทดลองติดเครื่องหมาย โดยดำริห์ และคณะ (2527) คาดว่าปลาทุทางฝั่งทะเลอันดามันตอนล่าง อาจ

ประกอบไปด้วยปลาทุ 2 กลุ่มประชากรย่อย เนื่องจากไม่พบการเคลื่อนที่ข้ามไปมาระหว่างเขตการประมงที่ 2 และ 3 แต่รายงานของวีระ และจำนอง (2539) ซึ่งใช้เกณฑ์การแบ่งกลุ่มประชากรปลาทุตามรายงานของ BOBP (1987) กลับมีความเห็นแย้งว่าปลาทุทางฝั่งทะเลอันดามันตอนล่างน่าจะ เป็นประชากรกลุ่มเดียวกัน

รายงานของวีระ และจำนอง (2539) นั้นสอดคล้องกับรายงานการประชุม The 3rd working group on mackerel and scads in the Malacca Straits, FAO/BOBP ที่แบ่งกลุ่มประชากรปลาทุในบริเวณช่องแคบมะละกาได้ 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่แพร่กระจายทางด้านตะวันออกของเกาะสุมาตรา ประเทศอินโดนีเซีย ถึงตอนใต้ของเกาะปีนังประเทศมาเลเซีย 2) กลุ่มที่แพร่กระจายบริเวณตอนล่างของประเทศพม่า ถึงจังหวัดระนอง 3) กลุ่มที่แพร่กระจายจากอ่าวพังงา-กระบี่ จนถึงบริเวณเหนือเกาะปีนัง (BOBP, 1987) และสอดคล้องกับการศึกษาโดยเครื่องหมาย ISSR ของธีระรักษ์ และ ศานิต (2551) ที่ไม่พบความแตกต่างระหว่างประชากรปลาทุจากจังหวัดกระบี่ และสตูล

สรุปการศึกษาที่ผ่านมาในทะเลอันดามันพบว่าประชากรปลาทุบริเวณชายแดนไทย-พม่ามีความต่างจากบริเวณอื่น แต่ยังมีความสับสนในการจำแนกประชากรปลาทุบริเวณทะเลอันดามันตอนล่าง เนื่องจากความไม่สมบูรณ์ของข้อมูลกล่าวคือ ผลการศึกษาของ ไพเราะ (2531, 2541) ใช้ขนาดแม่ปลาเมื่อเริ่มวางไข่ ซึ่งเป็นลักษณะปรากฏที่อาจได้รับอิทธิพลความแปรปรวนที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม หากมีการใช้ข้อมูลพันธุกรรมน่าจะช่วยให้ข้อมูลน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น ส่วนผลการศึกษาของ ดำริห์ และคณะ (2527) ในบางพื้นที่มีการทดลองเพียงครั้งเดียว และบางพื้นที่มีปลาที่ติดเครื่องหมายถูกจับคืนได้น้อยมากเพียงร้อยละ 1 นอกจากนี้ผลจากการใช้ปลาขนาดเล็กอาจทำให้ไม่สามารถเห็นการอพยพข้ามเขต ผลการทดลองเหล่านี้จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ต้องการการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผล สำหรับรายงานของวีระ และจำนอง (2539) ใช้การสรุปข้อมูลพฤติกรรมปลาทุฝั่งอ่าวไทย ข้อมูลสภาพภูมิศาสตร์ และการสังเกตวิธีทำการประมงของเรือวนล่อจับ แต่ยังขาดการทดลองเพื่อสนับสนุนแนวคิดนั้น และการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไอเอสเอสอาร์ จำนวน 49 ตำแหน่งของ ธีระรักษ์ (2551) อาจมีกำลังไม่เพียงพอในการแยกแยะความแตกต่างทางพันธุกรรม อีกทั้งการศึกษานี้เก็บตัวอย่างจากจังหวัดกระบี่และสตูล ทำให้ขาดการวิเคราะห์ข้อมูลภาพรวมของโครงสร้างประชากรปลาทุตลอดแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน

จากรายงานการศึกษาโครงสร้างประชากรที่ผ่านมาทั้งหมดจะพบว่า ความสามารถในการตรวจพบโครงสร้างประชากรนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะที่นำมาศึกษา หรือกำลังในการตรวจสอบของ

เครื่องหมายทางพันธุกรรมแต่ละชนิดที่ใช้ รวมถึงความแตกต่างของช่วงเวลาการเก็บตัวอย่าง และการเลือกแหล่งเก็บตัวอย่างที่ครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมดเพื่อใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์และการใช้ศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร

ไมโครแซทเทลไลต์ หมายถึงส่วนของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันจำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 6 เบส และมีจำนวนไม่เกิน 100 หน่วย แต่ละชุดซ้ำเรียงต่อกันอยู่ในทิศทางเดียวกันตลอด พบกระจายทั่วไปในจีโนมสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยพบทั้งในส่วนจีโนมที่ไม่ได้สร้างโปรตีนและภายในส่วนของยีนที่สร้างโปรตีน และมีความแปรปรวนในระดับสูง รูปแบบชุดซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ แบ่งได้ 3 แบบคือ แบบชุดซ้ำที่สมมาตร เป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่มีชุดซ้ำเพียงแบบเดียวติดต่อกัน เช่น (CT)₂₀ หรือ (GAT)₂₀ ถ้ามีนิวคลีโอไทด์อื่นแทรกอยู่ภายในทำให้ชุดซ้ำขาดช่วงจะถูกเรียกว่า เป็นแบบชุดซ้ำที่ไม่สมมาตร เช่น (CT)₂₀AG(CT)₂₅ และแบบสุดท้ายเป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่ประกอบด้วยชุดซ้ำที่มากกว่าหนึ่งชุดติดต่อกัน เรียกว่าชุดซ้ำแบบผสม เช่น (CT)₂₀(GA)₂₀ และ (CAG)₂₀(AG)₂₀ เป็นต้น ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำเหล่านี้แตกต่างกัน คาดว่าเกิดจากการเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเนื่องจากการกลืนกลของสายดีเอ็นเอระหว่างการจำลองตัว (Schlötterer and Harr, 2001) เนื่องจากไมโครแซทเทลไลต์มีลักษณะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำนี้เอง จึงมีชื่อเรียกอื่นเช่น Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) และ Sequence Tagged Microsatellite Site (STMS) (Liu and Cordes, 2004) ข้อดีของการใช้ไมโครแซทเทลไลต์ คือเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างสูง สามารถบอกสภาพการผสมรวมของยีน ทำให้ระบุจีโนไทป์ได้ชัดเจนเป็นโฮโมไซโกตหรือ เฮเทโรไซโกต การวิเคราะห์จีโนไทป์สามารถทำได้ง่ายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งต้องการปริมาณ ดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย และทำซ้ำโดยผลที่ได้ไม่เปลี่ยนแปลง อีกทั้งไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ สามารถนำไปใช้ได้โดยทั่วไป เพียงแค่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ นอกจากนี้สิ่งมีชีวิตต่างชนิดที่มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการที่จัดอยู่ในวงศ์ ครอบครัวหรือสกุลเดียวกันจะมีลำดับเบสขนาดข้างไมโครแซทเทลไลต์ที่พบร่วมกันหลายตำแหน่ง จึงสามารถใช้ไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์ร่วมกันได้ เช่น กลุ่มปลาตุ๊ก ปลาสรวย (*Pangasius hypophthalmus*) และปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Siluriformes (Sukkorntong *et al.* 2008) กลุ่มปลาแซลมอลและปลาเทรา ในครอบครัว Salmonidae (Coulibaly *et al.* 2005) และกลุ่มปลาแมคเคอเรล ในสกุล Scomber (Tang *et al.* 2009) เป็นต้น

การใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ศึกษาโครงสร้างประชากรปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*) โดย Ruzzante *et al.* (2000) ในบริเวณ Newfoundland และ Labrador ประเทศแคนาดา พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากร 5 กลุ่ม และเขายังคาดว่าน่าจะมีประชากรปลาคอด ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมหลงเหลืออยู่อีกในบริเวณนี้ จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเลือกชนิดเครื่องหมายในการศึกษามีผลต่อการตรวจพบโครงสร้างประชากร

การศึกษาประชากรปลาทูน่าครีบน้ำเงิน (*Thunnus thynnus thynnus*) ในทะเลเมดิเตอร์เรเนียน โดย Carlsson *et al.* (2004) ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 9 ตำแหน่ง และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ control region บนไมโทคอนเดรีย ขนาด 868 คู่เบส วิเคราะห์ตัวอย่างที่รวบรวมจากแหล่งเดียวกันเป็นเวลา 5 ปี ได้รายงานว่าไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างปลาที่เก็บต่างปีในแหล่งเดียวกัน แต่ตัวอย่างปลาทูน่าครีบน้ำเงิน จากแหล่งต่างกันมีพันธุกรรมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผู้วิจัยสรุปว่าปลาปลาทูน่าครีบน้ำเงิน ในทะเลเมดิเตอร์เรเนียนมีการแบ่งเป็นประชากรย่อยและมีการผสมพันธุ์เฉพาะในกลุ่มย่อย

ในปลา Walleye Pollock ผู้วิจัยพบว่าความสามารถในการจำแนกความต่างระหว่างประชากร แปรผกผันกับสภาวะหลากหลายรูปแบบของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งเป็นผลจากโฮโมเพลซี (size homoplasy) ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่มีสภาวะหลากหลายรูปแบบสูงมาก ทำให้สามารถพบอัลลีลที่มีขนาดเท่ากันที่ไม่ได้มาจากบรรพบุรุษเดียวกันได้มากขึ้น ส่งผลให้การประมาณค่าความต่างทางพันธุกรรมมีค่าน้อยลง การศึกษานี้จึงแนะนำว่าควรใช้เครื่องหมายที่มีสภาวะหลากหลายรูปแบบระดับปานกลาง ในการจำแนกประชากรที่มีประชากรขนาดใหญ่ มีการกระจายตัวกว้าง และมีความต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรน้อย (O'Reilly *et al.*, 2004)

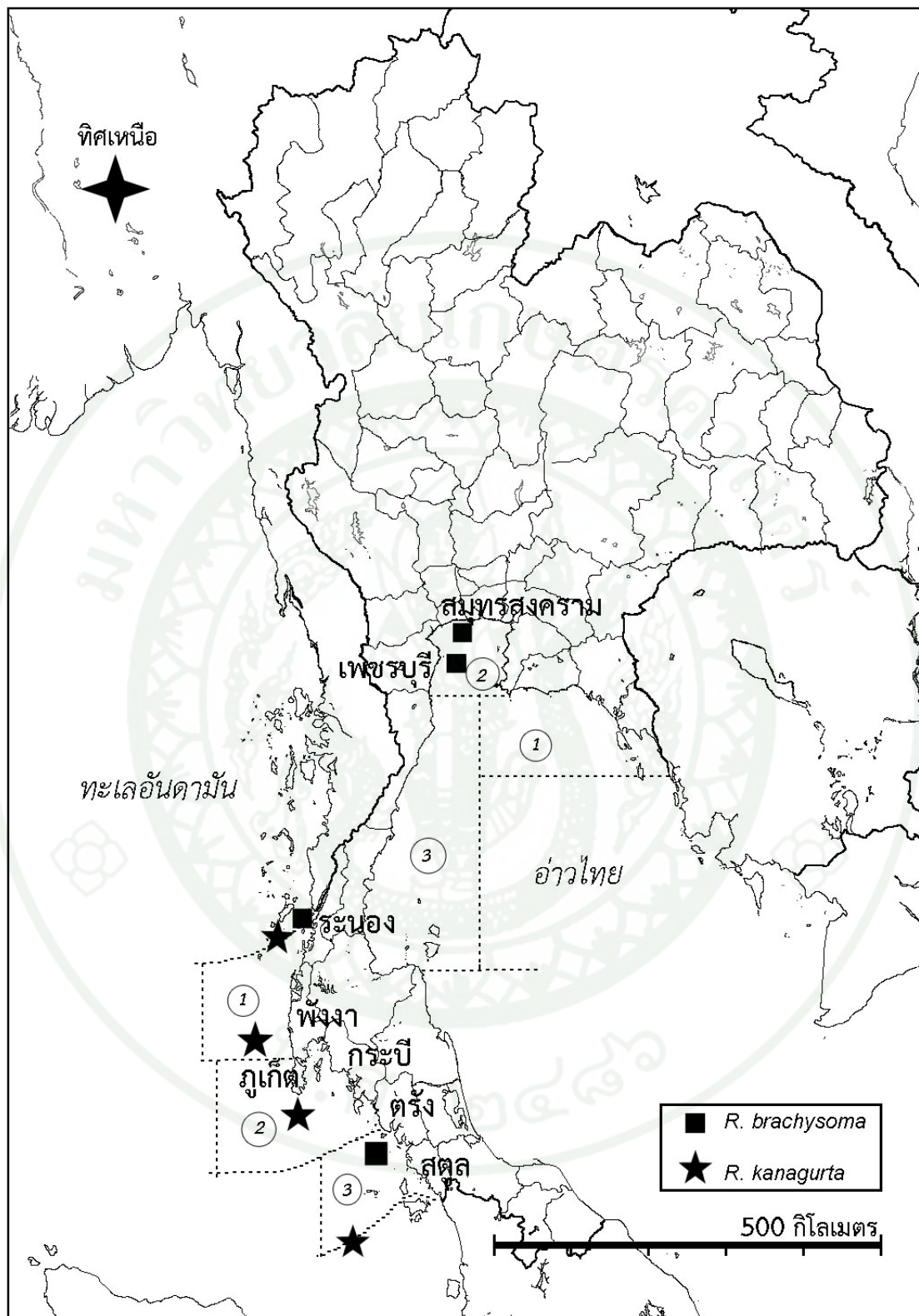
อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

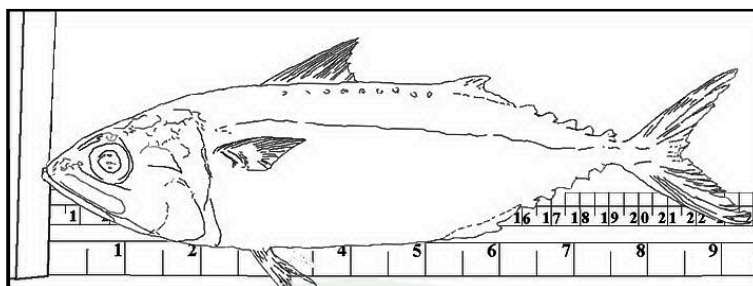
ตัวอย่างปลาหูฉี่อ่าวไทยถูกรวบรวมจากผู้ประกอบการโป๊ะปลาหมึกลอง จังหวัดสมุทรสงครามในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2553 และจากเรือประมงที่ขึ้นท่าที่จังหวัดเพชรบุรีในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2554 ส่วนตัวอย่างปลาหูฉี่และปลาลังฝั่งทะเลอันดามันถูกรวบรวมและคัดแยกชนิดโดยเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงทะเลฝั่งอันดามัน จากเรือประมงที่ขึ้นท่าในจังหวัดระนอง พังงา ภูเก็ต ตรัง และสตูล ในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2553 แหล่งละประมาณ 50 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 3) ตัวอย่างปลาถูกบันทึกภาพเทียบกับไม้บรรทัด (ภาพที่ 4) สำหรับการวิเคราะห์สัดส่วนร่างกายด้วยวิธี TRUSS network analysis จากนั้นตัดครีบทางแช่ในแอลกอฮอล์ 95% รอการสกัดดีเอ็นเอ

ตารางที่ 1 จุดเก็บตัวอย่างปลาหู (R. brachysoma) และปลาลัง (R. kanagurta)

ลำดับ	ชนิดปลา	สถานที่เก็บตัวอย่าง (ท่าเรือ)	เขตทำการ ประมงที่	เวลาเก็บ ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง
1	R. brachysoma	ปลาหูโป๊ะ อ.แม่กลอง จ.สมุทรสงคราม	อ่าวไทย 2	ธ.ค. 2553	52
2	R. brachysoma	ท่าเรือประมง จ.เพชรบุรี	อ่าวไทย 2	มี.ค. 2554	52
3	R. brachysoma	ป.ปลาหู อ.เมือง จ. ระนอง	อันดามัน 1	ส.ค. 2553	55
4	R. brachysoma	บุญลาภ อ.เมือง จ.ตรัง	อันดามัน 3	ส.ค. 2553	56
5	R. kanagurta	ท่าเรือไทยเสรี อ.เมือง จ.ระนอง	อันดามัน 1	ส.ค. 2553	48
6	R. kanagurta	ท่าเรือดวงทวีพร อ.ท้ายเหมือง จ.พังงา	อันดามัน 1	ส.ค. 2553	52
7	R. kanagurta	องค์การสะพานปลา อ.เมือง จ.ภูเก็ต	อันดามัน 2	ส.ค. 2553	27
8	R. kanagurta	องค์การสะพานปลา อ.เมือง จ.สตูล	อันดามัน 3	ส.ค. 2553	52



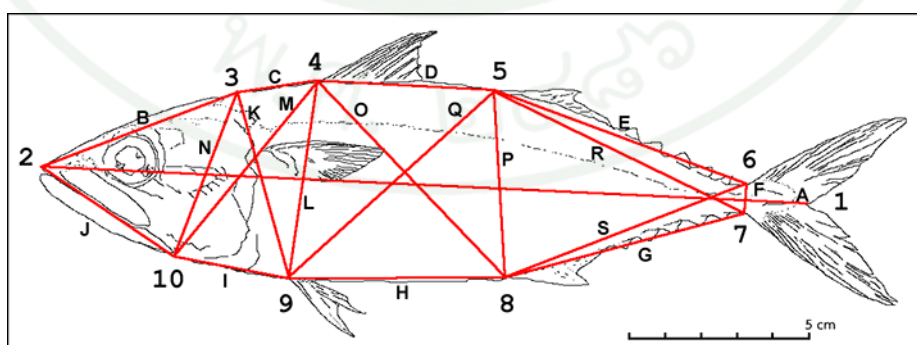
ภาพที่ 3 จุดเก็บตัวอย่างปลาหู (R. brachysoma) และปลาลัง (R. kanagurta)



ภาพที่ 4 บันทึกภาพตัวอย่างปลาเทียบกับไม้บรรทัด

2. การจำแนกชนิดปลาด้วยข้อมูลสัณฐานวิทยา

การวิเคราะห์ข้อมูลสัณฐานวิทยาด้วยวิธี Truss network analysis เริ่มต้นโดยกำหนดจุดโครงร่าง (Landmark) รอบร่างกายปลารวม 10 จุด ดังนี้ 1) รอยเว้าครีบท้อง 2) สุดปลายปาก 3) ด้านบนของช่องเปิดเหงือก 4) จุดเริ่มต้นของก้านครีบท้องแรก 5) จุดเริ่มต้นของครีบท้องที่สอง 6) คอดหางก่อนก้านครีบท้องด้านล่าง 7) คอดหางก่อนก้านครีบท้องด้านบน 8) จุดเริ่มต้นของครีบก้น 9) จุดเริ่มต้นของครีบท้อง 10) รอยต่อระหว่างกระดูก preopercle และกระดูก mandible (ภาพที่ 5) (ดัดแปลงจาก Jayasankar *et al.* (2004)) จากนั้นใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพชื่อ SigmaScan Pro Image analysis version 5.0 วัดระยะห่างของจุดที่กำหนดไว้ โดยลากเส้นตามภาพที่ 3 จะได้เส้นทั้งหมด 19 เส้น (เส้น A ถึง S) ต่อมานำค่าระยะห่างเหล่านี้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีวิเคราะห์ตัวประกอบหลัก (Principal component analysis) ในโปรแกรมทางสถิติ PAST: Paleontological Statistics Software (Hammer *et al.*, 2001) และนำผลมาสร้างแผนภาพแบบ scatter plot



ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ข้อมูลสัณฐานวิทยาด้วยวิธี Truss network analysis พร้อมจุดที่กำหนดทั้ง 10 จุด และเส้นแสดงระยะห่างระหว่างจุดทั้ง 19 เส้น (เส้น A ถึง S)

3. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลือกปลาหูหนึ่งตัวมาสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากครีบหาง ด้วยวิธีฟีนอล คลอโรฟอร์ม โดยดัดแปลงจากวิธีของ Taggart *et al.* (1992) ดังนี้

ชั่งตัวอย่างครีบนก 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ TNE-Urea (10mM Tris-HCl pH 7.5, 125mM NaCl, 10mM EDTA pH 7.5, 0.5% SDS, 4M Urea) ปริมาณ 350 μ l และ Proteinase K ปริมาณ 4 μ l (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 μ g/ μ l) ผสมสารละลายเข้ากันเบาๆ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12-16 ชั่วโมง ต่อมานำมาสกัดด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาณ 400 μ l และสกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาณ 400 μ l ในการสกัดดีเอ็นเอแต่ละขั้นตอนนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดสารละลายอินทรีย์ส่วนใสด้านบน โดยระวังสิ่งปนเปื้อนระหว่างชั้น ใส่ในหลอดใหม่เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% ที่เย็นจัด โดยใช้ปริมาตรเป็นสองเท่าของสารละลายส่วนใสที่ดูดมาได้ แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างตะกอนที่ได้ อีกสองครั้งด้วย แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 75% ในแต่ละรอบปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที หลังการล้างเทสารละลายทิ้งและตากตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA pH 8.0) ตรวจคุณภาพดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล เพื่อดูการปนเปื้อนของโปรตีนและการแตกหักของดีเอ็นเอ วัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop Spectrophotometer โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.2 การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธี Enriched library โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Nunome *et al.* (2006) และมีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมอแดปเตอร์ ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวสองเส้นคือ เส้นที่หนึ่งขนาด 21-mer (Oligo 1; 3' ATCAGGTGCGCATTCGTTCTC 5') และเส้นที่สองขนาด 25-mer (Oligo 2; 5' TAGTCCACGC GTAAGCAAGAGCACA 3') มาเชื่อมติดกันเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายคู่ที่มี

ปลายทุ่ด้านหนึ่งเพื่อใช้ต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนดังนี้ ผสม Oligo 1 (500ng/ μ l) ปริมาณ 16.8 μ l และ Oligo 2 (500 ng/ μ l) ปริมาณ 20 μ l ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 20 μ l เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ทั้งสองเท่ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยตั้งรอบอุณหภูมิ ดังนี้ 65°C นาน 10 นาทีตามด้วย 37°C นาน 10 นาทีตามด้วย 25°C นาน 10 นาที และสุดท้าย 4°C นาน 30 นาที จากนั้นเก็บอแดปเตอร์ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอใช้งาน

2. การเตรียมเมมเบรน ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสซ้ำ 8 แบบคือ (GACA)₉, (GATA)₉, (AAAT)₉, (CAA)₁₄, (CA)₂₀, (AAT)₁₄, (CT)₁₅ และ (AAG)₁₄ เป็นโพรบที่ติดอยู่บนเมมเบรน เพื่อคอยจับกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำๆ ที่เป็นคู่สมกัน มีวิธีเตรียมดังนี้ ผสมโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสซ้ำๆ อย่างละ 5 μ g กับ สารละลาย 3x SSC (45 mM Sodium citrate pH 7.0, 450 mM NaCl) ปริมาณ 0.4 mL ในหลอดขนาด 1.5 mL นำแผ่น Hybond N+ membrane ขนาด 0.5x10 เซนติเมตร วางลงบนกระดาษซับ จากนั้นหยดสารละลายที่เตรียมไว้เป็นจุดบนเมมเบรนห่างกันประมาณ 0.5 เซนติเมตร ผึ่งลมเมมเบรนให้แห้งนานหนึ่งชั่วโมง จากนั้นนำเข้าตู้อบที่ 55°C นาน หนึ่งชั่วโมง แล้วนำเมมเบรนมาฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตด้านละ 30 วินาที บนเครื่องกำเนิดแสงที่มีความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ใช้ไบมัดโคนตัดเมมเบรนเป็นแผ่นเล็กๆ ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร จำนวน 20 แผ่น นำเมมเบรนไปล้างด้วยไฮบริดไดเซชันบัฟเฟอร์ปริมาณ 10 mL ในหลอดทดลองขนาด 10 mL ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลาหนึ่งวันเพื่อกำจัดโอลิโกส่วนเกินที่เกาะหลวมๆ คอยพลิกหลอดเป็นครั้งคราวระหว่างการบ่ม เมื่อครบกำหนดเวลาเทบัฟเฟอร์เก่าออก เติimb์บัฟเฟอร์ใหม่เพื่อล้างตามขั้นตอนเดิมอีกครั้ง เมื่อล้างเมมเบรนเสร็จแล้วเทบัฟเฟอร์เก่าออก แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 2x SSC อีกครั้ง จากนั้นแบ่งเมมเบรนที่ได้ใส่หลอดขนาด 1.5 mL หลอดละสองแผ่น เก็บที่อุณหภูมิ -20°C รอการใช้งาน

3. เตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ตัดชิ้นดีเอ็นเอเป็นท่อนสั้นๆ อย่างสุ่มและต่อกับอแดปเตอร์ที่ปลายทั้งสองข้าง มีขั้นตอนคือ ใช้ดีเอ็นเอของปลาที่สกัดได้จากข้อ 1. มาปรับความเข้มข้นให้เหลือ 100 ng/ μ l เตรียมปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์สองปฏิกิริยา (ซ้ำ) ในแต่ละปฏิกิริยาใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาณ 2.5 μ l (250 ng), *Rsa*I 1 μ l (1 unit), 10x Buffer B 5 μ l, Bovine Serum Albumin 0.5 μ l และ ddH₂O 41 μ l ได้ปริมาตรสุทธิเป็น 50 μ l ในแต่ละปฏิกิริยา จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน หนึ่งชั่วโมง เสร็จแล้วทำปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ (Ligation) อีกสองชั่วโมง มีส่วนประกอบคือ T4 Ligase (3 Unit/ μ l) 6 μ l, T4 Ligase Buffer 6 μ l จากนั้นเติม adaptor (500 ng/ μ l) ปริมาณ 2 μ l ลงไปในหลอดเดิมที่มีปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ชิ้นส่วน

ดีเอ็นเอปลายที่ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI* เชื่อมติดกับอแดปเตอร์ และในระหว่างนี้ปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ยังคงดำเนินต่อไปเพื่อคอยตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่กลับมาเชื่อมกันเอง

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบแรก นำตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งสองซ้ำที่ได้จากข้อ 3. มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซ้ำละ 4 ปฏิกิริยาๆ ละ 50 μL ทำให้แต่ละซ้ำจะมีผลผลิตพีซีอาร์ปริมาณ 200 μL เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต่ออยู่กับอแดปเตอร์ให้มีปริมาณมากพอ และเพิ่มโอกาสจับกับเมมเบรนในขั้นตอนการไฮบริดไดซ์

ดีเอ็นเอ (จากข้อ 3.)	1	μL
10x PCR Buffer B	5	μL
21 เมอร์ Oligo 1 (500 ng/ μL)	0.5	μL
2mM dNTP	5	μL
Amplitaq Gold (5 u/ μL)	0.25	μL
MgCl ₂ (25 mM)	5	μL
ddH ₂ O	33.25	μL
ปริมาตรรวม	50	μL

จากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยกำหนดอุณหภูมิในแต่ละรอบดังนี้ 1) 94°C นาน 10 นาที 2) 94°C นาน 15 วินาที 3) 60°C นาน 1 นาที 4) 72°C นาน 3 นาที จากนั้นวนกลับไปขั้นที่ 2) อีก 29 รอบ 5) 72°C นาน 15 นาที และ 6) 4°C นาน 10 นาที เมื่อเสร็จปฏิกิริยาพีซีอาร์ รวมผลผลิตพีซีอาร์ของแต่ละซ้ำให้ได้ซ้ำละ 200 μL แล้วนำไปทำความสะอาด ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป (Real Genomics HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction Kit)

5. การเอนริชไมโครแซเทลไลต์ (Enrichment of microsatellites) โดยการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งเป็นผลผลิตพีซีอาร์จากข้อ 4. มาไฮบริดไดซ์กับเมมเบรนที่มีโพรบติดอยู่ ซึ่งได้มาจากข้อ 2. เพื่อคัดเลือกเฉพาะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

นำเมมเบรนที่เตรียมไว้ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 mL เติม 21 mer Oligo-1 2 μL และ Hybridization Buffer (Deionised Formamide, 20x SSC, 0.25mM NaPO₄ และ 10% SDS) 500 μL นำผลผลิตพีซีอาร์จากข้อ 2.4 ที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วมา 30 μL นำมาทำให้เสียสภาพเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ในเครื่องพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 5 นาที จากนั้นรีบย้ายมาแช่บน

น้ำแข็งนาน 2 นาที แล้วเติมลงในหลอดที่เตรียมเมมเบรนไว้ นำไปบ่มที่ 50 °C นาน 48 ชั่วโมง และคอยพลิกหลอดเป็นครั้งคราว

เมื่อครบเวลาการไฮบริดไคซ์แล้วก็ล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ 1 จำนวน 5 ครั้งๆ ละ 1 mL นาน 3 นาที และบัฟเฟอร์ 2 อีก 3 ครั้งๆ ละ 1 mL นาน 5 นาที เพื่อล้างดีเอ็นเอส่วนเกินที่ไม่ได้จับกับโพรบ หลังจากล้างรอบสุดท้ายแล้วเทบัฟเฟอร์ทิ้ง และเติมน้ำ 200 μ L นำหลอดไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 5 นาที เพื่อให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกาะอยู่กับโพรบหลุดออกมาอยู่ในสภาพสายเดี่ยวในน้ำ จากนั้นรีบย้ายมาแช่น้ำแข็งนาน 2 นาที เพื่อป้องกันการกลับไปจับกับโพรบ

ต่อมาเตรียมทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จากสารละลายที่มีดีเอ็นเอสายเดี่ยวอยู่ โดยแบ่งให้แต่ละซ้ำมี 4 ปฏิกิริยาๆ ละ 50 μ L ดังนั้นในแต่ละซ้ำจะได้ผลผลิตพีซีอาร์เท่ากับ 200 μ L เพื่อใช้ในขั้นตอนการโคลนนิ่ง

ดีเอ็นเอสายเดี่ยว	10	μ L
10x PCR Buffer B	5	μ L
21 เมอร์ Oligo 1 (500 ng/ μ L)	0.5	μ L
2mM dNTP	5	μ L
Amplitaq Gold (5 u/ μ L)	0.25	μ L
MgCl ₂ (25 mM)	5	μ L
ddH ₂ O	24.25	μ L
ปริมาตรรวม	50	μ L

นำเข้าเครื่องพีซีอาร์และกำหนดรอบอุณหภูมิเหมือนในข้อ 4. เมื่อสิ้นสุดกระบวนการพีซีอาร์แล้ว รวมผลผลิตพีซีอาร์ของแต่ละซ้ำให้ได้ซ้ำละ 200 μ L แล้วนำไปทำความสะอาดด้วย Real Genomics HiYield TM Gel/PCR Fragments Extraction Kit เพื่อกำจัดสิ่งตกค้างที่มาจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วนำมาทำความสะอาดซ้ำด้วย Pharmacia microspin S-300 อีกครั้งเพื่อกำจัดชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็กเกินไป

6. เชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้คือ pGEM-T easy vector เพื่อใช้เพิ่มจำนวนในตัวแบคทีเรีย E. coli โดยมีขั้นตอนดังนี้

2x rapid ligation buffer, T4 DNA ligase	5	μl
pGEM-T easy vector (50 ng)	1	μl
PCR product	3	μl
T4 DNA ligase (3 weiss units/μl)	1	μl
ปริมาตรรวม	10	μl

นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน แล้วไปเก็บที่ -20 °C จนกว่าใช้งาน

7. การถ่ายฝาก (Transform) พลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย ใช้วิธีช็อคด้วยความร้อน (Heat shock) เพื่อนำพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย เริ่มจากนำ competent cell และ พลาสมิด จากข้อ 6 ใส่ในหลอดขนาด 1.5 mL แช่น้ำแข็งนาน 20 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำอุณหภูมิ 42 °C นาน 50 วินาที แล้วรีบย้ายมาแช่น้ำแข็งนาน 2 นาที เติม Soc medium 700 μl นำไปเข้าเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมงครึ่ง นำแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารสูตร LB (1%NaCl, 1%Tryptone, 0.5% Yeast extract, 2% Agar) ที่เติม 0.1M IPTG 100 μl, 50 μg/μl X-gal 20μl และ แอมพิซิลิน (100 μg/mL) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง

8. การคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกอยู่ คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวมาเลี้ยงต่อบนมาสเตอร์เพลท ซึ่งเป็นอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 μg/mL และตารางหมายเลขติดอยู่ที่ก้นเพลท นำเชื้อไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง

9. การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Bioexcellence) เลือกโคโลนีที่ต้องการสกัดพลาสมิดจากมาสเตอร์เพลท มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB 3 mL ในหลอดขนาด 15 mL เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นย้ายมาใส่หลอดขนาด 1.5 mL นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 3 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม สารละลาย Cell suspension 200 μl ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อให้ตะกอนฟุ้งในสารละลาย เติมสารละลาย Lysis 200 μl พลิกหลอดกลับ ไปมาเบาๆ จนสารละลายข้นหนืดและใสขึ้น เติมสารละลาย Neutralize 200 μl พลิกหลอดไปมาเบาๆ จนเกิดตะกอนดีเอ็นเอสีขาวขุ่น ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทั้งหมด (ประมาณ 600 μl) ใส่หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 600 μl เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนด้วย 70% เอทิลแอลกอฮอล์ ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE 40 μl

10. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการออกแบบไพรเมอร์ นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 9. มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 500 ng/ μ l ตัวอย่างละ 20 μ l ส่งไปหาลำดับนิว-คลีโอไทด์ที่บริษัท ไบโอดีไซน์ จำกัด เมื่อได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ นำมาหาลำดับเบสซ้ำของแต่ละโคลน ใช้เกณฑ์การคัดเลือกตาม ศรีจรรยา (2546) โดยลำดับเบสซ้ำต้องมีจำนวนซ้ำมากกว่า 5 ซ้ำ สำหรับไดนิวคลีโอไทด์ มากกว่า 4 ซ้ำ สำหรับไตรนิวคลีโอไทด์ และต้องมีไม่น้อยกว่า 3 ซ้ำ สำหรับเตตระนิวคลีโอไทด์ เพนตะนิวคลีโอไทด์ และเฮกซะนิวคลีโอไทด์ตามลำดับ จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ให้ชนาบบ้างลำดับเบสซ้ำ โดยใช้โปรแกรม Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) เลือกคู่ไพรเมอร์ที่มี %GC ประมาณ 50%, มีค่า Tm ใกล้เคียงกัน และที่ปลาย 3' ปิดท้ายด้วยเบส C หรือ G จากนั้นข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ถูกนำเข้าสู่ฐานข้อมูล NCBI

3.3 การทดสอบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

เมื่อได้ไพรเมอร์ที่ออกแบบแล้วก็นำมาทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และประเมินสภาพความหลากหลายของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์แต่ละตำแหน่ง

1. การประเมินสภาพความหลากหลายของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ โดยการสุ่มเอาตัวอย่างดีเอ็นเอของปลาทุ 52 ตัวอย่าง จากจังหวัดสมุทรสงคราม มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบไว้ ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยามีองค์ประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอ ปริมาณ 0.1-1 ไมโครกรัม, บัฟเฟอร์พีซีอาร์ เข้มข้น 1X, นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTPs) เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์, เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เข้มข้น 0.75 หน่วย และเติมน้ำให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง พีซีอาร์ โดยกำหนดอุณหภูมิในแต่ละรอบดังนี้

- 1) แยกสายดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวที่ 94°C นาน 5 นาที
- 2) แยกสายดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวที่ 94°C นาน 30 วินาที
- 3) ลดอุณหภูมิให้ไพรเมอร์ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่ 30 วินาที
- 4) ต่อสายดีเอ็นเอที่ 72°C นาน 30 วินาที จากนั้นวนกลับไปขั้นที่ 2) อีก 29 รอบ
- 5) ต่อสายยาวขึ้นสุดท้ายที่ 72°C นาน 10 นาที
- 6) ลดอุณหภูมิลงที่ 20°C นาน 10 นาที

เมื่อเสร็จปฏิกิริยานำผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับสีหยอดลงในอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 % เพื่อตรวจผลความสำเร็จของปฏิกิริยา และเทียบความเข้มของแถบ ดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ภายหลังจากแช่ในเอธิเดียมโบรไมด์ และดูผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ตรวจสอบผลแล้ว มาตรวจสอบจีโนไทป์ และประเมินสภาพความหลากหลายของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์บนโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 5% เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และผลผลิตพีซีอาร์ที่ทราบขนาดแล้วจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ คัดเลือกเครื่องหมายที่มีสภาวะหลากหลายรูปแบบระดับปานกลางขึ้นไป เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป ส่วนเครื่องหมายที่ไม่มีสภาวะหลากหลายรูปแบบ ในปลาทุจะเก็บไว้ใช้ทดสอบกับปลาต่างชนิดว่าสามารถใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้หรือไม่ และมีขนาดแถบดีเอ็นเอเหมือนหรือต่างจากปลาทุอย่างไร

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาต่างชนิดในสกุลเดียวกัน (Cross-species amplification) เพื่อตรวจสอบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ถูกพัฒนาขึ้นในปลาทุนั้นจะสามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปลาชนิดอื่นที่ใกล้เคียงกันได้หรือไม่ เนื่องจากปลาชนิดที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันจะมีลำดับเบสส่วนที่อนุรักษ์เหมือนกัน โดยปลาที่จะนำมาทดสอบคือปลาลัง โดยสกัดดีเอ็นเอจากครีบหางปลาลังจากจังหวัดระนอง 48 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่ถูกพัฒนาขึ้นใหม่ และตรวจสอบผลในอะกาโรสเจล และโพลีอะคริลาไมด์เจลตามลำดับ

4. การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของปลาทุ-ลัง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทุและปลาลัง

1. การสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปลาทุสมุทรสงคราม เพชรบุรี ระนอง และตรัง ปลาลังระนอง พังงา ภูเก็ต และสตูล รวม 8 ประชากร (ตารางที่ 1) จากนั้นใช้ไพรเมอร์ที่พัฒนาและประเมินความหลากหลายแล้ว 4 ตำแหน่ง (ได้แก่ *Rbr-7* *Rbr-8* *Rbr-13* และ *Rbr-14*) มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทดสอบตัวอย่างปลาทุทุกประชากรกับไพรเมอร์ที่ละคู่จนครบ สำหรับเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน และตัวอย่างมาตรฐานที่ทราบจีโนไทป์แล้ว จากนั้นบันทึกข้อมูลจีโนไทป์เพื่อรอการวิเคราะห์ผลต่อไป

2. การวิเคราะห์ข้อมูลพันธุศาสตร์ประชากร ใช้โปรแกรม POPGENE V. 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) คำนวณจำนวนอัลลีล (A) และค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (Mean A) ค่าสังเกต (H_O) และค่าคาดหวัง (H_E) เฮตเทอโรไซโกซิตี ใช้โปรแกรม FSTAT (Goudet, 1995) คำนวณค่า Allelic richness (Ar) ทดสอบการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบอร์กด้วยโปรแกรม Arlequin V. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) โดยกำหนดค่า Number of steps in Markov chain = 100,000 และ Dememorization = 1000 ใช้โปรแกรม GENEPOP Version 4.2.2 (Raymond and Rousset, 1995) ทดสอบค่า Genotypic linkage disequilibrium โดยกำหนดค่า Markov chain เป็น Dememorization = 1,000; Batches = 100; Iteration per batch = 5,000 และใช้หาค่า Allele frequency-based correlation (F_{IS} , F_{ST} และ F_{IT}) ตามวิธีของ Weir and Cockerham (1984)

ผลและวิจารณ์

1. การจำแนกชนิดปลาด้วยข้อมูลสัณฐานวิทยา

ตัวอย่างปลาทุและปลาลังที่ศึกษาครั้งนี้มีขนาดความยาวสัอมหางเฉลี่ยเท่ากับ 15.51 ± 1.14 เซนติเมตร และ 18.77 ± 1.19 เซนติเมตร ตามลำดับความกว้างลำตัวมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 4.31 ± 0.38 เซนติเมตร และ 4.64 ± 0.31 เซนติเมตร ตามลำดับ ผลการวัดสัดส่วนความยาวสัอมหางต่อความกว้างลำตัว พบว่าปลาทุมีลำตัวป้อมกว่าปลาลัง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.60 ± 0.16 ส่วนปลาลังมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.04 ± 0.18 (ตารางที่ 2)

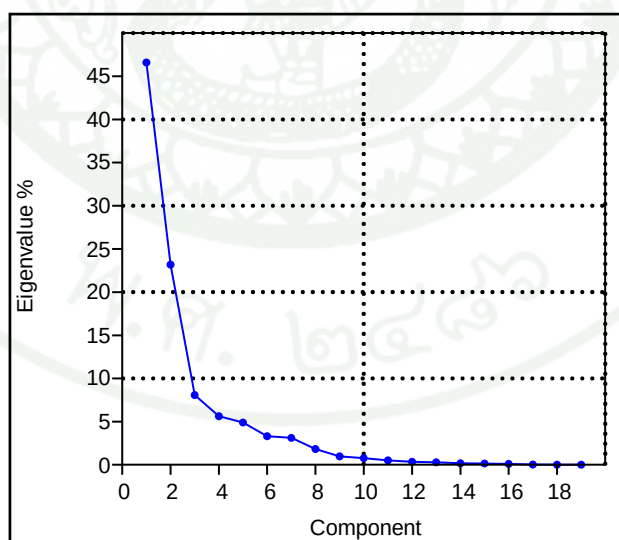
ตารางที่ 2 ความยาวสัอมหางเฉลี่ย ความกว้างเฉลี่ย และสัดส่วนของความยาวต่อความกว้าง

ลำดับ	ชื่อประชากร	ความยาวสัอมหาง เฉลี่ย (ซ.ม.)	ความกว้างลำตัว เฉลี่ย (ซ.ม.)	สัดส่วนความยาวสัอม หางต่อความกว้างลำตัว
1	ปลาทุสมุทรสงคราม	14.51 ± 0.87	3.88 ± 0.29	3.74 ± 0.10
2	ปลาทุเพชรบุรี	16.67 ± 0.41	4.54 ± 0.11	3.66 ± 0.08
3	ปลาทุระนอง	15.44 ± 0.66	4.52 ± 0.20	3.41 ± 0.11
4	ปลาทุตรัง	15.45 ± 1.24	4.29 ± 0.39	3.60 ± 0.10
5	ปลาลังระนอง	18.70 ± 1.07	4.75 ± 0.29	3.94 ± 0.16
6	ปลาลังพังงา	18.11 ± 0.77	4.47 ± 0.27	4.06 ± 0.14
7	ปลาลังภูเก็ต	18.38 ± 1.25	4.70 ± 0.39	3.92 ± 0.11
8	ปลาลังสตูล	19.71 ± 1.04	4.69 ± 0.28	4.20 ± 0.15

โดยทั่วไปปลาทุจะเริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ เมื่อมีขนาดความยาวตลอดตัวประมาณ 16 เซนติเมตร และขนาดที่มักพบได้ทั่วไปคือช่วง 15-20 เซนติเมตร ส่วนปลาลังจะมีขนาดความยาวตลอดตัวเมื่อเริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ประมาณ 17-20 เซนติเมตร และขนาดที่มักพบได้ทั่วไปในคือ 25 เซนติเมตร (ทิศพล และคณะ, 2550; Carpenter and Niem, 2001) ค่าที่วัดในการศึกษาครั้งนี้เป็นค่าความยาวสัอมหางจึงมีค่าต่ำกว่าค่าความยาวตลอดลำตัวที่นำมาเปรียบเทียบอยู่เล็กน้อย แต่ก็มี ความสอดคล้องกัน และในระหว่างเก็บตัวอย่างจะพบว่าปลาส่วนมากมีรังไข่และถุงน้ำเชื้อที่พร้อมเจริญพันธุ์แล้ว

สัดส่วนความยาวส้อมหางต่อความกว้างเฉลี่ยของการศึกษานี้ (ปลาหู=3.4-3.7 และปลา
ลึง=3.9-4.2) มีค่าต่ำกว่าในรายงานของ Carpenter and Niem (2001) (ปลาหู=3.7-4.3,
ปลาลึง=4.3-5.2) แต่สอดคล้องกับเกณฑ์การจำแนกปลาในสกุล *Rastrelliger* ของคู่มือวิเคราะห์
พันธุ์ปลา (ปลาหู=2.8-3.4, ปลาลึง=3.4-3.8) (คณะประมง, 2528) ซึ่งสัดส่วนที่พบนี้ ไม่มีช่วงที่
ซ้อนทับกันระหว่างชนิด สามารถแยกความต่างระหว่างชนิดได้ชัดเจน

จากการวัดระยะห่างของจุดที่กำหนดไว้ครอบคลุมร่างกายปลาทั้ง 10 จุด (ภาพที่ 5) ได้ค่า
ระยะห่างรวม 19 ค่า ถูกปรับค่าใหม่โดยใช้ค่าความยาวส้อมหางหารทุกค่า เพื่อลดความแปรปรวนที่
เกิดจากขนาดของปลาที่แตกต่างกัน ค่าตัวแปรทั้ง 19 ค่าที่ใช้วิเคราะห์ความแตกต่างของรูปร่างปลา
ที่ศึกษา เมื่อผ่านการลดจำนวนตัวแปรด้วยวิธีการวิเคราะห์ตัวประกอบหลัก พบว่าตัวแปรใหม่ที่ถูก
สร้างขึ้นมาเพียง 3 ตัวแปรแรกสามารถใช้อธิบายความแปรปรวนแทนตัวแปรเดิมได้ถึง 77.85%
(ตารางที่ 3 และภาพที่ 6) โดยตัวประกอบหลักตัวแรก (PC1) มีค่าความแปรปรวนสูงสุดเท่ากับ
46.59% เป็นตัวแทนตัวแปรเดิมที่แสดงถึงความแตกต่างด้านความลึกลำตัว เพราะมีค่า Loading
ของตัวแปรเดิมสูงสุดที่ เส้น L= 0.43 และเส้น P=0.43 (ตารางที่ 4) ตัวประกอบหลักตัวที่สอง
(PC2) มีค่าความแปรปรวนรองลงมาเท่ากับ 23.18% แสดงความแตกต่างด้านความยาวลำตัวช่วง
ท้าย (ตารางที่ 4 เส้น E และ R) ตัวประกอบหลักตัวที่สาม (PC3) มีค่าความแปรปรวนเท่ากับ
8.07% แสดงความแตกต่างด้านความกว้างช่วงกลางลำตัว (ตารางที่ 4 เส้น Q และ H)



ภาพที่ 6 แผนภาพแสดงค่าความแปรปรวน (λ ; Eigenvalue) ของตัวประกอบหลัก (PC)

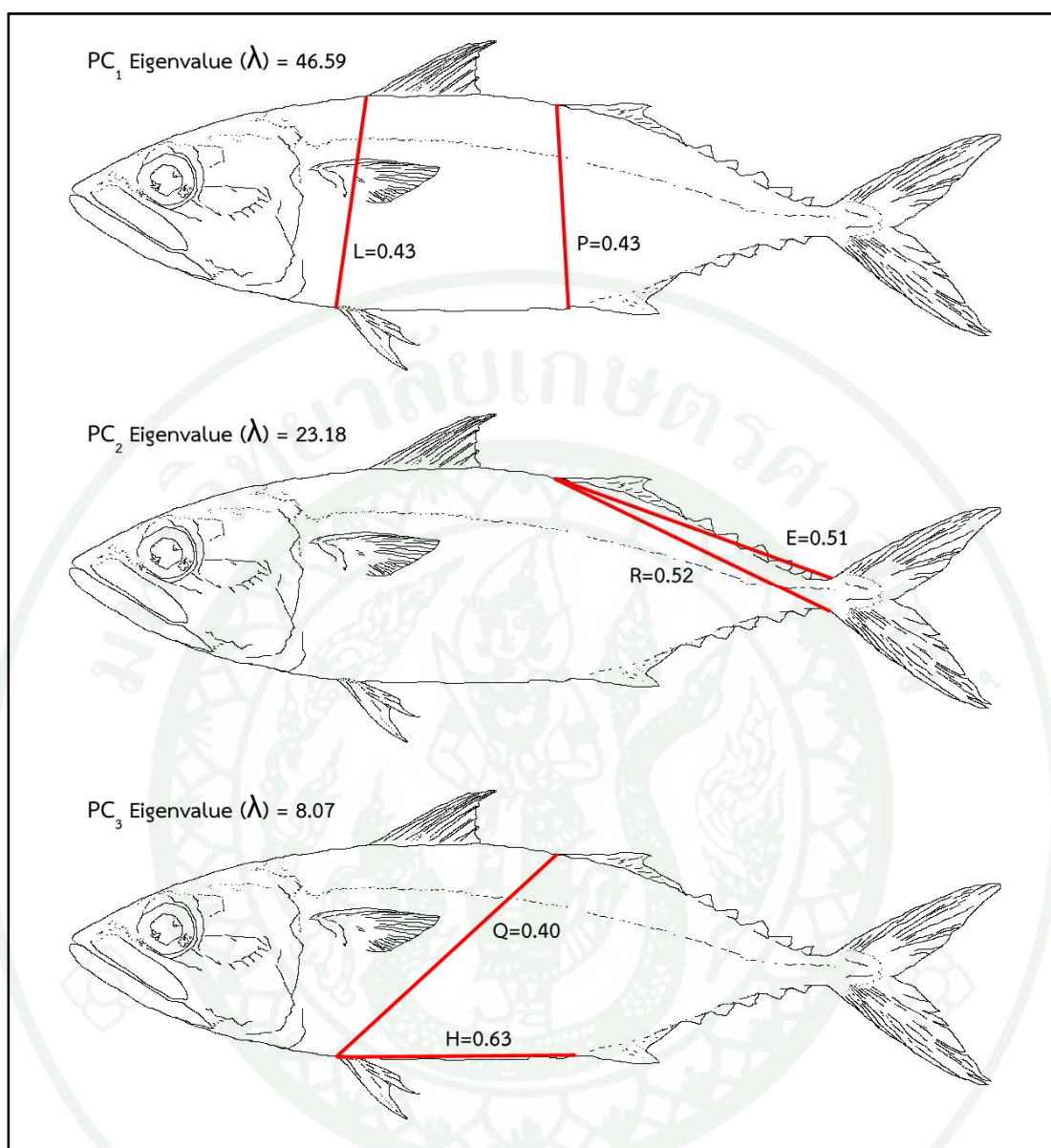
ตารางที่ 3 ค่าไอเกน (λ) ของตัวประกอบหลัก ค่าร้อยละความแปรปรวน และค่าร้อยละความแปรปรวนสะสม

PC	ค่าไอเกน (λ)	ร้อยละความแปรปรวน	ร้อยละความแปรปรวนสะสม
1	0.0018839	46.5920	46.5920
2	0.0009374	23.1830	69.7750
3	0.0003266	8.0780	77.8530
4	0.0002271	5.6174	83.4704
5	0.0001983	4.9031	88.3735
6	0.0001334	3.2995	91.6730
7	0.0001259	3.1136	94.7866
8	0.0000741	1.8330	96.6196
9	0.0000396	0.9805	97.6001
10	0.0000314	0.7765	98.3766
11	0.0000208	0.5148	98.8914
12	0.0000138	0.3403	99.2317
13	0.0000118	0.2929	99.5246
14	0.0000070	0.1735	99.6981
15	0.0000060	0.1486	99.8467
16	0.0000042	0.1037	99.9504
17	0.0000014	0.0340	99.9844
18	0.0000006	0.0157	100.0001
19	0	0	100.0001

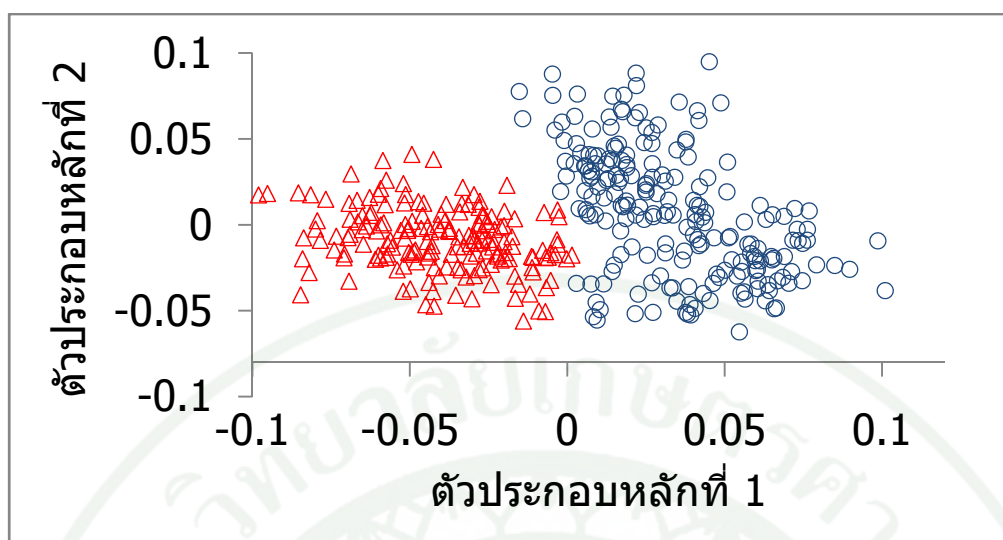
นำผลคะแนนของปลาแต่ละตัวมาสร้างแผนภาพแบบกระจาย โดยใช้ตัวแปรที่สร้างขึ้นใหม่ และมีค่าความแปรปรวนสูงสุด คือให้ตัวประกอบหลักตัวแรก (PC1) เป็นแกนนอน ส่วนตัวประกอบหลักตัวที่สอง (PC2) เป็นแกนตั้ง เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างชนิด พบว่าสามารถจัดกลุ่มแยกตัวอย่างปลาทั้งสองชนิดได้ (ภาพที่ 7 และ 8) โดยตัวอย่างที่ถูกจัดกลุ่มสลับหรือมีความกำกวมในการถูกจัดกลุ่มจะถูกตัดออกจากการวิเคราะห์และไม่นำไปวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอต่อไปเพื่อป้องกันการสับสนในการวิเคราะห์ข้อมูล

ตารางที่ 4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Loading) ในแต่ละตัวประกอบหลัก (PC)

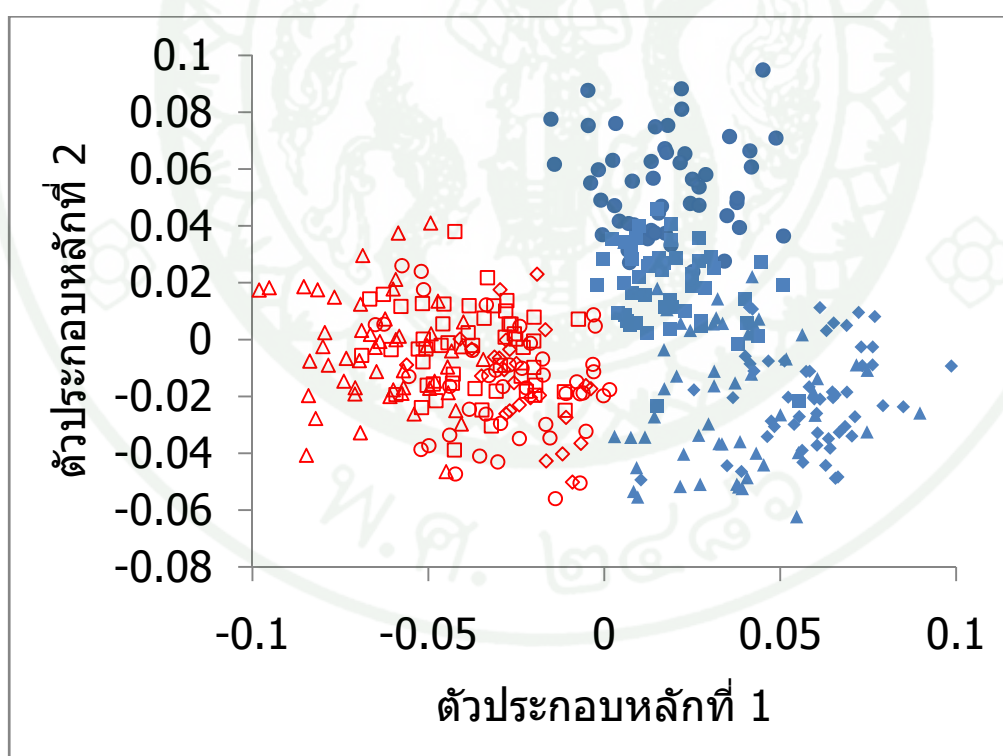
Factor	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
B	0.1727	-0.3589	-0.3094	-0.1224	-0.2294	0.5333	0.0634
C	-0.1330	-0.0725	0.0454	0.4729	0.3896	-0.2496	0.2038
D	-0.0544	-0.0621	0.2708	-0.6938	0.1683	-0.0544	-0.0557
E	0.0966	0.5101	-0.1047	0.1166	-0.1600	0.1723	-0.1096
F	0.0413	-0.0022	-0.0004	0.0019	0.0273	0.0124	0.0053
G	0.0386	0.3128	-0.1214	-0.1708	0.3419	0.0797	0.2424
H	-0.1529	0.0633	0.6310	0.2968	-0.3486	0.2534	0.1041
I	-0.0090	-0.1107	0.0006	0.1135	0.3196	0.1296	-0.7448
J	0.2283	-0.1253	-0.1909	-0.0022	-0.3264	-0.4290	0.2542
K	0.3852	-0.0480	0.0479	0.0788	0.0775	-0.3384	-0.1535
L	0.4388	-0.0653	0.0892	0.0983	0.1219	-0.0493	0.0799
M	0.2346	-0.1976	-0.0345	0.2573	0.2322	0.2981	0.0174
N	0.3655	-0.1079	-0.0986	-0.0156	-0.1253	0.1370	0.0048
O	0.3051	0.1144	0.3848	-0.1600	-0.1700	-0.1582	-0.2293
P	0.4334	0.0967	0.1290	0.0361	0.0927	0.0030	-0.0046
Q	0.1569	-0.1183	0.4051	-0.0514	0.2472	0.2613	0.3218
R	0.1413	0.5268	-0.0955	0.0846	-0.1211	0.1207	-0.0963
S	0.0795	0.3175	-0.0974	-0.1317	0.2999	0.1290	0.2340



ภาพที่ 7 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Loading) ในแต่ละตัวประกอบหลัก (PC) แสดงบนตัวปลา



ภาพที่ 8 แผนภาพกระจายของการวิเคราะห์รูปร่างระหว่างปลาหู (สัญลักษณ์ ○) และปลาลัง (สัญลักษณ์ Δ)



ภาพที่ 9 แผนภาพกระจายของการวิเคราะห์รูปร่างระหว่างปลาหูและปลาลัง 8 ประชากร (สัญลักษณ์ ●: ปลาหูสมุทรสงคราม, ■: ปลาหูเพชรบุรี, ◇: ปลาหูระนอง, Δ: ปลาหูตรัง, ○: ปลาลังระนอง, □: ปลาลังพังงา, ◇: ปลาลังภูเก็ต, Δ: ปลาลังสตูล)

2. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

ในขั้นตอนการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกอยู่ คัดเลือกเฉพาะโคลนที่ผลบวกที่มีสีขาวได้จำนวน 331 โคลนและนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ แล้วสุ่มเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอจำนวน 64 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 380 ± 120 bp มีขนาดเล็กสุดเท่ากับ 180 bp และขนาดใหญ่ที่สุดเท่ากับ 632 bp การวิเคราะห์ลำดับเบสซ้ำพบลำดับเบสซ้ำแบบมินิแซทเทลไลท์ขนาด 30 bp จำนวน 5 ซ้ำหนึ่งตำแหน่ง (TAGACCCRCCACGCTGACSYRGAACCAGAC) พบลำดับเบสซ้ำตามเกณฑ์ที่กำหนดว่าเป็นไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 18 ตำแหน่งจาก 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 23 ของตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ไมโครแซทเทลไลท์ที่พบส่วนมากเป็นลำดับเบสซ้ำแบบซ้ำสอง (dinucleotide) จำนวน 14 ตำแหน่ง แยกเป็นลำดับซ้ำ [GT] n 7 ตำแหน่ง ลำดับซ้ำ [CA] n 5 ตำแหน่ง ส่วนลำดับซ้ำ [CT] n และ [GA] n พบอย่างละหนึ่งตำแหน่ง พบลำดับเบสซ้ำแบบซ้ำสาม (trinucleotide) หนึ่งตำแหน่งคือ [ATT] n ส่วนลำดับเบสซ้ำแบบซ้ำสี่ (tetranucleotide) พบสามตำแหน่ง ได้แก่ [CACT] n [ATTT] n และ [TTTG] n

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าจากตัวอย่างที่ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 64 ตัวอย่าง พบ 15 ตัวอย่าง มีลำดับเบสซ้ำที่ต้องการ (คิดเป็น 23%) อีก 49 ตัวอย่างที่เหลือพบลำดับเบสซ้ำบ้างแต่มีจำนวนซ้ำไม่ถึงตามเกณฑ์ หรือในบางตัวอย่างไม่พบลำดับเบสซ้ำเลย ปัญหานี้แสดงถึงประสิทธิภาพในขั้นตอนการไฮบริดดิซ *Nunome et al.* (2006) แนะนำว่าสิ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการเอนริชเมนต์ คือจำนวนการล้างภายหลังจากการไฮบริดดิซ ที่จะช่วยลดจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จับอยู่กับโพรบไม่แน่นเนื่องจากไม่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับโพรบออกไป แต่ผลของอุณหภูมิระหว่างการไฮบริดดิซ ($50-55^{\circ}\text{C}$) ไม่มีผลต่อความสำเร็จ แนวทางการเพิ่มโอกาสพบลำดับเบสซ้ำที่ต้องการอีกวิธีหนึ่งคือ การเพิ่มขั้นตอนคัดกรองขั้นที่สองก่อนส่งตัวอย่างไปหาลำดับเบสซ้ำ เช่น *Li et al.* (2007) ไม่ต้องการลำดับเบสซ้ำแบบซ้ำสอง เนื่องจากพบปัญหาแถบดีเอ็นเอซ้อนทับกัน (Stutter band) จึงนำโพรบที่มีลำดับเบสซ้ำแบบซ้ำสี่ตามที่ต้องการมาคัดกรองรอบสอง พบว่าสามารถเพิ่มโอกาสพบลำดับเบสซ้ำได้มากขึ้น จากเดิม 15% เป็น 70%-85% หรืออีกวิธีหนึ่งของ *Renshaw et al.* (2009) ใช้วิธีคัดเลือกโคลนโดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ข้างหนึ่งเป็นอแดปเตอร์ ใช้ไพรเมอร์อีกข้างหนึ่งเป็นลำดับเบสซ้ำที่ต้องการ โคลนใดให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้มากกว่าหนึ่งแถบถือเป็นผลบวก เพราะเป็นผลผลิตของไพรเมอร์ที่เป็นอแดปเตอร์ทั้งสองข้างหนึ่งแถบ และผลผลิตระหว่างไพรเมอร์ที่เป็นอแดปเตอร์กับไพรเมอร์ที่เป็นลำดับเบสซ้ำที่ต้องการอีกหนึ่งแถบหรือมากกว่า

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของลำดับเบสซ้ำทั้ง 18 ตำแหน่งสามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้เพียง 11 ตำแหน่ง (ตารางที่ 6) เนื่องจากบางตำแหน่งไม่มีลำดับเบสขนาบข้างเหลือพอให้ออกแบบไพรเมอร์ ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดอยู่ในช่วง 134 bp – 243 bp โดยลำดับเบสแกนส่วนมากเป็นลำดับเบสซ้ำสองแบบสมบูรณ์ (perfect dinucleotide repeats) แบ่งเป็น [TG]_n จำนวน 3 ตำแหน่ง [CA]_n จำนวน 2 ตำแหน่ง และ [GA]_n, [TC]_n อย่างละหนึ่งตำแหน่ง รองลงมาเป็นลำดับเบสแกนแบบซ้ำสองไม่สมบูรณ์ แบ่งเป็น [CA]_nNNNN[CA]_n จำนวน 2 ตำแหน่ง และ [TG]_nNN[TG]_n หนึ่งตำแหน่ง ส่วนลำดับเบสแกนแบบซ้ำสามมีหนึ่งตำแหน่งคือ [ATT]_n

3. การทดสอบเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ดีเอ็นเอ

จากไพรเมอร์ที่ออกแบบ 11 ตำแหน่ง เมื่อนำมาทดสอบพบไพรเมอร์บางคู่ไม่สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่คมชัด ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการ หรือไม่มีความหลากหลาย ไพรเมอร์ที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์และให้ผลผลิตที่ดีมีจำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ *Rbr-7* *Rbr-8* *Rbr-9* *Rbr-12* *Rbr-13* และ *Rbr-14* สภาพที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในปริมาตร 10 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 100 ng, 1 X PCR buffer, 1 mM MgCl₂, 0.167 mM dNTPs, forward และ reverse primer อย่างละ 0.5 µM, Taq DNA Polymerase 0.2 unit (ตารางที่ 5) โดยกำหนดอุณหภูมิในแต่ละรอบดังนี้ (1) 94°C นาน 5 นาที (2) 94°C นาน 30 วินาที (3) 60°C นาน 1 นาที (4) 72°C นาน 3 นาที จากนั้นวนกลับไปขั้นที่ (2) อีก 29 รอบ (5) 72°C นาน 10 นาที และ (6) 20°C นาน 10 นาที

ตารางที่ 5 สภาพที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ลำดับ	สารตั้งต้น	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
1	dH ₂ O	-	6.726
2	10XBff	1 X	1
3	25 mM MgCl ₂	1 mM	0.4
4	5 mM dNTPs	0.167 mM	0.334
5	10 µM F+R Primer	0.5 µM	0.5
6	5 Unit/µl Taq DNA Polymerase	0.02 Unit/µl	0.04
7	100 ng/µl gDNA	100 ng	1
ปริมาตรรวม			10

ตารางที่ 6 คุณลักษณะเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และหมายเลข (Accession number)

ตำแหน่ง	หมายเลข	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	T _a (°C)	รูปแบบเบสซ้ำ	ขนาดอัลลีล
<i>Rbr-2</i>	JX488044	F: TGTGGATACAGATAGGGAGTC R: GCCTTTGAGTCAGTCACATTA	60	[TG] ₂₇	150
<i>Rbr-3</i>	-	F: TCATCTGCTGACGTTTCC R: TCTATTACCAGGATGACGCG	54	[ATT] ₄	214
<i>Rbr-7</i>	JX488046	F: CCACCCACTACCTGGCATC R: ATGTGCTGGAGCCGCTAAC	60	[TC] ₁₄	134
<i>Rbr-8</i>	JX488047	F: GCAACGTTCAAGACACTCAC R: GAAGCATCACAACTCCTATCAC	60	[GA] ₇	166
<i>Rbr-9</i>	JX488048	F: CACTCCCTGAATCTAGAAGTG R: CAGCTGCTCCCAGAGATG	60	[TG] ₉	216
<i>Rbr-10</i>	JX488048	F: CTCATCTCTGGGAGCAGCT R: CTGTGTGGCCTTGTAATCG	60	[CA] ₅ CCCG [CA] ₁₀	243
<i>Rbr-12</i>	JX488049	F: ACAAGCCCGTGGTGTGAC R: TGCTCCCAGAGATGAGGTG	60	[TG] ₈	168
<i>Rbr-13</i>	JX488049	F: ACCTCATCTCTGGGAGCAG R: GTCTGTGAGTCGTCAGCATG	60	[CA] ₅ CCCG [CA] ₁₀	181
<i>Rbr-14</i>	JX488054	F: ACGTAGAAGAGCACGCACAG R: TTTCAGCCTGGTCACTTGC	60	[CA] ₇	202
<i>Rbr-15</i>	JX488051	F: CGAGAGAGTCCGCTGAAG R: GGGAATGTTGGGTGTCTTC	60	[TG] ₉ CG[TG] ₇	186
<i>Rbr-21</i>	JX488050	F: TCAACCTCTCCAAGGACAC R: GGCAATGTATAGCGATCAC	60	[CA] ₁₃	164

3.1 การประเมินสภาพความหลากหลายของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

ผลการประเมินคุณลักษณะเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่งเมื่อทดสอบในปลาทุสมุทสงคราม 52 ตัวอย่าง (ตารางที่ 7) มีจำนวนอัลลีลตั้งแต่ 4 – 10 อัลลีลต่อตำแหน่ง ตำแหน่งที่พบจำนวนอัลลีลต่ำที่สุดคือ *Rbr-8* และ *Rbr-9* พบ 4 อัลลีล ตำแหน่งที่พบจำนวนอัลลีลสูงที่สุดคือ *Rbr-13* พบ 10 อัลลีล จำนวนอัลลีลที่พบสอดคล้องกับจำนวนซ้ำของลำดับเบสแกน เช่น ตำแหน่ง *Rbr-8* *Rbr-9* *Rbr-12* และ *Rbr-14* มีจำนวนซ้ำของลำดับเบสแกน 7-9 ซ้ำ ก็พบจำนวนอัลลีล 4-5 อัลลีล ในขณะที่ ตำแหน่ง *Rbr-7* และ ตำแหน่ง *Rbr-13* มีจำนวนซ้ำของลำดับเบสแกน

14-15 ซ้ำ ก็พบจำนวนอัลลีลมากขึ้นเป็น 9-10 อัลลีล สอดคล้องกับทฤษฎีที่ว่าจำนวนซ้ำของลำดับเบสแกนนั้นมีผลต่อความหลากหลายของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Jin *et al.*, 1996; Wierdl *et al.*, 1997) เนื่องจากเกิดความผิดพลาดในขั้นตอนการจำลองตัวของดีเอ็นเอสายใหม่ เกิดการเลื่อนไถลของสายดีเอ็นเอ ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนซ้ำ (Schlötterer and Harr, 2001) นอกจากจำนวนซ้ำแล้ว รูปแบบของเบสซ้ำก็มีผลต่ออัตราการเกิดการเลื่อนไถลด้วย โดยเบสซ้ำแบบ GT หรือ CA จะมีอัตราสูงสุด รองมาคือเบสซ้ำแบบ GA หรือ CT ส่วนแบบ AT หรือ TA จะมีอัตราการเกิดต่ำที่สุด (Bachtrog *et al.*, 2000) สอดคล้องกับผลที่พบในเครื่องหมายตำแหน่ง *Rbr-7* และตำแหน่ง *Rbr-13* ที่พบความหลากหลายสูงสุดก็มีรูปแบบของเบสซ้ำแบบ TC หรือ CA ตามลำดับ

เมื่อทดสอบความเป็นอิสระต่อกัน (Genotypic linkage disequilibrium) ของเครื่องหมาย พบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 3 ตำแหน่งไม่เป็นอิสระต่อกันได้แก่คู่ *Rbr-9* และ *Rbr-12* คู่ *Rbr-9* และ *Rbr-13* และคู่ *Rbr-9* และ *Rbr-13* โดยมีค่า $P\text{-value} < 0.05$ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 คุณสมบัติเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง เมื่อทดสอบในปลาทุสมุทสรสงคราม

ประชากร (N)	<i>Rbr-7</i>	<i>Rbr-8</i>	<i>Rbr-9</i>	<i>Rbr-12</i>	<i>Rbr-13</i>	<i>Rbr-14</i>	ค่าเฉลี่ย
RBSS (52)	(52)	(52)	(51)	(52)	(35)	(52)	(48)
A	9	4	4	5	10	5	6.1667 ± 2.63
H _O	0.6154	0.0962	0.6078	0.5962	0.6286	0.6731	0.5362 ± 0.22
H _E	0.6462	0.1288	0.6591	0.6662	0.7542	0.6701	0.5871 ± 0.22
F _{IS}	0.0481	0.2555	0.0785	0.1060	0.1666	-0.0045	0.0818
HWE	0.0586	0.1919	0.6574	0.5743	0.1094	0.9103	

ตารางที่ 8 ค่า P-value (เหนือแนวทแยง) และค่า S.E. ในการทดสอบความเป็นอิสระต่อกันของเครื่องหมาย 6 ตำแหน่ง ในปลาทุสมุทสรสงคราม จากโปรแกรม Genepop

ตำแหน่ง	<i>Rbr-7</i>	<i>Rbr-8</i>	<i>Rbr-9</i>	<i>Rbr-12</i>	<i>Rbr-13</i>	<i>Rbr-14</i>
<i>Rbr-7</i>		0.7411	0.0568	0.0426	0.1399	0.6868
<i>Rbr-8</i>	0.0183		0.1678	0.1761	0.4766	0.2589
<i>Rbr-9</i>	0.0076	0.0070		0.0000	0.0073	0.4932
<i>Rbr-12</i>	0.0087	0.0065	0.0000		0.0000	0.3381
<i>Rbr-13</i>	0.0217	0.0176	0.0023	0.0000		0.0120
<i>Rbr-14</i>	0.0210	0.0094	0.0123	0.0101	0.0044	

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาต่างชนิดในสกุลเดียวกัน

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 6 ตำแหน่ง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาลังได้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสม และอุณหภูมิในแต่ละรอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เหมือนกับที่ใช้ในปลาทุ ผลความหลากหลายของปลาลัง เมื่อพิจารณาที่ค่าจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลในช่วง 4-16 อัลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.5 สูงกว่าที่พบในปลาทุ ตำแหน่งที่พบอัลลีลจำนวนต่ำสุดคือ *Rbr-12* พบ 4 อัลลีลใกล้เคียงกับปลาทุซึ่งพบ 5 อัลลีล ส่วนตำแหน่งที่พบอัลลีลจำนวนสูงสุดเป็นตำแหน่งเดียวกันในปลาทุคือ *Rbr-13* แต่พบจำนวนอัลลีลมากกว่า (16 อัลลีล) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในปลาลังส่วนมากจะพบจำนวนอัลลีลสูงกว่าปลาทุ ยกเว้นตำแหน่ง *Rbr-7* ซึ่งในปลาทุพบถึง 9 อัลลีล แต่ในปลาลังกลับพบเพียง 5 อัลลีล (ตารางที่ 9)

ผลการทดสอบเครื่องหมายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาต่างชนิดในครั้งนี้ ไม่พบปัญหาการใช้ไพรเมอร์ข้ามชนิด เหมือนในปลาอื่น เช่น ปลา *Scomber australacicus* สามารถใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของปลา *S. japonicas* ได้ 8 จาก 9 ตำแหน่ง (Yagishita and Kobayashi, 2008) ปลา *S. japonicas* สามารถใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของปลา *S. australacicus* ได้ 9 จาก 10 ตำแหน่ง (Tang et al., 2009) ปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) ปลาเทพา (*P. sanitwongsei*) และปลาสาวย (*Pangasianodon hypophthalmus*) สามารถใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของปลาบึก (*P. gigas*) ได้ 6, 7 และ 8 ตำแหน่งตามลำดับ จาก 10 ตำแหน่ง (Na-Nakorn et al., 2006) จากกรณีของปลาเทโพและปลาเทพานั้น การประสบความสำเร็จของการทดสอบเครื่องหมายไม่ได้ขึ้นกับความต่างของชนิดหรือสกุลเท่านั้น แม้เป็นชนิด

เดียวกันแต่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกันมากก็อาจใช้เครื่องหมายร่วมกันไม่ได้ เช่น ในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่พบความแตกต่างกันมากระหว่างกลุ่มที่ศตวันออกและที่ศตวันตกตามเส้นแบ่งของฮักลีย์ (Huxley's line) จนไม่สามารถใช้เครื่องหมายที่พัฒนามาจากอีกกลุ่มได้ (Charoentawee *et al.*, 2006; de Bruyn *et al.*, 2004)

ผลทดสอบความเป็นอิสระต่อกันของเครื่องหมายทั้ง 6 ตำแหน่ง พบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ *Rbr-9* และ *Rbr-12* ไม่เป็นอิสระต่อกัน มีค่า P-value < 0.05 (ตารางที่ 10) ดังนั้นการเลือกเครื่องหมายไปศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรจึงต้องตัดทั้งสองตำแหน่งนี้ออกไปเหลือเพียง 4 ตำแหน่ง คือ *Rbr-7* *Rbr-8* *Rbr-13* และ *Rbr-14*

ตารางที่ 9 คุณลักษณะเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง เมื่อทดสอบในปลาลังระนอง

ประชากร (N)	ตำแหน่ง						ค่าเฉลี่ย
	<i>Rbr-7</i>	<i>Rbr-8</i>	<i>Rbr-9</i>	<i>Rbr-12</i>	<i>Rbr-13</i>	<i>Rbr-14</i>	
RKRN (48)	(47)	(46)	(45)	(47)	(41)	(46)	(45.33)
A	5	7	5	4	16	8	7.5000 ± 4.41
H _O	0.6596	0.7174	0.2667	0.2553	0.8781	0.6087	0.5643 ± 0.25
H _E	0.6410	0.7568	0.2617	0.2819	0.9178	0.7831	0.6070 ± 0.27
F _{IS}	-0.0292	0.0526	-0.0193	0.0951	0.0438	0.2246	0.0717
HWE	0.9164	0.3303	0.4931	0.3760	0.2714	0.0001	

ตารางที่ 10 ค่า P-value (เหนือแนวทแยง) และค่า S.E. ในการทดสอบความเป็นอิสระต่อกันของเครื่องหมาย 6 ตำแหน่ง ในปลาลังระนอง จากโปรแกรม Genepop version 4.2.2

ตำแหน่ง	<i>Rbr-7</i>	<i>Rbr-8</i>	<i>Rbr-9</i>	<i>Rbr-12</i>	<i>Rbr-13</i>	<i>Rbr-14</i>
<i>Rbr-7</i>		0.5698	0.1810	0.4280	0.5469	0.1155
<i>Rbr-8</i>	0.0217		0.8167	0.4630	1.0000	0.5928
<i>Rbr-9</i>	0.0102	0.0116		0.0000	0.7589	0.3422
<i>Rbr-12</i>	0.0142	0.0153	0.0000		0.5616	0.1392
<i>Rbr-13</i>	0.0256	0.0000	0.0184	0.0178		0.6212
<i>Rbr-14</i>	0.0118	0.0235	0.0153	0.0092	0.0272	

4. การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรปลาทุและปลาลัง

4.1 การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรปลาทุ

4.1.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาทุ 4 ประชากรใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 4 ตำแหน่ง พบปลาทุทั้ง 4 ประชากรมีความหลากหลายระดับปานกลาง และมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 11) จำนวนอัลลีลเฉลี่ยแต่ละประชากรมีค่า 5.75-7.00 อัลลีล ค่าอัลลีลลิคริเชนส (Ar) เฉลี่ยมีค่า 3.77-4.30 ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o) มีค่าเท่ากับ 0.44-0.50 เมื่อพิจารณาความหลากหลายเปรียบเทียบระหว่างประชากรฝังบ่อไทย (สมุทรสงครามและเพชรบุรี) กับฝังบ่ออานามัน (ระนองและตรัง) พบว่าฝังบ่อไทย ($Ar = 4.1-4.3$, $H_o = 0.49-0.50$) จะมีค่าสูงกว่าฝังบ่ออานามัน ($Ar = 3.7-3.8$, $H_o = 0.44-0.48$)

ค่าสังเกตความถี่เฮเทอโรไซโกต (H_o) เฉลี่ยในแต่ละประชากรน้อยกว่าค่าคาดหวัง (H_e) และมีค่า F_{IS} เป็นบวก แต่เมื่อพิจารณาทีละตำแหน่งในแต่ละประชากร พบบางตำแหน่งมีค่า H_o มากกว่า H_e ได้แก่ ตำแหน่ง *Rbr-14* ในปลาทุสมุทรสงคราม ตำแหน่ง *Rbr-8* ในปลาทุระนอง ตำแหน่ง *Rbr-7* และ *Rbr-8* ในปลาทุสตูล

ผลการทดสอบการเข้าสู่สมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบอร์ก เมื่อพิจารณาเครื่องหมายทีละตำแหน่ง พบว่าตำแหน่ง *Rbr-7* *Rbr-8* และ *Rbr-14* อยู่ในสมดุลในทุกประชากร ($P > 0.05$) แต่ตำแหน่ง *Rbr-13* ของปลาทุเพชรบุรีไม่อยู่ในสมดุล ($P < 0.05$) โดยมีค่า F_{IS} เป็นบวก แสดงถึงการพบเฮเทอโรไซโกตน้อยเกินไป

4.1.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

ผลความแตกต่างระหว่างประชากรจากค่า Pairwise F_{ST} (ตารางที่ 12) และค่า F_{ST} รวม (ตารางที่ 13) ไม่พบความแตกต่างระหว่างประชากร และจัดให้ปลาทุทั้ง 4 ประชากรเป็นกลุ่มประชากรเดียวกันแม้จะมาจากต่างฝังบ่อ แต่ผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้แบบ UPGMA ระหว่างปลาทุ 4 ประชากร สามารถจัดกลุ่มปลาทุจากอ่าวไทยและอานามันแยกจากกันได้ มีค่า Bootstrap เท่ากับ 68.9 และ 71.2 ตามลำดับ (ภาพที่ 9)

ผลการศึกษาในปลาทุครั้งนี้ไม่พบโครงสร้างประชากร และจัดให้ปลาทุทั้ง 4 ประชากรเป็นกลุ่มประชากรเดียวกันแม้จะมาจากต่างฝั่งทะเล ชัดแย้งกับผลการศึกษาปลาทุก่อนหน้านี้ ที่ใช้เครื่องหมาย ISSR จำนวน 49 ตำแหน่ง พบความต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างประชากรสองฝั่งทะเล ($F_{ST} = 0.37$) (Srinulgray, 2008) และขัดแย้งกับผลการศึกษาในสัตว์น้ำอื่นเช่น ในปลาเก๋าดอกแดง (*Epinephelus coioides*) ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 4 ตำแหน่ง พบความต่างระหว่างประชากรจากตรัง และนครศรีธรรมราช ($F_{ST} = 0.074$) (Antoro *et al.*, 2006) ในหอยลาย (*Paphia undulata*) ใช้เครื่องหมาย ISSR จำนวน 300 ตำแหน่ง พบความต่างระหว่างประชากรจากสุราษฎร์ธานี และสตูลอย่างมาก ($F_{ST} = 0.48$) (Donrung *et al.*, 2011) ในหอยเป้าฮื้อ (*Halotis asinina*) ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 3 ตำแหน่ง พบความต่างระหว่างประชากรจากเกาะลิบง และเกาะเสม็ด ($F_{ST} = 0.21$) (Tang *et al.*, 2004)

ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาในปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) ที่ไม่พบความแตกต่างของประชากรระหว่างฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน ซึ่งการศึกษาปลาช่อนทะเลนี้ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 7 ตำแหน่ง (มีค่า A เฉลี่ย = 17.7, ค่า Ar เฉลี่ย = 12.5, ค่า H_o เฉลี่ย = 0.775) เก็บตัวอย่างปลาจากอ่าวไทยสามแหล่ง และจากทะเลอันดามันอีกสามแหล่ง แหล่งละ 40-47 ตัวอย่าง ผลการเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างประชากรมีค่าต่ำและไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($F_{ST} = -0.0032-0.0081$ และ $R_{st} = -0.0109-0.066$) โดยผู้วิจัยให้เหตุผลว่าแม้คาบสมุทรลาลูที่กั้นอยู่มีระยะทางถึง 1,640 กิโลเมตร แต่ปลาช่อนทะเลนั้นก็สามารถอพยพได้ไกลถึง 1,000 กิโลเมตร (660 ไมล์) และมีพฤติกรรมอพยพตามสัตว์ทะเลขนาดใหญ่อย่างฉลามวาฬ อาจช่วยส่งเสริมให้อพยพได้ไกลยิ่งขึ้นไปอีก นอกจากนี้การถ่ายเทยีนระหว่างประชากรอาจเกิดจากการล่องลอยของตัวอ่อนตามกระแสน้ำทะเลร่วมด้วยก็ได้ สุดท้ายผู้วิจัยเสริมว่าในอนาคตการเพิ่มตำแหน่งเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และเพิ่มการศึกษาในส่วน of ไมโทคอนเดรียจะช่วยให้เห็นรายละเอียดได้มากขึ้น (Phinchongsakuldit *et al.*, 2013) และแม้ว่าการศึกษาปลาทุของ Srinulgray (2008) ด้วยเครื่องหมาย ISSR นั้นจะพบความแตกต่างระหว่างประชากรจากสองฝั่งทะเล แต่ผลการศึกษาในส่วน control region ของไมโทคอนเดรีย ขนาด 549 bp กลับพบความแปรปรวนต่ำ (ตำแหน่งแปรปรวนพบ 7 ตำแหน่ง และมี 10 haplotype) และไม่พบรูปแบบที่จำเพาะระหว่างอ่าวไทยและทะเลอันดามันเช่นกัน ต้องวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลยีน *cytochrom b* ขนาด 627 bp จึงจะสามารถแสดงโครงสร้างประชากรระหว่างฝั่งทะเลได้

ผลการประมาณค่า N_e ของปลาทุด้วยวิธี Linkage disequilibrium ทั้ง 4 ประชากรมีค่าต่ำมาก (ตารางที่ 14) ($N_e = 18.7-133.9$) เมื่อเทียบกับปลา Atlantic mackerel *Scomber scombrus* ($N_e = 1.8 \times 10^5 - 6.1 \times 10^5$) (Zardoya *et al.*, 2004) ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า N_e คือการผสมพันธุ์ที่มีอัตราส่วนเพศไม่เท่ากับหนึ่ง หรือประชากรมีสมาชิกที่มีอายุต่างกันเป็นรุ่น ๆ แม้อัตราส่วนเพศของปลาทุจะมีค่าใกล้เคียงหนึ่ง (ในอ่าวไทยมีค่า=1:1.15 ในทะเลอันดามันมีค่า=1:0.85) (ทัศนพล และคณะ 2550) แต่การมีพฤติกรรมผสมพันธุ์แบบกลุ่มนั้น ปลาทุตัวอาจไม่ได้ถ่ายทอดอัลลีลสู่รุ่นต่อไป กลุ่มปลาที่ได้ถ่ายทอดอัลลีลสู่รุ่นต่อไปจริงๆ ก็อาจมีสัดส่วนเพศที่ต่างออกไปด้วย และสัดส่วนของลูกที่ได้จากพ่อแม่แต่ละคู่ก็ไม่เท่ากันทำให้ค่า N_e มีค่าต่ำ (อุทัยรัตน์, 2551) นอกจากนี้การที่ประชากรปลาทุถูกทำประมงอย่างหนักจนเกินกำลังการผลิต ทำให้ผลผลิตลดลงอย่างต่อเนื่องระหว่างปี พ.ศ. 2548-2552 (กรมประมง, 2553) อาจส่งผลให้เกิดการขาดช่วงทางพันธุกรรมในทิศทางที่ทำให้ประชากรมีขนาดเล็กลง บางอัลลีลสูญหาย ทำให้ยีนในสภาพโฮโมไซกัสลดลง และมีผลต่อ N_e ในประชากรด้วย

และเนื่องจากผลการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 4 ตำแหน่งตรวจไม่พบโครงสร้างประชากรของปลาทุ ในการประมาณค่า N_e จึงรวมประชากรปลาทุสมุทรสงครามและปลาทุเพชรบุรีเข้าด้วยกันเป็นประชากรปลาทุฝั่งอ่าวไทย และรวมข้อมูลจากประชากรปลาทุระนองและตรังเข้าด้วยกันเป็นประชากรปลาทุฝั่งทะเลอันดามัน เพื่อประมาณค่า N_e เปรียบเทียบกันพบว่า ปลาทุฝั่งทะเลอันดามันมีค่า N_e เป็นอนันต์ ส่วนฝั่งอ่าวไทยมีค่าเท่ากับ 431.1 ค่าช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ของประชากรทั้งสองกลุ่มมีขอบเขตบนสูงเป็นอนันต์ (ตารางที่ 14) ซึ่งสาเหตุที่การประมาณค่า N_e เป็นอนันต์ Waples and Do (2010) สรุปว่าอาจเกิดจากการสุ่มตัวอย่างน้อยเกินไปไม่เป็นตัวแทนที่ดีของประชากร ประชากรมีขนาดใหญ่มากทำให้การประมาณค่าไม่มีความเที่ยงตรง มีการใช้อัลลีลที่มีความถี่ต่ำในการประมาณค่าซึ่งจะส่งผลให้มีความเที่ยงตรงลดลง มีจำนวนเครื่องหมายน้อยเกินไป ดังนั้นการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายและจำนวนอัลลีลจะยิ่งช่วยเพิ่มความแม่นยำในการประมาณค่ายิ่งขึ้น

ตารางที่ 11 ค่าระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทุ (R. brachysoma) เมื่อใช้
เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 4 ตำแหน่ง

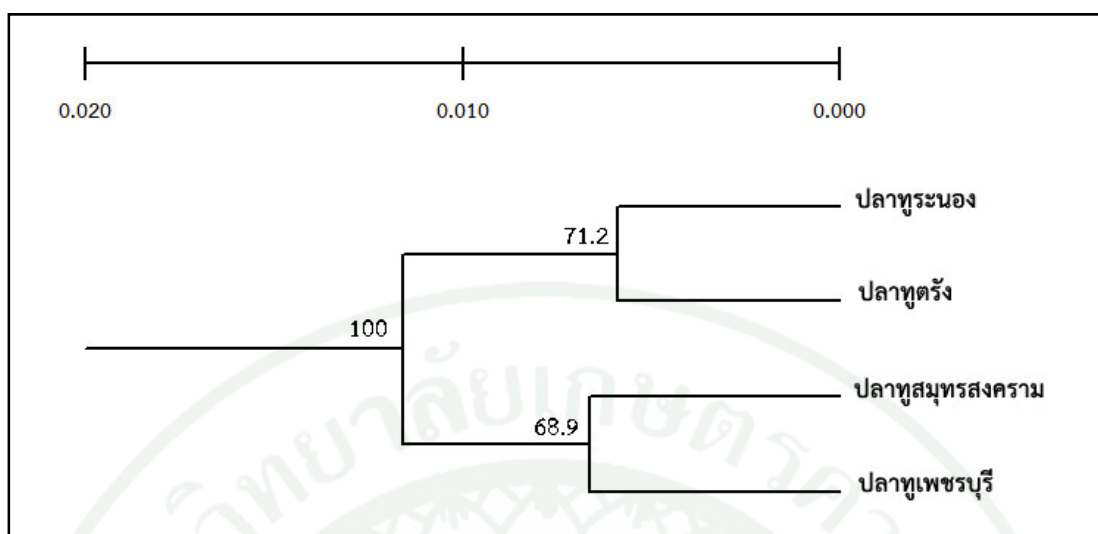
ประชากร (N)	ตำแหน่ง				ค่าเฉลี่ย
	Rbr-7	Rbr-8	Rbr-13	Rbr-14	
สมุทรสงคราม (52)	(52)	(52)	(35)	(52)	(48)
A	9	4	10	5	7.0000 ± 2.94
Ar	5.215	1.967	6.093	3.926	4.3002
H _O	0.6154	0.0962	0.6286	0.6731	0.5033 ± 0.27
H _E *	0.6462	0.1288	0.7425	0.6701	0.5494 ± 0.28
F _{IS} *	0.0481	0.2555	0.1666	-0.0045	0.0746
HWE	0.0656	0.1955	0.1129	0.9069	
เพชรบุรี (52)	(52)	(38)	(35)	(52)	(44)
A	9	3	9	5	6.5000 ± 3
Ar	4.711	2.052	5.836	3.962	4.1402
H _O	0.5769	0.1315	0.6285	0.6346	0.4929 ± 0.24
H _E *	0.5774	0.1715	0.7407	0.6740	0.5409 ± 0.25
F _{IS} *	0.001	0.2355	0.1534	0.059	0.0781
HWE	0.8813	0.2593	0.0000	0.3479	
ระนอง (54)	(49)	(45)	(27)	(54)	(44)
A	8	2	8	5	5.7500 ± 2.87
Ar	5.083	1.682	5.196	3.578	3.8847
H _O	0.6122	0.1111	0.5925	0.6296	0.4863 ± 0.25
H _E *	0.6231	0.1061	0.7148	0.6507	0.5237 ± 0.28
F _{IS} *	0.0177	-0.0476	0.1738	0.0327	0.0538
HWE	0.4849	1.0000	0.2471	0.8784	
ตรัง (54)	(49)	(52)	(45)	(48)	(48.5)
A	7	3	10	6	6.5000 ± 2.88
Ar	4.305	1.863	5.088	3.862	3.7795
H _O	0.5918	0.1346	0.5555	0.4791	0.4402 ± 0.20
H _E *	0.5701	0.1278	0.6871	0.6747	0.5150 ± 0.26
F _{IS} *	-0.0384	-0.0531	0.1933	0.2921	0.1433
HWE	0.1562	1.0000	0.0828	0.0518	

ตารางที่ 12 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ปรับค่าแล้วของ Nei [Nei's unbiased measurement of genetic distance (1978)] จากโปรแกรม PopGene V.1.31. ค่า Pairwise F_{ST} จากโปรแกรม Genepop V.4.2 และค่า P-value ของ Pairwise F_{ST} ระหว่างปลา 4 ประชากร จากโปรแกรม Arlequin V.3.11

คู่ประชากรปลาที่เปรียบเทียบ		ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม	ค่า Pairwise F_{ST}	ค่า P-value ของ Pairwise F_{ST}
สมุทรสงคราม	เพชรบุรี	0.0004	-0.0064	0.9909
สมุทรสงคราม	ระนอง	0.0072	-0.0020	0.9909
เพชรบุรี	ระนอง	0.0065	-0.0026	0.9279
สมุทรสงคราม	ตรัง	0.0043	-0.0029	0.9909
เพชรบุรี	ตรัง	0.0026	-0.0048	0.9818
ระนอง	ตรัง	-0.0003	-0.0071	0.9909

ตารางที่ 13 ค่าสัมประสิทธิ์ F ในเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง ของข้อมูลปลา 4 ประชากร จากโปรแกรม Genepop V.4.2

เครื่องหมาย	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
<i>Rbr-7</i>	0.0091	-0.0032	0.0060
<i>Rbr-8</i>	0.1082	-0.0088	0.1004
<i>Rbr-13</i>	0.1726	0.0007	0.1732
<i>Rbr-14</i>	0.0912	-0.0082	0.0837
รวมทุกตำแหน่ง	0.0878	-0.0043	0.0838



ภาพที่ 10 แผนภูมิต้นไม้แบบ UPGMA ระหว่างปลา 4 ประชากร สร้างโดยโปรแกรม TFPGA

ตารางที่ 14 ค่าประมาณ N_e ของประชากรปลาจากโปรแกรม NeEstimator V.2.01

	สมุทร- สงคราม	เพชรบุรี	รวมฝั่ง อ่าวไทย	ระนอง	ตรัง	รวมฝั่ง อันดามัน
ค่าประมาณ N_e	133.9	27.3	431.5	18.7	100	∞
ช่วงความเชื่อมั่น 95%						
ขอบเขตบน	42.5	16.3	102.7	11.1	37.6	154.6
ขอบเขตล่าง	∞	56.3	∞	37.5	∞	∞

4.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาลัง

4.2.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

ปลาลังทั้ง 4 ประชากรมีระดับความหลากหลายค่อนข้างสูงใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 8) และสูงกว่าเมื่อเทียบกับปลา ปลาลังมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยแต่ละประชากรเท่ากับ 7.50 -9.75 อัลลีลต่อตำแหน่ง ค่าอัลลีลลิกซ์เนส (Ar) เฉลี่ยมีค่า 5.94-6.39 ค่าสังเกตความถี่เฮเทอโรไซโกต (H_o) มีค่าเท่ากับ 0.64 -0.72 ระดับความหลากหลายที่พบนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาปลาลัง โดยใช้

ข้อมูลไมโทคอนเดรียส่วน D-loop พบว่ามีความหลากหลายสูงมาก (ค่าเฉลี่ย nucleotide diversity = 1.14% ค่าเฉลี่ย haplotype diversity = 0.9-1) (Ghazali *et al.*, 2012)

ค่าสังเกตความถี่เฮเทอโรไซโกต (H_O) เฉลี่ยในแต่ละประชากรน้อยกว่าค่าคาดหวัง (H_E) และมีค่า F_{IS} เป็นบวก แต่เมื่อพิจารณาแต่ละตำแหน่งในแต่ละประชากร พบบางตำแหน่งมีค่า H_O มากกว่า H_E ได้แก่ ตำแหน่ง *Rbr-7* ในปลาลังระนองและปลาลังภูเก็ต ตำแหน่ง *Rbr-13* ในปลาลังพังงา

ผลการทดสอบการเข้าสู่สมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก เครื่องหมายส่วนมากอยู่ในสมดุล ($P > 0.05$) ยกเว้นตำแหน่ง *Rbr-8* ในปลาลังสตูล ตำแหน่ง *Rbr-13* ในปลาลังภูเก็ต และตำแหน่ง *Rbr-14* ในปลาลังระนอง โดยทั้งสามตำแหน่งมีค่า F_{IS} มีค่าเป็นบวก แสดงถึงการพบเฮเทอโรไซโกตน้อยเกินไป

4.2.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

ผลทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากร ค่า Pairwise F_{ST} (ตารางที่ 16) ค่า F_{ST} รวมเท่ากับ 0.0073 (ตารางที่ 17) ไม่พบโครงสร้างประชากร แสดงว่าประชากรปลาลังทั้ง 4 เป็นกลุ่มเดียวกันทั้งหมดผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้พบการจัดกลุ่มสอดคล้องกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ ปลาลังระนองและพังงาซึ่งอยู่จังหวัดติดกันมีความใกล้ชิดกันมากที่สุด ถัดมาเป็นปลาลังจากภูเก็ต ส่วนปลาลังจากสตูลมีความแตกต่างจากประชากรอื่นมากที่สุด (ภาพที่ 10)

ผลการจัดกลุ่มปลาลังทางฝั่งทะเลอันดามันเป็นกลุ่มประชากรเดียวกันนี้ สอดคล้องกับผลการศึกษาปลาลังจากรัฐซาบาห์ (Sabah) ประเทศมาเลเซีย ที่ใช้ข้อมูลไมโทคอนเดรียส่วน D-loop และผลไม่พบโครงสร้างประชากรจากตัวอย่าง 5 แหล่ง รอบชายฝั่งรัฐซาบาห์ที่มีระยะทางรวมประมาณ 800 กิโลเมตร (Ghazali *et al.*, 2012) แต่ชายฝั่งจากระนองถึงสตูลนั้นมีระยะทางเพียง 500-600 กิโลเมตรเท่านั้น จึงไม่เป็นอุปสรรคในการแพร่กระจายตัวของปลาลัง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาทั้งกระดานขาม่วง (*Thenus unimaculatus*) โดยใช้ข้อมูลส่วน 12sr DNA และยีน COI ในไมโทคอนเดรียพบว่าประชากรทั้งตลอดแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน จากระนองถึงสตูลเป็นประชากรเดียวกัน โดยเป็นผลจากรูปแบบกระแสน้ำที่ช่วยกระจายลูกกุ้งวัยอ่อน ทำให้มีการถ่ายเทยีนระหว่างกัน (Wongruenpibool and Denduangboripant, 2013) และ การศึกษาปูแสม (*Episesarma versicolor*) (Supmee *et al.*, 2012) โดยใช้ข้อมูลส่วน control

region ในโมโตคอนเดรียพบว่าประชากรปูสมตลอดแนวชายฝั่งทะเลอันดามันเป็นประชากรเดียวกัน โดยผลของกระแสน้ำมีผลต่อการถ่ายเทยีนระหว่างประชากรปูเช่นกัน

ผลการจัดกลุ่มปลาลังทางฝั่งทะเลอันดามันนี้ มีข้อมูลบางส่วนสอดคล้องกับการวิเคราะห์สภาพภูมิศาสตร์ที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรปลาทุในทะเลอันดามันของวีระ และจำนอง (2539) แม้ว่าการวิเคราะห์นี้เน้นไปที่ปลาทุ แต่ก็พอจะปรับใช้กับปลาลังในทะเลอันดามันได้ ดังนี้ สภาพพื้นที่ทะเลอันดามันตอนล่างบริเวณอ่าวพังงาและอ่าวกระบุรี มีความยาวขอบฝั่งรอบอ่าวประมาณ 120 ไมล์ทะเล และลึกไม่เกิน 35 เมตร ปลาทุและปลาลังซึ่งเป็นปลาผิวน้ำขนาดกลาง น่าจะสามารถแพร่กระจายได้ทั่วถึง และอาจกว้างไกลเกินขอบเขตนี้ได้ถึงบริเวณจังหวัดตรังที่พื้นที่ท้องทะเลไม่มีความแตกต่างกัน กล่าวคือปลาลังจากทะเลอันดามันตอนล่าง คือภูเก็ตและสตูลในการศึกษาครั้งนี้ น่าจะสามารถแพร่กระจายไปมาทั่วถึงกันได้ ทำให้ลดความต่างระหว่างประชากรส่วนสภาพภูมิศาสตร์ของทะเลอันดามันตอนบนบริเวณจังหวัดระนอง ที่เป็นเขตแดนไทย-พม่า นั้น มีพื้นที่ทะเลเป็นอ่าวน้ำตื้น ความลาดชันน้อย มีป่าชายเลนและแม่น้ำไหลลงสู่อ่าว ทำให้ท้องทะเลเป็นโคลนปนทราย แต่ในเขต อ.คุระบุรี อ.ตะกั่วป่า และ อ.ท้ายเหมือง จังหวัดพังงา ท้องทะเลจะมีความลาดชันสูงมาก พื้นที่ท้องทะเลเป็นโขดหิน จากความต่างนี้น่าจะมีผลต่อเส้นทางการเดินทางและการแพร่กระจายได้ ซึ่งจากข้อมูลนี้หากมีโครงสร้างประชากรเกิดขึ้นก็ควรพบความต่างระหว่างประชากรทะเลอันดามันตอนบนและตอนล่าง

เมื่อพิจารณาค่า N_e แยกรายประชากรพบว่าผลการประมาณค่า N_e ของปลาลังมีค่าแตกต่างอย่างมากระหว่างประชากรจากทะเลอันดามันตอนบนและตอนล่าง ในปลาลังจากระนองและพังงามีค่าสูงมากเป็นอันดับ ส่วนประชากรภูเก็ตและสตูลมีค่าเท่ากับ 16.8 และ 60.9 ตามลำดับ แต่ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ไม่พบการเกิดโครงสร้างประชากรแสดงว่าประชากรปลาลังทั้งหมดเป็นกลุ่มเดียวกัน การประมาณค่า N_e จึงรวมทุกประชากรเข้าด้วยกันและประมาณค่า N_e ใหม่ได้เท่ากับ 1,047 ตัว (ตารางที่ 18) แต่ค่าที่ได้พบว่าในช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ที่กว้างมากและมีขอบเขตความเชื่อมั่นถึงค่าอันดับ ซึ่ง Waples and Do (2010) แนะนำว่าหากประชากรที่ศึกษามีขนาดใหญ่ การประมาณค่าขอบเขตบนที่แม่นยำจะทำได้ยากยิ่งขึ้น และหากมีการใช้อัลลีลที่มีความถี่ต่ำในการประมาณก็จะยิ่งทำให้การประมาณค่า N_e ให้เที่ยงตรงยากยิ่งขึ้น นอกจากนี้การใช้ตัวอย่างที่ไม่เป็นตัวแทนที่ดีของประชากรธรรมชาติ เช่นมีจำนวนน้อยเกินไป ก็อาจส่งผลให้ค่าประมาณ N_e มีผลเป็นอันดับได้ การเพิ่มจำนวนเครื่องหมายในการศึกษาเพื่อให้ได้ค่า N_e ที่ชัดเจนขึ้นน่าจะเป็นสิ่งจำเป็นในการนำเอาข้อมูลไปใช้วางแผนการจัดการทรัพยากรปลาทุและปลาลังในอนาคต จากการศึกษาของ Waples and Do (2010) นั้นได้จำลองชุดข้อมูลขึ้นมาเพื่อ

ประเมินความแม่นยำในการประมาณค่า N_e ด้วยวิธี Linkage disequilibrium พบว่าความแม่นยำในการประมาณค่า N_e ขึ้นกับผลของการสุ่มตัวอย่างและขนาดของ N_e ที่มีอยู่ เช่นหากประชากรมีจำนวน 100 ตัว การสุ่มตัวอย่าง 25 ตัว และใช้เครื่องหมายไมโครแซท 20 ตำแหน่ง จะสามารถประมาณค่า N_e ได้แม่นยำมาก (ผิดพลาดประมาณร้อยละ 1.6) แต่เมื่อใช้เครื่องหมายเพียง 5 ตำแหน่งและสุ่มตัวอย่างมา 25 ตัว การประมาณค่า N_e จะไม่มีความน่าเชื่อถือเลยแม้ประชากรจะมีขนาดเล็กเพียง 100 ตัว ค่าที่ได้จะมีค่าต่ำกว่า 100 มากๆ หรือสูงเกินกว่า 500 ซึ่งกรณีนี้คล้ายกับกรณีการศึกษาปลาทุและปลาลังครั้งนี้ที่มีเครื่องหมายเพียง 4 ตำแหน่ง จำนวนอัลลิล 3-21 อัลลิล และมีตัวอย่างจำนวนน้อยอาจทำให้ค่า N_e ที่ได้ไม่แม่นยำ

นอกจากการพิจารณาการจัดกลุ่มประชากรแยกตามชนิดแล้ว เมื่อรวมข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากปลาทุและปลาลังเพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้แบบ UPGMA พบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวนสี่ตำแหน่งสามารถแยกความแตกต่างของประชากรปลาทุออกจากปลาลังได้ชัดเจน โดยมีค่า bootstrap สนับสนุนเท่ากับ 100 การจัดกลุ่มภายในชนิดก็มีค่า bootstrap สนับสนุนที่สูงเช่นกัน โดยมีค่าเท่ากับ 100 และ 99.8 ในปลาทุและปลาลังตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรภายในแต่ละชนิดจะพบว่าปลาลังมีความแตกต่างระหว่างประชากรสูงกว่าปลาทุมาก (ภาพที่ 12)

ตารางที่ 15 ค่าระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาลัง (*R. kanagurta*) เมื่อใช้
เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 4 ตำแหน่ง

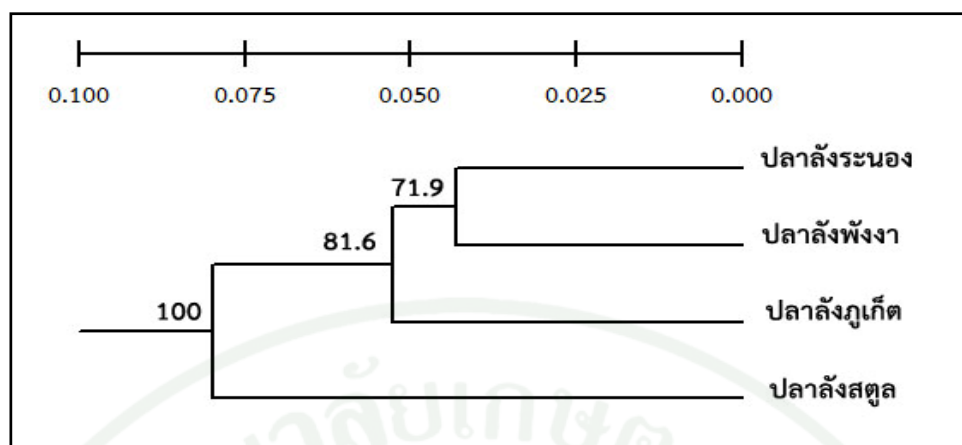
ประชากร (N)	ตำแหน่ง				ค่าเฉลี่ย
	<i>Rbr-7</i>	<i>Rbr-8</i>	<i>Rbr-13</i>	<i>Rbr-14</i>	
ระนอง (48)	(47)	(46)	(41)	(46)	(45)
A	5	7	16	8	9.0000 ± 4.83
Ar	3.802	5.062	9.935	5.706	6.1262
H _O	0.6595	0.7173	0.8780	0.6087	0.7159 ± 0.11
H _E *	0.6410	0.7568	0.9178	0.7830	0.7746 ± 0.11
F _{IS} *	-0.0292	0.0526	0.0438	0.2246	0.0772
HWE	0.9158	0.3365	0.2803	0.0002	
พังงา (52)	(14)	(19)	(20)	(35)	(22)
A	3	8	12	7	7.500 ± 3.69
Ar	2.997	6.597	8.666	5.53	5.9475
H _O	0.35714	0.73684	1.00000	0.62857	0.6806 ± 0.26
H _E *	0.63757	0.83357	0.88205	0.78592	0.7847 ± 0.10
F _{IS} *	0.4492	0.1189	-0.1377	0.2026	0.1302
HWE	0.0171	0.5570	0.2315	0.0744	
ภูเก็ต (49)	(45)	(50)	(50)	(36)	(45)
A	4	6	21	8	9.7500 ± 7.67
Ar	3.561	5.278	10.451	6.27	6.39
H _O	0.7111	0.7600	0.7800	0.6388	0.7225 ± 0.06
H _E *	0.6122	0.7802	0.9224	0.8153	0.7825 ± 0.12
F _{IS} *	-0.1636	0.0262	0.1557	0.2188	0.0715
HWE	0.5013	0.2810	0.0056	0.1059	
สตูล (52)	(9)	(37)	(14)	(39)	(25)
A	7	8	9	7	7.7500 ± 0.95
Ar	7	6.001	7.413	4.973	6.3467
H _O	0.7777	0.5675	0.6428	0.5897	0.6444 ± 0.09
H _E *	0.8627	0.8156	0.8492	0.7405	0.8170 ± 0.05
F _{IS} *	0.1040	0.3071	0.2500	0.2058	0.2413
HWE	0.4038	0.0000	0.1141	0.2020	

ตารางที่ 16 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ปรับค่าแล้วของ Nei [Nei's unbiased measurement of genetic distance (1978)] จากโปรแกรม PopGene V.1.31. ค่า Pairwise F_{ST} จากโปรแกรม Genepop V.4.2 และค่า P-value ของ Pairwise F_{ST} ระหว่างปลาลัง 4 ประชากร จากโปรแกรม Arlequin V.3.11

คู่ประชากรปลาลังที่เปรียบเทียบ		ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม	ค่า Pairwise F_{ST}	ค่า P-value ของ Pairwise F_{ST}
ปลาลังระนอง	ปลาลังพังงา	0.0255	-0.0040	0.7657
ปลาลังระนอง	ปลาลังภูเก็ต	0.0548	0.0080	0.4774
ปลาลังระนอง	ปลาลังสตูล	0.0768	0.0057	0.0720
ปลาลังพังงา	ปลาลังภูเก็ต	0.0549	0.0064	0.7747
ปลาลังพังงา	ปลาลังสตูล	0.1241	0.0064	0.0540
ปลาลังภูเก็ต	ปลาลังสตูล	0.1597	0.0253	0.0360

ตารางที่ 17 ค่าสัมประสิทธิ์ F ในเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง ของข้อมูลปลาลังรวม 4 ประชากร จากโปรแกรม Genepop V.4.2

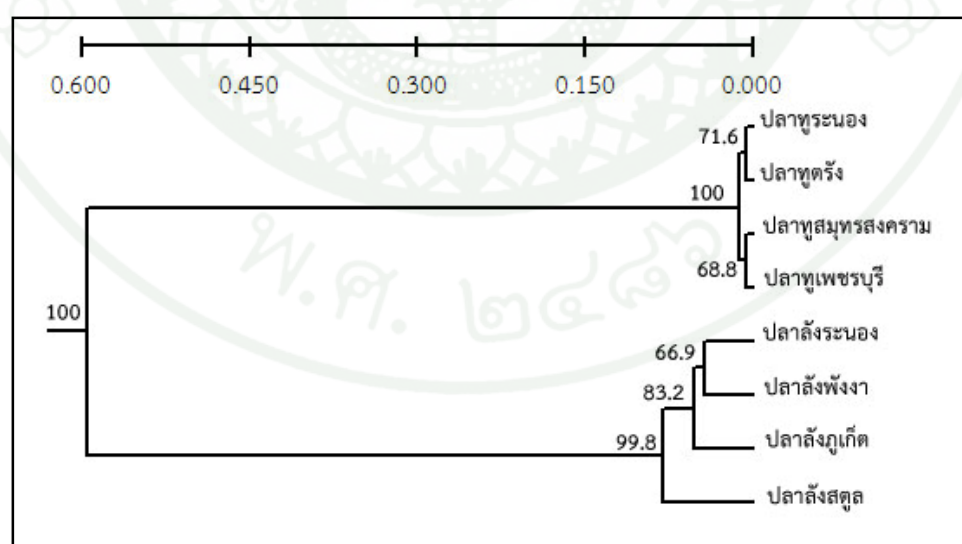
ตำแหน่ง	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
<i>Rbr-7</i>	0.0553	0.0115	0.0662
<i>Rbr-8</i>	0.1335	0.0008	0.1342
<i>Rbr-13</i>	0.1672	0.0100	0.1755
<i>Rbr-14</i>	0.1892	0.0022	0.1909
รวมทุกตำแหน่ง	0.1417	0.0058	0.1467



ภาพที่ 11 แผนภูมิต้นไม้แบบ UPGMA ระหว่างปลาลัง 4 ประชากร สร้างโดยโปรแกรม TFPGA

ตารางที่ 18 ค่าประมาณ N_e ของปลาลังจากโปรแกรม NeEstimator V.2.01

	ระนอง	พังงา	ภูเก็ต	สตูล	รวมปลาลังฝั่งอันดามัน
ค่าประมาณ N_e	∞	∞	14.8	60.9	1047.2
ช่วงความเชื่อมั่น 95%					
ขอบเขตบน	327.3	26.8	8.4	33.7	311.1
ขอบเขตล่าง	∞	∞	38	181.6	∞



ภาพที่ 12 แผนภูมิต้นไม้แบบ UPGMA ระหว่างปลาทู 4 ประชากร และปลาลัง 4 ประชากร สร้างโดยโปรแกรม TFPGA V.1.3

สรุปและข้อเสนอแนะ

การจำแนกชนิดปลาทุและปลาลังโดยใช้ข้อมูลลักษณะสัณฐาน โดยวิธีการวัดร่างกายแบบโครงร่าง และวิเคราะห์ข้อมูลนั้นด้วยวิธีวิเคราะห์ตัวประกอบหลัก พบว่าสามารถจำแนกปลากลุ่มนี้ได้ โดยความแปรปรวนส่วนมากเกิดจากความต่างของความลึกลำตัว รองลงมาคือความยาวของลำตัวช่วงท้าย

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์จากห้องสมุดดีเอ็นเอของปลาทุครั้งนี้ได้จำนวนโคลนที่มีลำดับเบสซ้ำ ร้อยละ 23 สามารถเพิ่มได้โดยการคัดกรองรอบที่สองก่อนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ในการออกแบบไพรเมอร์ข้ามลำดับเบสซ้ำ พบว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอกลุ่มหนึ่งที่ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้แม้จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำที่ต้องการ เนื่องด้วยข้อจำกัดเช่น มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหลือไม่เพียงพอให้ออกแบบไพรเมอร์ หากสามารถหาวิธีใช้ประโยชน์จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอกลุ่มนี้ได้ จะช่วยเพิ่มตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอได้

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ครั้งนี้ได้เครื่องหมายจำนวน 4 ตำแหน่ง ที่มีความหลากหลายของอัลลีลระดับปานกลาง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาทุ และปลาในสกุลเดียวกันคือปลาลังได้ การประยุกต์ใช้เครื่องหมายเพื่อศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรพบว่าปลาทุมีความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับปานกลางยังไม่ได้อยู่ในระดับที่ต่ำจนน่าเป็นห่วง ประกอบกับสถิติปริมาณการจับปลาทุในช่วงปี พ.ศ. 2551-2554 ที่เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 60 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่ามาตรการจัดการในปัจจุบันของกรมประมงมีความเหมาะสมทำให้ยังคงรักษาระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาทุไว้ได้ แต่เครื่องหมายทั้ง 4 ตำแหน่งนี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างประชากรปลาทุจากฝั่งอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามันได้ อาจเป็นผลเนื่องจากเครื่องหมายมีความหลากหลายของอัลลีลน้อยเกินไป หรือมีจำนวนเครื่องหมายน้อยเกินไป ทำให้มีกำลังในการจำแนกประชากรได้ไม่มากพอ หากมีจำนวนเครื่องหมายมากขึ้นอาจจะพบความแตกต่างของประชากรได้ ส่วนผลการศึกษาในปลาลังทางฝั่งทะเลอันดามัน พบว่าปลาลังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับปานกลางและมีค่าสูงกว่าปลาทุเล็กน้อย ผลการศึกษาจากเครื่องหมายทั้ง 4 ตำแหน่ง ตรวจไม่พบโครงสร้างประชากร สรุปว่าปลาลังฝั่งทะเลอันดามันจากจังหวัดระนองถึงสตูลเป็นกลุ่มประชากรเดียวทั้งหมด เมื่อพิจารณาร่วมกับสถิติปริมาณการจับปลาลังจากทะเลอันดามันในช่วงปี พ.ศ. 2551-2554 ที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 28 ผลการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนวิธีการบริหารจัดการของกรมประมงที่มีการจัดการปลาลังฝั่งทะเลอันดามัน

แบบประชากรเดียวว่าเป็นมาตรการที่เหมาะสม และยังคงรักษาระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาลงไว้ได้

จากสถิติปริมาณการจับปลาทุและปลาลัง ในช่วงปี พ.ศ. 2551-2554 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อประเมินผลกระทบจากการทำประมงที่แนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของประชากรปลาทั้งสองชนิด



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมประมง. 2507. ปลาทะเลของไทย. กรมประมง, พระนคร.

กรมประมง. 2553. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2551. เอกสารฉบับที่ 12/2553. ศูนย์สารสนเทศ, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมประมง. 2556. หนังสือสถิติหน่วยธุรกิจการประมง พ.ศ. 2554. เอกสารฉบับที่ 13/2556. กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง.

กัลยา วานิชบัญชา. 2548. การวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร. ภาควิชาสถิติ คณะพาณิชยศาสตร์ และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร.

คณะประมง. 2528. คู่มือวิเคราะห์พันธุ์ปลา. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

ดำรงห์ สมใจวงศ์. 2523. การทดลองติดเครื่องหมายปลาทุปล่อยลงทะเลในอ่าวไทย. รายงาน วิชาการฉบับที่ 13, งานปลาผิวน้ำ, กองประมงทะเล, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์

_____, ไพเราะ ศุทธากรณ์ และสกุล สุพงษ์พันธุ์. 2527. การศึกษาวิจัยประชากรปลาทุ (*Rastrelliger brachysoma* (Bleeker)) โดยการติดเครื่องหมายทางฝั่งทะเลอันดามัน. รายงานวิชาการฉบับที่ 48, ฝ่ายปลาผิวน้ำและสถานีประมงทะเลจังหวัดภูเก็ต, กอง ประมงทะเล, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 36 หน้า.

ทัศนพล กระจำนงดารุ พัชรี พันธุ์เล่ง พนิดา ซาลี ปิยวรรณ หัสดี. 2550. ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของ ปลาทุ *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) และปลาลัง *R. kanagurta* (Cuvier 1816) ในน่านน้ำไทย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 19/2551 สำนักวิจัยและพัฒนา ประมงทะเล กรมประมง. 36 หน้า.

- ธีระรักษ์ ศรีนวลกราย. 2551. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาทุ (Rastrelliger brachysoma) ในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน. วิทยานิพนธ์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บุญชัย เจียมปรีชา. 2523. การเปรียบเทียบลักษณะที่นับได้และลักษณะโครงร่างของปลาสกุลทุ-
 ลัง ในอ่าวไทย. รายงานวิชาการฉบับที่ 11, งานปลาผิวน้ำ, กองประมงทะเล, กรมประมง,
 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- ประภา วัฒนกุล. 2542. แหล่งและฤดูวางไข่ของปลาทุ *Rastrelliger neglectus* (van Kampen
 บริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันตกตอนบน (ประจวบคีรีขันธ์-ชุมพร). ใน ผลงานวิจัยประมงทะเล
 2533-2541 เล่มที่ 2: ปลาผิวน้ำ. ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยตอนบน, กองประมง
 ทะเล, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 524 หน้า
- ผศ.ดร. วนิชย์กุล และ วีระวัฒน์ หงสกุล. 2508. ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและน้ำหนักตัวของ
 ปลาทุและปลาลังในอ่าวไทย, พ.ศ. 2506, หน้า 219-246. ใน รายงานการประชุมทาง
 วิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ครั้งที่ 4 สาขาพืชและชีววิทยา กับสาขาสัตว์ 27-29
 มกราคม 2508. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- พัชรี พันธุ์เล่ง และ นพรัตน์ นาสุชล. 2545. ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปลาทุจากเครื่องมืออวนล้อม
 ตีปลาทุบริเวณเขตมาตรการอนุรักษ์ทรัพยากรสัตว์น้ำ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และ
 สุราษฎร์ธานี. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยตอนกลาง, กรมประมง. แหล่งที่มา:
www.fisheries.go.th/mf-cmdec/papers/ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปลาทุ.pdf
- ไพเราะ ศุทธากรณ์. 2531. การศึกษาชีวประวัติ ของปลาทุ-ลัง (*Rastrelliger* sp.) ทางฝั่งตะวันตก
 ของประเทศไทย, หน้า 205-225. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2531 กรม
 ประมง. วันที่ 21-23 กันยายน 2531 ณ สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ บางเขน. กรม
 ประมง, กรุงเทพฯ.
- _____. 2541. ลักษณะทางชีววิทยาของปลาทุ (*Rastrelliger brachysoma* Bleeker,
 1985) ทางฝั่งทะเลอันดามันของประเทศไทย. เอกสารทางวิชาการฉบับที่ 44/2541 ศูนย์
 พัฒนาประมง ทะเลฝั่งอันดามัน, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 111 หน้า.

- รัตนา ผลัญญา. 2524. การศึกษาอนุประชากรของปลาทุในอ่าวไทยฝั่งตะวันตกและฝั่งตะวันออกจาก Transferrin polymorphism. รายงานวิชาการฉบับที่ 26, งานปลาผิวน้ำ, กองประมงทะเล, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- รัตนา ผลัญญา. 2525. การศึกษา Isozymes ในกล้ามเนื้อปลาสกุลทุ-ลั้ง ในน่านน้ำไทย. รายงานวิชาการ ฉบับที่ 28, งานปลาผิวน้ำ, กองประมงทะเล, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- _____. 2528. การศึกษาอนุประชากรปลาทุบริเวณอ่าวไทยตอนใน จาก LDH Isozyme. ใน รายงานสัมมนาวิชาการประมง ประจำปี 2528 กรมประมง. วันที่ 16-18 กันยายน 2528 ณ สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ บางเขน. กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- รัตนา มั่นประสิทธิ์. 2544. ความสมบูรณ์เพศในรอบปีของปลาทุ *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) และปลาลัง *R. kanagurta* (Cuvier, 1817) บริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออก. เอกสารทางวิชาการฉบับที่ 9/2544 ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 22 หน้า.
- วันศุกร์ เสนานาญ. 2551. กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมระดับประชากร. หน้า 12-13, ใน อุทัยรัตน์ ณ นคร และวงศ์ปฐม กมลรัตน์ (บรรณาธิการ). พันธุศาสตร์ประชากรเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพมหานคร.
- วีระ บุญรักษ์. 2531. สภาวะของทรัพยากรปลาทุและปลาโอทางฝั่งทะเลอันดามัน. ใน รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2531 กรมประมง. วันที่ 21-23 กันยายน 2531 ณ สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ บางเขน. กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- _____. 2537. สภาวะของทรัพยากรปลาทุทางฝั่งทะเลอันดามันตอนล่าง. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2537 กรมประมง. วันที่ 19-21 กันยายน 2537 ณ ห้องประชุมอานนท์ และสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

วีระ บุญรักษ์ และจำนอง ชนะสิทธิ์. 2539. สภาวะทรัพยากรและการประมงปลาทุ ทางฝั่งทะเลอันดามัน. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2539 กรมประมง. วันที่ 18-20 กันยายน 2539 ณ ห้องประชุมอานนท์ และสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

สมชัย จันทรสว่าง และพีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2546. พันธุศาสตร์ประชากร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักบริหารจัดการด้านการประมง. 2546. รวมกฎหมายเกี่ยวกับการประมง. สำนักบริหารจัดการด้านการประมง, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 106 หน้า.

อรุพันธ์ บุญประกอบ. 2509. การสำรวจแหล่งวางไข่ปลาทุ, หน้า 327-329. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 5 สาขาพืชและชีววิทยา สาขาสัตว์ และสาขาเศรษฐศาสตร์เกษตร. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน 2-4 กุมภาพันธ์ 2509. 754 หน้า. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2543. พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2551. การจัดการพันธุกรรมพ่อแม่พันธุ์. หน้า 94-111. ใน อุทัยรัตน์ ณ นคร และวงศ์ปฐม กมลรัตน์ (บรรณาธิการ). พันธุศาสตร์ประชากรเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพมหานคร.

Allendorf, F.W. and G. Luikart. 2007. **Conservation and the Genetics of Populations**. Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts, USA.

Antoro, S., U. Na-Nakorn and W. Koedprang. 2006. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers. **Mar Biotechnol** 8: 17-26.

- Bachtrog, D., M. Agis, M. Imhof and C. Schlötterer. 2000. Microsatellite Variability Differs between Dinucleotide Repeat Motifs—Evidence from *Drosophila Melanogaster*. **Mol Bio Evol** 17 (9): 1277-1285.
- Bagley, M.J., D.G. Linquist and J.B. Geller. 1999. Microsatellite variation, effective population size, and population genetic structure of vermilion snapper, *Rhomboplites aurorubens*, off the southeastern USA. **Mar Bio** 134: 609-620.
- Baibai, T., L. Oukhattar, J.V. Quinteiro, A. Mesfioui, M. Rey-mendez and A. Soukri. 2012. First Global Approach: Morphological and Biological Variability in a Genetically Homogeneous Population of the European Pilchard, *Sardina Pilchardus* (Walbaum, 1792) in the North Atlantic Coast. **Rev Fish Biol Fisher** 22 (1): 63-80.
- Blair, D., M. Waycott, L. Byrne, G. Dunshea, C. Smith-Keune and K.M. Neil. 2006. Molecular discrimination of *Perna* (Mollusca: Bivalvia) species using the polymerase chain reaction and species-specific mitochondrial primers. **Mar Biotechnol** 8: 380-385.
- BOBP. 1987. Investigations on the Mackerel and Scad Resources of the Malacca straits, BOBP/REP/39. 149 pp.
- Carlsson J., J.R. McDowell, P. Diaz-Jaimes, J.E.L. Carlsson, S.B. Boles, R. Gold and J.E. Graves. 2004. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) population structure in the Mediterranean Sea. **Mol Ecol** 13: 3345-3356.
- Carpenter, K.E. and V.H. Niem (eds). 2001. FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific. Volume 6. Bony fishes part 4 (Labridae to Latimeriidae), estuarine crocodiles, sea turtles, sea snakes and marine mammals. Rome, FAO. pp. 3381-4218.

- Carr, S.M., A.J. Snellen, K.A. Howse and J.S. Wroblewski. 1995. Mitochondrial DNA sequence variation and genetic stock structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) from bay and offshore locations on the Newfoundland continental shelf. **Mol Ecol** 4: 79-88.
- Catanese, G., M. Manchado and C. Infante. 2010. Evolutionary Relatedness of Mackerels of the Genus *Scomber* Based on Complete Mitochondrial Genomes: Strong Support to the Recognition of Atlantic *Scomber Colias* and Pacific *Scomber Japonicus* as Distinct Species **Gene** 452 (1): 35-43.
- Chapman, R.W., A.O. Ball and L.R. Mash. 2002. Spatial homogeneity and temporal heterogeneity of red drum (*Sciaenops ocellatus*) microsatellites: effective population sizes and management implications. **Mar Biotechnol** 4: 589-603.
- Charoentawee, K., S. Poompuang and U. Na-Nakorn. 2006. Isolation and Characterization of Microsatellites in Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium Rosenbergii*. **Mol Ecol Notes** 6 (3): 823-825.
- Chen, Y., Q. Cheng, H. Qiao, Y. Zhu and W. Chen. 2013. The Complete Mitochondrial Genome Sequence of *Rastrelliger Kanagurta* (Perciformes: Scombridae). **Mitochondr DNA** 24 (2): 114-116.
- Coulibaly, I., K. Gharbi, R.G. Danzmann, J. Yao and C.E. Rexroad. 2005. Characterization and comparison of microsatellites derived from repeat-enriched libraries and expressed sequence tags. **Anim Genet** 36: 309-315.
- de Bruyn, M., J.A. Wilson and P.B. Mather. 2004. Huxley's Line Demarcates Extensive Genetic Divergence between Eastern and Western Forms of the Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium Rosenbergii*. **Mol Phylogenet Evol** 30 (1): 251-257.

Donrung, P., S. Tunkijjanukij, P. Jarayabhand and S. Poompuang. 2011. Spatial Genetic Structure of the Surf Clam *Paphia Undulata* in Thailand Waters. **Zool Stud** 50 (2): 9.

Excoffier, L., L. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin Ver. 3.0: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. **Evol Bioinform Online** 1: 47 - 50.

Falconer, D.S., and T. Mackay. 1996. **Introduction to Quantitative Genetics**. Longman. 464 p.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** 39 (4): 783-791.

Frankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe. 2002. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge, Cambridge University Press.

Garber, A.F., M.D. Tringali and K.C. Stuck. 2004. Population structure and variation in red snapper (*Lutjanus campechanus*) from the Gulf of Mexico and Atlantic Coast of Florida as determined from mtDNA control region sequence. **Mar Biotechnol** 6: 175-185.

Ghazali, A.F., D.H.Z. Abidin, S.A.M. Nor and D.M. Naim. 2012. Genetic Variation of Indian Mackerel (*Rastrelliger Kanagurta*) (Cuvier, 1816) of Sabah Waters Based on Mitochondrial D-Loop Region: A Preliminary Study. **Asian Journal Of Biology and Biotechnology** 1 (1): 1-10.

Goudet J. 1995. FSTAT Version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. **J Heredity** 86: 485-486. FSTAT 2.9.3.2 [Software] available from: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>

- Hedrick, P.W. 2005. **Genetics of populations**. Jones and Bartlett Publishers, USA. 737p.
- Jayasankar, P., P.C. Thomas, M.P. Paulton and J. Mathew. 2004. Morphometric and Genetic Analyzes of Indian Mackerel (*Rastrelliger Kanagurta*) from Peninsular India. **Asian Fisheries Science** 17: 201-216.
- Jin, L., C. Macaubas, J. Hallmayer, A. Kimura and E. Mignot. 1996. Mutation Rate Varies among Alleles at a Microsatellite Locus: Phylogenetic Evidence. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93 (26): 15285-15288.
- Jondeung, A. and W. Karinthanyakit. 2010. The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Short Mackerel (*Rastrelliger Brachysoma*), and Its Phylogenetic Position within Scombroidei, Perciformes. **Mitochondr. DNA.** 21 (2): 36-47.
- Kalinowski, S. 2004. Counting Alleles with Rarefaction: Private Alleles and Hierarchical Sampling Designs. **Conserv. Genet.** 5 (4): 539-543.
- Li, Y., K. Wongprasert, M. Shekhar, J. Ryan, L. Dierens, J. Meadows, N. Preston, G. Coman and R.E. Lyons. 2007. Development of Two Microsatellite Multiplex Systems for Black Tiger Shrimp *Penaeus Monodon* and Its Application in Genetic Diversity Study for Two Populations. **Aquaculture** 266 (1-4): 279-288.
- Liu, ZJ and J.F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture** 238: 1-37.
- Manchado, M., G. Catanese and C. Infante. 2004. Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Atlantic Bluefin Tuna *Thunnus Thynnus*. **Fisheries. Sci.** 70 (1): 68-73.

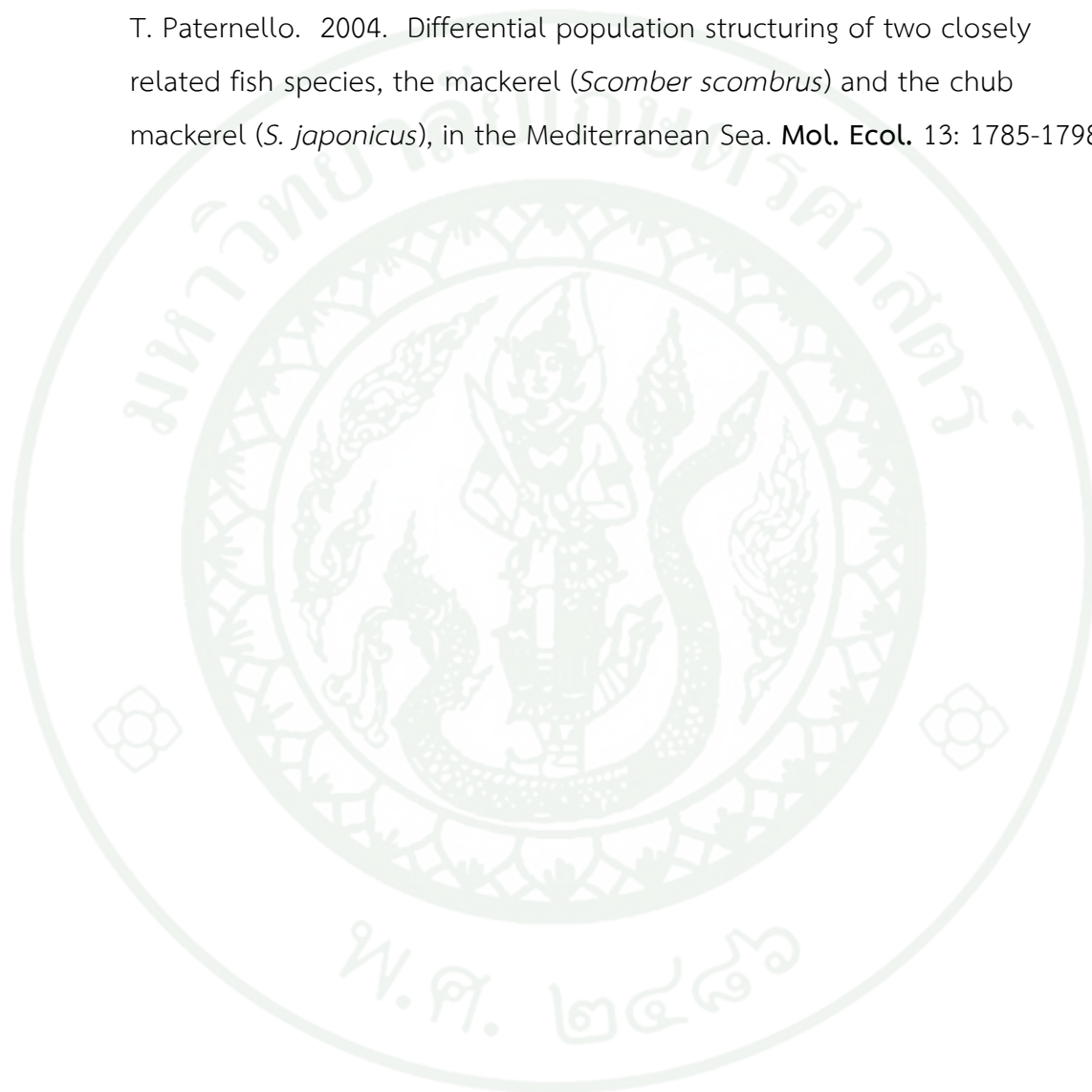
- Marshall, T.C., J. Slate, L.E.B Kruuk and J.M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Mol. Ecol.** 7: 639–655.
- Morgan, J.A.T., M. Macbeth, D. Broderick, P. Whatmore, R. Street, D.J. Welch and J.R. Ovenden. 2013. Hybridisation, Paternal Leakage and Mitochondrial DNA Linearization in Three Anomalous Fish (Scombridae). **Mitochondrion** 13 (6): 852-861.
- Na-Nakorn, U., K. Sriphairoj, S. Sukmanomon, S. Poompuang and W. Kamonrat. 2006. Polymorphic Microsatellite Primers Developed from DNA of the Endangered Mekong Giant Catfish, *Pangasianodon gigas* (Chevey) and Cross-Species Amplification in Three Species of Pangasius. **Mol. Ecol. Notes.** 6 (4): 1174-1176.
- Nunome, T., S. Negoro, K. Miyatake, H. Yamaguchi And H. Fukuoka. (2006). A protocol for the construction of microsatellite enriched genomic library. **Plant. Mol. Biol. Rep.** 24 (3): 305-312.
- O'Reilly, P.T., M.F. Canino, M. Bailey and P. Bentzen. 2004. Inverse relationship between F_{ST} and microsatellite polymorphism in the marine fish, walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*): implications for resolving weak population structure. **Mol. Ecol.** 13, 1799-1814.
- Phinchongsakuldit, J., P. Chaipakdee, J. Collins, M. Jaroensutasinee and J.Y. Brookfield. 2013. Population Genetics of Cobia (*Rachycentron Canadum*) in the Gulf of Thailand and Andaman Sea: Fisheries Management Implications. **Aquacult. Int.** 21 (1): 197-217.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. Genepop (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. **J. Hered.** 86 (3): 248-249.

- Renshaw, M, K.C. Douglas, C.E. Rexroad III, A.M.C. Jobity and J.R. Gold. 2009. Isolation and characterization of microsatellite markers in the Serra Spanish mackerel, *Scomberomorus brasiliensis*. **Mol. Ecol. Resour.** 9 (3): 835-838.
- Ruzzante, D.E., J.S. Wroblewski, C.T. Taggart, R.K. Smedbol, D. Cook and S.V. Goddaard. (2000). Bay-scale population structure in coastal Atlantic cod in Labrador and Newfoundland, Canada. **J. Fish. Biol.** 56 (2): 431-447.
- Schlötterer, C. and B. Harr. 2001. Microsatellite Instability. **Encyclopedia of Life Science.** John Wiley & Sons, Ltd.
- Somjaiwong, D. and S. Chullasorn. 1974. Tagging experiment on the Indo-Pacific mackerel, *Rastrelliger neglectus* (Van Kampen) in the Gulf of Thailand (1960-1965). **Indo-Pacific Fisheries Council. Proceedings.** 15 (3): 287-296.
- Srinulgray, T. 2008. Genetic Diversity of Short Mackerel *Rastrelliger Brachysoma* Populations in the Gulf of Thailand and Andaman Sea. M.S. Thesis, Chulalongkorn University.
- Sukkorntong, C., D. Panprommin and S. Poompuang. 2008. Sixteen EST-linked microsatellite markers in Günther's walking catfish *Clarias macrocephalus*. **Mol. Ecol. Resour.** 8: 1300-1302.
- Supmee, V., L. Ngernsiri, A. Sriboonlert, P. Wonnapijit and P. Sangthong. 2012. Population Genetics of the Violet Vinegar Crab (*Episesarma Versicolor*) Along the Andaman Sea Coast of Thailand. **Zool. Stud.** 51 (7): 11.
- Strauss, R.E. and F.L. Bookstein. 1982. The Truss: Body Form Reconstructions in Morphometrics. **Syst. Zool.** 31 (2): 113-135.

- Taggart, J.B., R.A. Hynes, P.A. Prodohl and A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. **J. Fish. Biol.** 40: 963-965.
- Tang, C.Y, C.H. Tzeng, C.S. Chen and T.S. Chiu. 2009. Microsatellite DNA markers for population-genetic studies of blue mackerel (*Scomber australasicus*) and cross-specific amplification of *S. japonicus*. **Mol. Ecol. Resour.** 9(3): 824-827.
- Tang, S., A. Tassanakajon, S. Klinbunga, P. Jarayabhand and P. Menasveta. 2004. Population Structure of Tropical Abalone (*Haliotis Asinina*) in Coastal Waters of Thailand Determined Using Microsatellite Markers. **Mar Biotechnol** 6 (6): 604-611.
- Waple, R.S. and C. Do. 2010. Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. **Evolutionary Applications** 3: 244-262.
- Weir, B. S. and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** 38: 1358-1370.
- Wierdl, M., M. Dominska and T.D. Petes. 1997. Microsatellite Instability in Yeast: Dependence on the Length of the Microsatellite. **Genetics** 146 (3): 769-779.
- Wongruenpibool, S. and J. Denduangboripant. 2013. Genetic Diversity of Purple-Legged Shovel-Nosed Lobster *Thenus Unimaculatus* Inthailand. **Thai. J. Genet.** 6 (1): 65-71.
- Yagashita N. and Kobayashi T. 2008. Isolation and characterization of nine microsatellite loci from the chub mackerel, *Scomber japonicus* (Perciformes, Scombridae). **Mol. Ecol. Resour.** 8: 302-304.

Yeh, F.C., R.-c. Yang and T. Boyle. 1999. **Popgene Version 1.3.1: Microsoft Window-Based Freeware for Population Genetic Analysis, Quick User Guide.** University of Alberta and Centre for International Forestry Research.

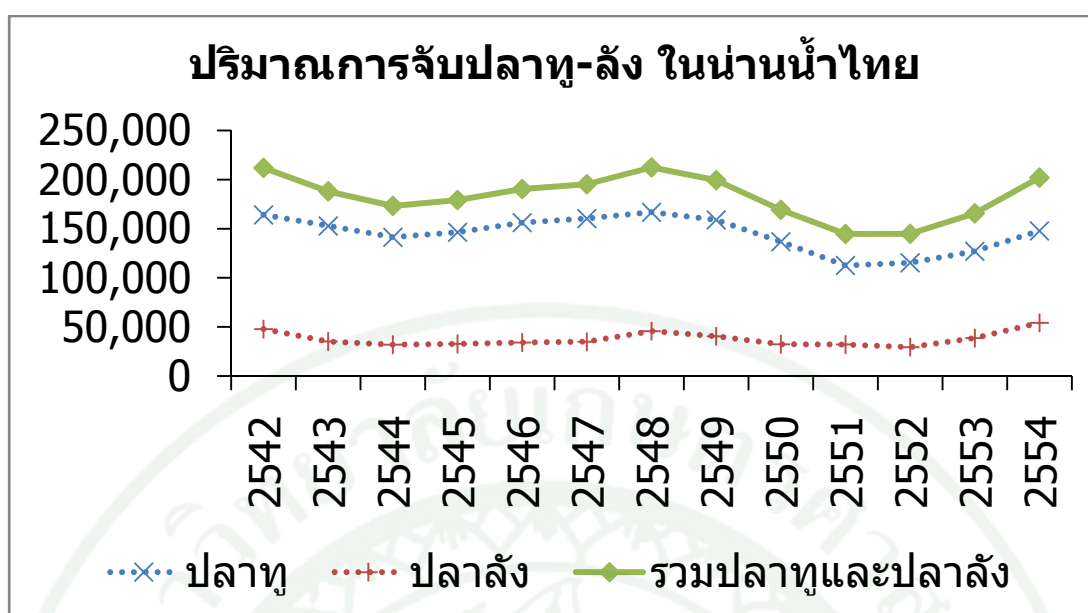
Zardoya, R., R. Castilho, C. Grande, L. Favre-Krey, S. Caetano, S. Marcato, G. Krey and T. Paternello. 2004. Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*S. japonicus*), in the Mediterranean Sea. **Mol. Ecol.** 13: 1785-1798.





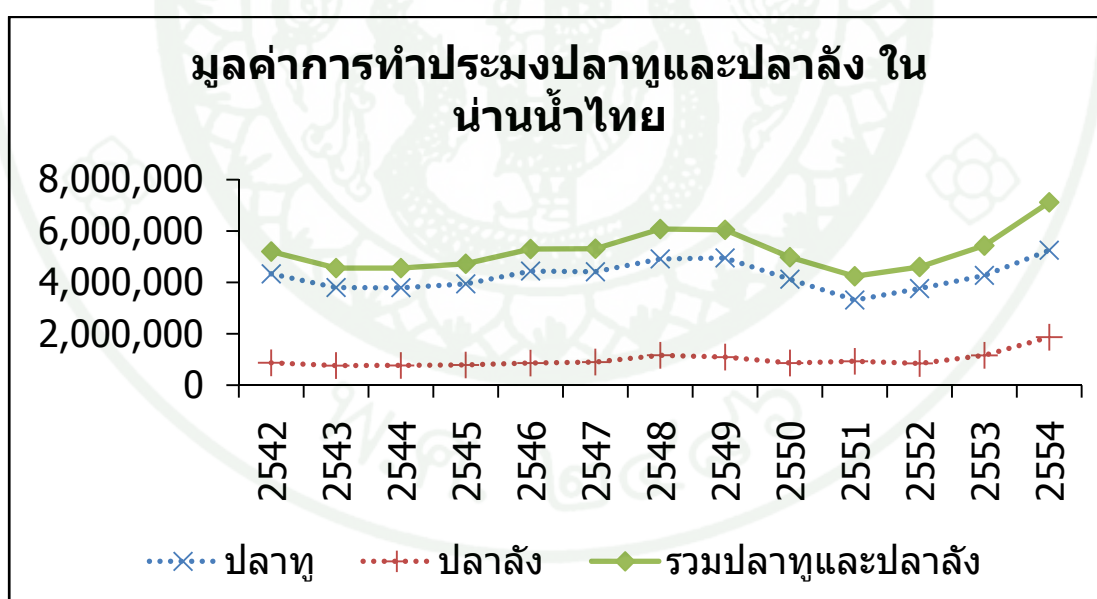


ภาคผนวก ก
รูปภาพและตารางข้อมูล



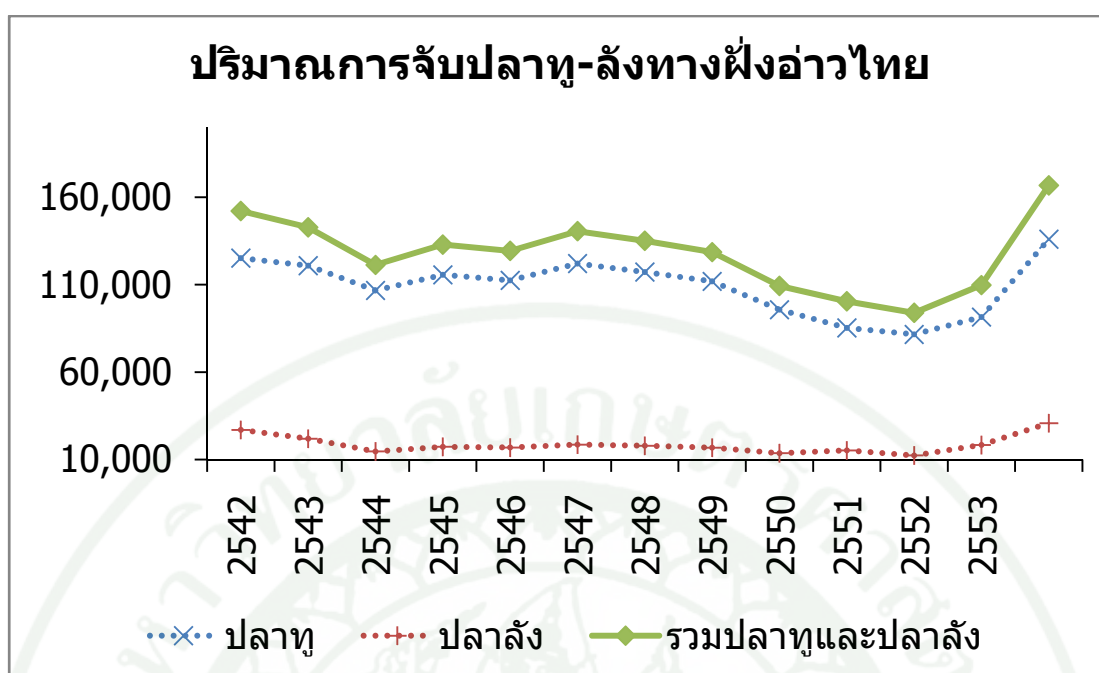
ภาพผนวกที่ 1 สถิติปริมาณการจับปลาและปลา-ล้งในน่านน้ำไทยปี พ.ศ. 2542 ถึงปี พ.ศ. 2554

ที่มา: กรมประมง (2556)



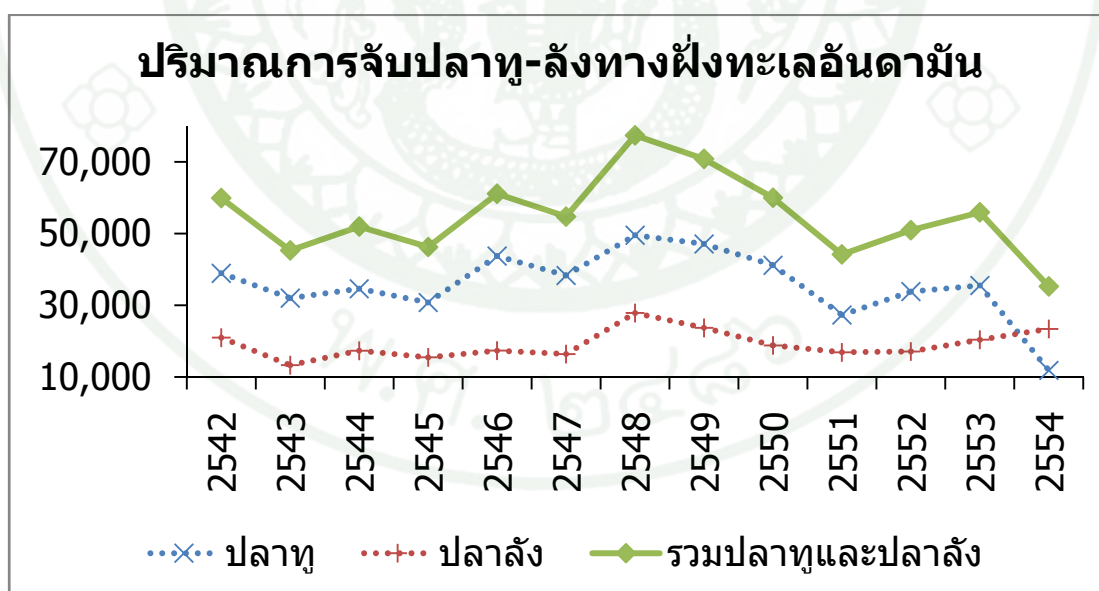
ภาพผนวกที่ 2 สถิติมูลค่าการทำประมงปลาและปลา-ล้งในน่านน้ำไทยปี พ.ศ. 2542 ถึงปี พ.ศ. 2554

ที่มา: กรมประมง (2556)



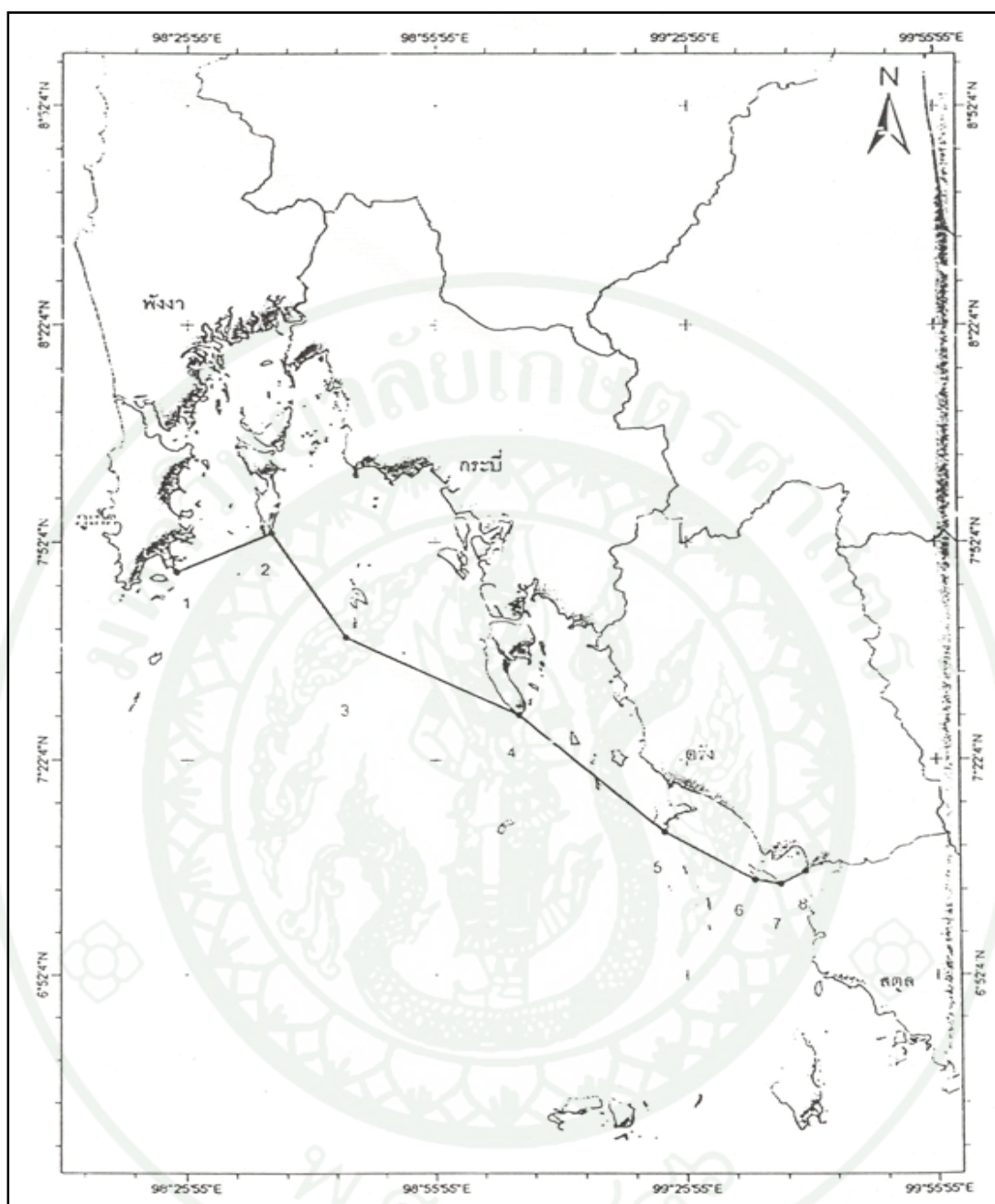
ภาพผนวกที่ 3 สถิติการจับปลาและปลาสดฝั่งอ่าวไทยปี พ.ศ. 2542 ถึงปี พ.ศ. 2554

ที่มา: กรมประมง (2556)



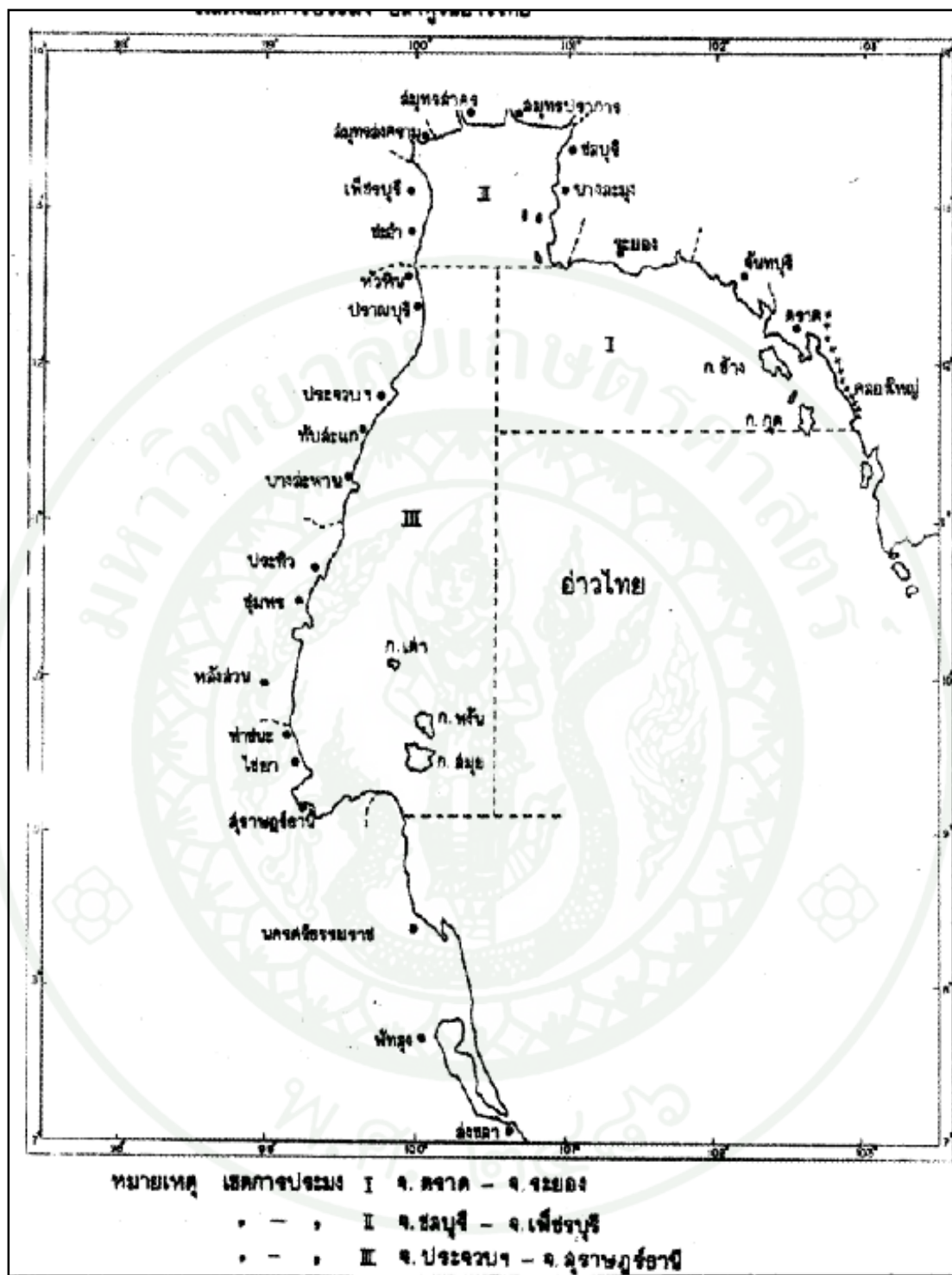
ภาพผนวกที่ 4 สถิติการจับปลาและปลาสดฝั่งทะเลอันดามันปี พ.ศ. 2542 ถึงปี พ.ศ. 2554

ที่มา: กรมประมง (2556)



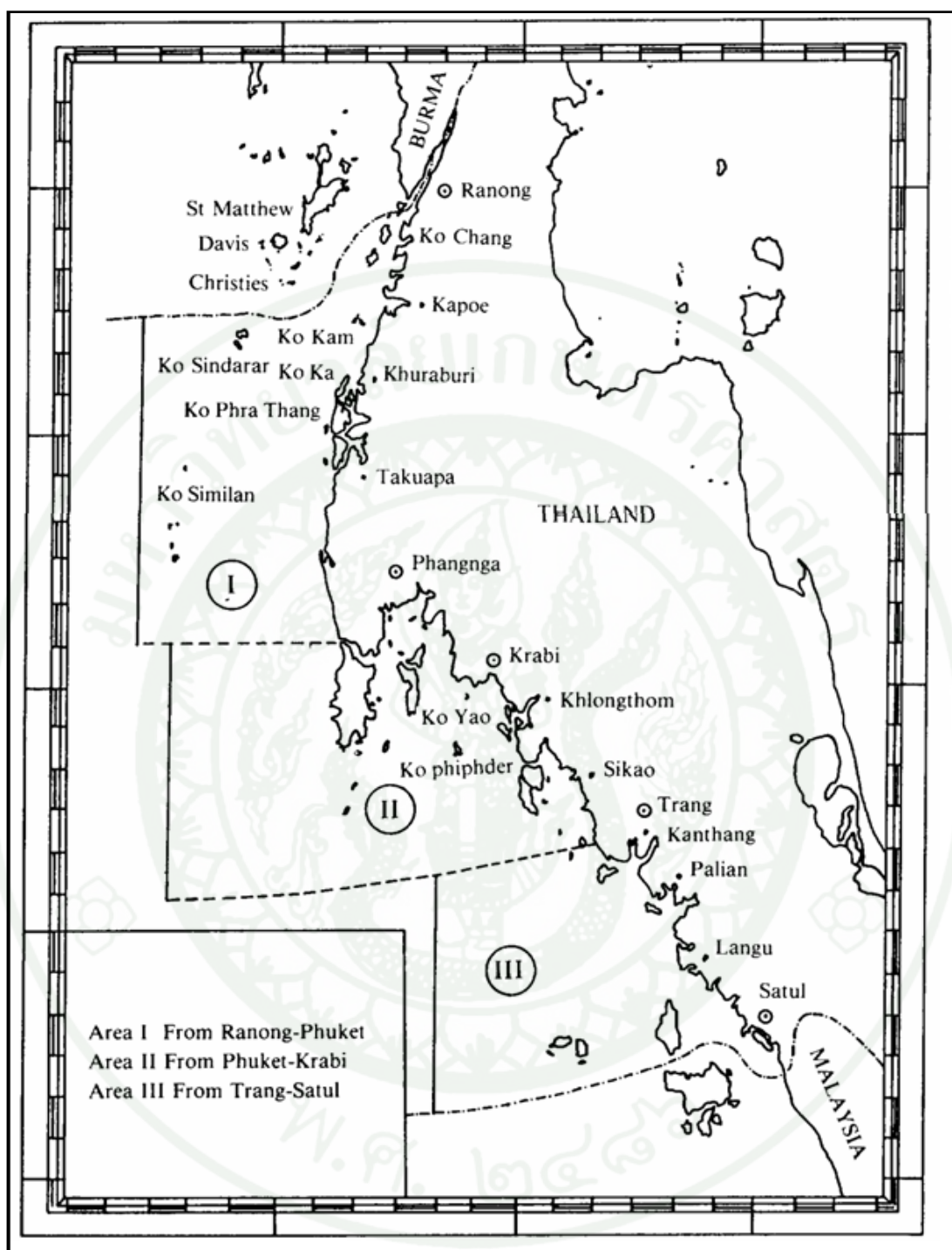
ภาพผนวกที่ 5 แผนที่แสดงพื้นที่มาตรการอนุรักษ์ ทางฝั่งทะเลอันดามัน

ที่มา: แผนที่แนบท้ายประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์การเกษตร เรื่อง “กำหนดห้ามใช้เครื่องมือทำการประมงบางชนิดทำการประมงในฤดูปลาที่มีไข่ วางไข่ และเลี้ยงตัวอ่อนในท้องที่บางส่วนของจังหวัดภูเก็ต พังงา กระบี่ และตรังภายในระยะเวลาที่กำหนด” ลงวันที่ 24 ตุลาคม พ.ศ. 2551



ภาพผนวกที่ 6 การแบ่งเขตพื้นที่ทำการประมง ทางฝั่งอ่าวไทย

ที่มา: ดำริห์ (2523)



ภาพผนวกที่ 7 การแบ่งเขตพื้นที่ทำการประมง ทางฝั่งทางฝั่งทะเลอันดามัน

ที่มา: ไพเราะ (2531)

ตารางผนวกที่ 1 ตารางเปรียบเทียบผลการศึกษาช่วงฤดูวางไข่ และขนาดความยาวแม่ปลาเมื่อเริ่มวางไข่ ของปลาหูในทะเลอันดามัน

พื้นที่ที่ศึกษา	ช่วงเวลาที่มีการวางไข่													ขนาดความยาวแม่ปลาเมื่อเริ่มวางไข่ (ซ.ม.)	
	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ไพเราะ(2531)	ไพเราะ (2541)
ทะเลอันดามัน														-	-
เขตการประมงที่ 1														19.0	19.33
เขตการประมงที่ 2														17.8	16.95
เขตการประมงที่ 3														17.9	16.79

หมายเหตุ  แทนผลการศึกษาของ ทศพล (2550)
 แทนผลการศึกษาของ ไพเราะ (2531)
 แทนผลการศึกษาของ ไพเราะ (2541)

ตารางผนวกที่ 2 ข้อมูลแหล่งเก็บตัวอย่างปลาทุและปลาลังฝั่งทะเลอันดามัน

	รหัส	ชื่อเรือ	ท่าเรือ	อำเภอ จังหวัด	วันที่	เครื่องมือประมง	พิกัดทำประมง		ชนิดปลา	หมายเหตุ
							lat	long		
1	ทุระนอง	ลำซุกริน	ป.ปลาทุ	อ.เมือง จ.ระนอง	20/8/53	อวนลอยปลาทุ	9.840	98.480	<i>R. brachysoma</i>	เกาะช้าง
2	ทุตรัง	บุญลาก 21	บุญลาก	อ.กันตัง จ.ตรัง	3/8/53	อวนล้อมจับปั่นไฟ	7.067	99.283	<i>R. brachysoma</i>	หลังเกาะสอง
3	ลั้งระนอง	โอเล่	ไทยเสรี	อ.เมือง จ.ระนอง	18/8/53	อวนลอยปลาทุ	9.980	98.520	<i>R. kanagurta</i>	พม่า
4	ลั้งพังงา	ธนากร 1	ดวงทวีพร	อ.ท้ายเหมือง จ.พังงา	19/8/53	อวนล้อมจับปั่นไฟ	8.617	97.800	<i>R. kanagurta</i>	เกาะแก้ว
5	ลั้งภูเก็ต	ธีรฤกษ์ 41	อ.ส.ป.	อ.เมือง จ.ภูเก็ต	9/8/53	อวนล้อมจับปั่นไฟ	7.750	98.467	<i>R. kanagurta</i>	เกาะไม้ท่อน
6	ลั้งสตูล	PSF 1267	อ.ส.ป.	อ.เมือง จ.สตูล	19/8/53	อวนล้อมซั้ง	5.967	98.783	<i>R. kanagurta</i>	-



Microsatellite Markers Suggested Moderate Genetic Variation in Indian Mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) Populations from the Andaman Sea, Thailand

Nut Munpholsri^{1,2}, Supawadee Poompuang^{3,*}, Wansuk Senanan⁴
and Wongpathom Kamonrat⁵

ABSTRACT

The Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) fishery in Thailand has experienced declining catches during the past several years and was identified as over-exploited. The study obtained population genetic information to support the ongoing management of the fishery. Six microsatellite loci from short mackerel (*Rastrelliger brachysoma*) were screened to assess the genetic diversity in Indian mackerel stocks from four localities on the Andaman Sea coast. All population samples exhibited similar and moderate genetic variation with an average of 6.5 to 7.8 alleles per locus and average expected heterozygosity at all loci of 0.60 to 0.69. There was no evidence to support population substructure (overall genetic differentiation = F_{ST} = 0.012; non-significant pairwise F_{ST} values). Gene flow was detected through the presence of rare alleles at three loci across samples. The contemporary estimated effective population size was approximately 330 if a single stock unit was considered. This moderate size of the breeding population is crucial for the short-term conservation of genetic variability in Indian mackerel stocks. Genetic data from the present study provides baseline genetic information and supports the management of Indian mackerel as a single unit.

Keywords: microsatellite, genetic diversity, gene flow, effective population size, population structure

INTRODUCTION

Short mackerel (*Rastrelliger brachysoma* Bleeker, 1851) and Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta* Cuvier, 1817) are pelagic species of the family Scombridae, widely distributed in the tropical waters of the West Pacific and Indian Oceans (Collette and Nauen 1983). These two closely related species can be found in both the

Gulf of Thailand and the Andaman Sea. They are important food and export items for Thailand and the Southeast Asian region. Indian mackerel is the major target species for both commercial and small-scale fisheries along the Andaman Sea coast (Krajangdara *et al.*, 2007). The average annual catch of Indian mackerel was 20,000 t during 1997–2007, but decreased to 17,000 t in 2009 (Department of Fisheries, 2010). Recently, stock

¹ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

² Center of Excellence in Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand.

³ Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

⁴ Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand.

⁵ Inland Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok 10900, Thailand.

* Corresponding author, e-mail: supawadee.p@ku.ac.th

Received date : 13/08/13

Accepted date : 28/10/13

assessment based on catch-per-unit-effort data identified the status of Indian mackerel in Thailand as fully exploited with a total catch of over 30% of the maximum sustainable yield (Sumontha *et al.*, 2010). Moreover, Indian mackerel caught from the Andaman Sea were 67% smaller than the average size at first maturity. As a result, it is likely that the size of spawning stock and recruitment will be drastically reduced in the near future (Sumontha *et al.*, 2010). Further, it is not known whether Indian mackerel populations along the Andaman Sea coasts of Myanmar, Thailand, Malaysia and Indonesia are composed of one or several stocks. However, the Thai Department of Fisheries has managed the stock in Thai waters as a single unit, with no area or sector-specific allocations. The management measures include spatial and temporal closures, the reduction of fishing capacity and licensing of fishing gear.

The genetic diversity of a population is an important issue in the fisheries management of exploited species. Genetic data can provide information about the stock structure and status of the population (Bagley *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 2002). Genetic diversity is necessary for a species to respond to short-term and long-term environmental changes. However, despite its commercial importance, there is no information about the genetic diversity of the Indian mackerel, and the population structure of this species is mostly unknown, in particular for the Andaman Sea.

Marine species are generally believed to possess high levels of genetic diversity within populations, but to display low between-population differentiation. This is due to their large population sizes, high fecundity and extensive gene flow (Waples, 1998). However, this perception has been challenged, as an increasing number of studies have compiled evidence of the genetic structure in marine fish species over both small and large geographical scales. Therefore, the ability to detect a weak population structure is critical for fishery management plans (Zardoya *et al.*, 2004).

In the past, allozyme electrophoresis has been the standard tool in genetic studies of fish populations. However, most studies that employed allozyme markers have reported low levels of genetic variation (Menezes *et al.*, 1993). The use of DNA markers has revolutionized how the structure of populations of marine species is viewed (Waples, 1998). Although other types of genetic markers such as ISSRs (inter-simple sequence repeats) have been developed for short mackerel (Srinuangray and Piyapattanakorn, 2009), these dominant markers are not applicable for estimating the effective population size or migration between populations. Conversely, microsatellites have proven to be useful genetic markers in measuring the genetic diversity and evaluating the dynamics of populations (Bagley *et al.*, 1999; Broughton *et al.*, 2002; Chiang *et al.*, 2006, 2008).

The objectives of this study were to assess the genetic diversity and population structure among four population samples of Indian mackerel. Because microsatellite markers have not been developed for Indian mackerel, microsatellite loci from short mackerel were used in this study. Cross-species amplification of microsatellites was determined in Indian mackerel. The use of short mackerel microsatellites for population genetic analysis, was validated by testing for heterozygosity, Hardy-Weinberg expectations and linkage disequilibrium in a sample of 30 individuals of Indian mackerel from the Gulf of Thailand. The null hypothesis was tested that Indian mackerel comprised a single homogeneous population along the Andaman Sea coast of Thailand. This is the first report on genetic investigations of Indian mackerel from the region.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

A sample of 30 individuals of Indian mackerel from the Gulf of Thailand was used for the cross-species amplification and validation of short mackerel microsatellites. During 2009 and

assessment based on catch-per-unit-effort data identified the status of Indian mackerel in Thailand as fully exploited with a total catch of over 30% of the maximum sustainable yield (Sumontha *et al.*, 2010). Moreover, Indian mackerel caught from the Andaman Sea were 67% smaller than the average size at first maturity. As a result, it is likely that the size of spawning stock and recruitment will be drastically reduced in the near future (Sumontha *et al.*, 2010). Further, it is not known whether Indian mackerel populations along the Andaman Sea coasts of Myanmar, Thailand, Malaysia and Indonesia are composed of one or several stocks. However, the Thai Department of Fisheries has managed the stock in Thai waters as a single unit, with no area or sector-specific allocations. The management measures include spatial and temporal closures, the reduction of fishing capacity and licensing of fishing gear.

The genetic diversity of a population is an important issue in the fisheries management of exploited species. Genetic data can provide information about the stock structure and status of the population (Bagley *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 2002). Genetic diversity is necessary for a species to respond to short-term and long-term environmental changes. However, despite its commercial importance, there is no information about the genetic diversity of the Indian mackerel, and the population structure of this species is mostly unknown, in particular for the Andaman Sea.

Marine species are generally believed to possess high levels of genetic diversity within populations, but to display low between-population differentiation. This is due to their large population sizes, high fecundity and extensive gene flow (Waples, 1998). However, this perception has been challenged, as an increasing number of studies have compiled evidence of the genetic structure in marine fish species over both small and large geographical scales. Therefore, the ability to detect a weak population structure is critical for fishery management plans (Zardoya *et al.*, 2004).

In the past, allozyme electrophoresis has been the standard tool in genetic studies of fish populations. However, most studies that employed allozyme markers have reported low levels of genetic variation (Menezes *et al.*, 1993). The use of DNA markers has revolutionized how the structure of populations of marine species is viewed (Waples, 1998). Although other types of genetic markers such as ISSRs (inter-simple sequence repeats) have been developed for short mackerel (Srinuangray and Piyapattanakorn, 2009), these dominant markers are not applicable for estimating the effective population size or migration between populations. Conversely, microsatellites have proven to be useful genetic markers in measuring the genetic diversity and evaluating the dynamics of populations (Bagley *et al.*, 1999; Broughton *et al.*, 2002; Chiang *et al.*, 2006, 2008).

The objectives of this study were to assess the genetic diversity and population structure among four population samples of Indian mackerel. Because microsatellite markers have not been developed for Indian mackerel, microsatellite loci from short mackerel were used in this study. Cross-species amplification of microsatellites was determined in Indian mackerel. The use of short mackerel microsatellites for population genetic analysis, was validated by testing for heterozygosity, Hardy-Weinberg expectations and linkage disequilibrium in a sample of 30 individuals of Indian mackerel from the Gulf of Thailand. The null hypothesis was tested that Indian mackerel comprised a single homogeneous population along the Andaman Sea coast of Thailand. This is the first report on genetic investigations of Indian mackerel from the region.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

A sample of 30 individuals of Indian mackerel from the Gulf of Thailand was used for the cross-species amplification and validation of short mackerel microsatellites. During 2009 and

2010, 176 individual Indian mackerel samples were collected from purse seine nets from four fishing sites along the Andaman Sea coast: Ranong (RN), Phang Nga (PN), Phuket (PK) and Satul (ST) (Figure 1). To maximize the chance of detecting any genetic differentiation among four locations (if present), similarly-sized samples from these locations were collected at approximately the same time. Fin-clips were placed in 95% ethanol until DNA extraction. The DNA samples were used for assessment of genetic variation.

Microsatellite genotyping

Six microsatellite loci (*Rbr-7*, *Rba-8*, *Rbr-9*, *Rbr-12*, *Rbr-13*, and *Rbr-14*) isolated from short mackerel were tested for cross amplification and validation in Indian mackerel. DNA extraction was carried out from the fin clips of the Indian mackerel samples using a standard phenol-chloroform extraction procedure (Taggart *et al.*, 1992). The polymerase chain reaction (PCR) was performed in a 10 μ L reaction volume which contained 20 ng of genomic DNA, 5 $\times$ PCR buffer (10 $\times$ *Taq* buffer with (NH₄)₂SO₄), 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M of dNTPs, 0.5 μ M of each primer and 0.1 U of *Taq* DNA polymerase (Fermentas; Vilnius, Lithuania). The PCR profile was: initial denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 5 min; 35

cycles at 95 $^{\circ}$ C for 30 s, 60 $^{\circ}$ C for 45 s and 72 $^{\circ}$ C for 1 min; followed by 1 cycle at 72 $^{\circ}$ C for 7 min in a PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research; Waltham, Massachusetts, USA). The annealing temperature was set at 60 $^{\circ}$ C for all six loci. Following amplification, the reaction products were mixed with sequencing dye (0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol, 2% of 0.5 M EDTA pH 8.0 and 98% formamide). The reaction mixtures were heated for 5 min at 95 $^{\circ}$ C and subjected to electrophoresis on a 4.5% denaturing polyacrylamide gel in 1 $\times$ TBE running buffer at 60 W for 2–3 h in a sequencing gel apparatus (Bio-Rad; Hercules, California, USA). The gels were denatured at 100 $^{\circ}$ C for 30 min before electrophoresis. The DNA bands in the gels were visualized by silver staining. Allele sizes were estimated by comparison to an M13 sequence ladder.

Data analysis

To validate the use of short mackerel microsatellite loci, estimates of genetic variation, including observed/expected heterozygosities and genotypic disequilibrium were calculated based on the allele frequencies of 30 individuals of Indian mackerel using the computer program GENEPOP version 4.0 (Rousset, 2008).

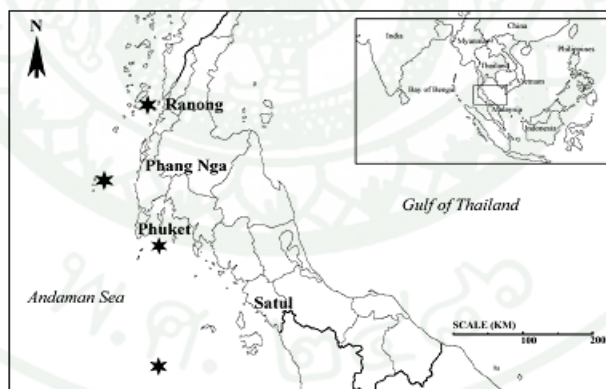


Figure 1 Sample collection locations (★) for Indian mackerel along the Andaman Sea coast.

The program MICRO-CHECKER version 2.2.0 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) was used to test for the presence of null alleles in four population samples of Indian mackerel. Genetic variation within a population including the mean number of alleles per locus (A), allelic richness (A_r) which is allele diversity independent of sample size, and observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities were calculated using GENEPOP version 4.0. Hardy-Weinberg expectations were tested by the exact P values and calculated by a Markov chain randomization method (Guo and Thompson, 1992) using ARLEQUIN version 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005), which was also used to calculate the pair-wise F_{ST} (genetic differentiation) values and P -values between all pairs of samples. The number of migrants between population pairs was estimated using POPGENE V. 1.31 (Yeh *et al.*, 1997).

The single-sample effective population size based on the linkage disequilibrium method was estimated using NeEstimator version 1.3 (Ovenden *et al.*, 2007). The gene flow between pairs of populations based on the frequencies of private alleles was calculated using GENEPOP. The program STRUCTURE version 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) was used to assign individuals into K clusters, without any prior knowledge of the population membership. The likelihood values suggested by STRUCTURE for each K were relied on to determine whether the K value was likely to be more than one. If population structure exists, the likelihood values should show some marked changes between successive K values. Twenty independent runs for $K = 1$ to 6 were performed using 100,000 iterations after a burn-in period of 25,000 runs. The distribution of ΔK (an ad hoc statistic based on the rate of change in the log probability of data between successive K values) was examined and the K value most likely to explain the population structure is the modal value of this ΔK distribution (Evanno *et al.*, 2005).

RESULTS

All six microsatellite loci of short mackerel were cross amplified with Indian mackerel samples (Table 1). The number of alleles per locus ranged from three to 14. The observed heterozygosity ranged from 0.17 to 0.96 and the expected heterozygosity ranged from 0.16 to 0.91. All loci conformed to Hardy-Weinberg expectations. There was no significant linkage disequilibrium for all pairs of loci ($P > 0.003$ after Bonferroni correction).

A total of 176 Indian mackerel individuals were genotyped at six microsatellite loci (Table 2). All four population samples exhibited similar and moderate genetic variation with the average number of alleles per locus varying from 6.50 (ST) to 7.83 (PK) and average allele richness from 4.97 (RN) to 5.14 (ST). The average observed heterozygosities across loci ranged from 0.54 (PN and ST) to 0.56 (RN and PK) and the average expected heterozygosities ranged from 0.60 (PK) to 0.70 (ST). The average observed heterozygosities were lower than expected in all populations. However, neither allele richness nor the expected heterozygosities differed significantly ($P > 0.05$) across all populations. None of the samples showed indications of null alleles at any loci. Significant departures from Hardy-Weinberg expectations were observed at locus *Rbr-7* in the PN population, locus *Rbr-8* in the PK samples and locus *Rbr-14* in the RN population, using the criterion $P < 0.0083$ after Bonferroni correction for multiple comparisons. Significant ($P = 0.0083$) deviations at the three loci displayed heterozygote deficiencies.

The overall estimate of F_{ST} (0.012) indicated that genetic differentiation among stocks was very low, that is, only 1% of the detected variation arose from between-population differences and 99% was within population differentiation. All population pair-wise comparisons exhibited non-significant F_{ST}

Table 1 Cross-species amplification of short mackerel *Rastrelliger brachysoma* microsatellite loci in Indian mackerel *R. kanagurta* (N = 30). Annealing temperature was set at 60 °C for all six loci.

Locus	GenBank Accession No.	Primer sequences 5'-3'	Repeat motif	Size range (bp)	Number of alleles	H _O	H _E	P value
<i>Rbr-7</i>	JX488046	F: CCACCCACTACCTGGCATC R: ATGTGCTGGAGCCGCTAAC	[TC] ₁₄	154-160	4	0.60	0.60	0.84
<i>Rbr-8</i>	JX488047	F: GCAACGTTCAAGACACTCAC R: GAAAGCATCACAACTCCTATCAC	[GA] ₇	158-172	7	0.65	0.78	0.11
<i>Rbr-9</i>	JX488048	F: CACTCCCTGAATCTAGAAATG R: CAGCTGCTCCCAGAGATG	[TG] ₉	206-212	3	0.17	0.16	0.67
<i>Rbr-12</i>	JX488049	F: ACAAGCCGTTGGTGTGAC R: TGCTCCAGAGATGAGGTG	[TG] ₈	158-164	3	0.17	0.21	0.33
<i>Rbr-13</i>	JX488049	F: ACCTCATCTCTGGGAGCAG R: GTCTGTGAGTCGTCAGCATG	[CA] ₅ CCC[CA] ₁₀	172-220	14	0.96	0.91	0.69
<i>Rbr-14</i>	JX488054	F: ACGTAGAAGAGCACGCACAG R: TTTCAGCCTGGTCACTTGC	[CA] ₇	198-214	6	0.50	0.79	0.08

H_O = Observed heterozygosity; H_E = Expected heterozygosity.

P values for test of Hardy-Weinberg expectations were adjusted for multiple comparisons using the Bonferroni correction: $P < 0.0083$ (0.05/6)

values ($P > 0.05$, Table 3). Estimates of migrants per generation ranged from 4 between PK and ST and between PN and ST to 10 between PN and PK. The effective population size estimated over all four stocks was about 335 individuals (95% confidence intervals (CI): 165–3,233).

Clustering analysis in STRUCTURE revealed that all individuals were grouped together in one cluster (Figure 2). Log likelihood was highest at $K = 1$. In addition, the values of ΔK changed only slightly between successive K values.

Table 2 Genetic variability at six microsatellite loci in four populations of Indian mackerel, including sample size (N), total number of alleles (A), allelic richness (A_r), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), fixation index (F_{is}), and P value for test of Hardy-Weinberg expectations (HWE).

Population (N)	Locus						Average across loci
	<i>Rbr-7</i>	<i>Rbr-8</i>	<i>Rbr-9</i>	<i>Rbr-12</i>	<i>Rbr-13</i>	<i>Rbr-14</i>	
RN (48)							
A	5	7	5	4	16	8	7.50 ± 4.42
A _r	3.80	5.06	2.74	2.58	9.93	5.71	4.97 ± 3.23
H _o	0.66	0.72	0.26	0.26	0.87	0.61	0.56 ± 0.25
H _e	0.64	0.76	0.26	0.29	0.92	0.78	0.61 ± 0.27
F _{is}	-0.03	0.05	-0.02	0.09	0.04	0.23	0.07
HWE	0.9156	0.3311	0.4855	0.3750	0.2748	0.0001	
PN (41)							
A	3	8	6	4	12	7	6.66 ± 3.20
A _r	2.99	6.60	3.22	2.89	8.67	5.53	4.98 ± 2.36
H _o	0.36	0.74	0.22	0.28	1.00	0.63	0.54 ± 0.30
H _e	0.64	0.83	0.29	0.30	0.88	0.78	0.62 ± 0.26
F _{is}	0.45	0.12	0.24	0.08	-0.14	0.20	0.14
HWE	0.0003	0.5537	0.0785	0.0657	0.2299	0.0688	
PK (35)							
A	4	6	4	4	21	8	7.83 ± 6.66
A _r	3.56	5.28	2.50	2.67	10.45	6.27	5.12 ± 2.74
H _o	0.71	0.76	0.22	0.22	0.78	0.64	0.55 ± 0.26
H _e	0.61	0.78	0.24	0.27	0.92	0.81	0.60 ± 0.28
F _{is}	-0.16	0.03	0.07	0.18	0.16	0.22	0.08
HWE	0.5003	0.2816	0.0792	0.1001	0.0051	0.1000	
ST (52)							
A	7	8	4	4	9	7	6.50 ± 2.07
A _r	6.00	6.59	2.81	2.88	7.41	4.97	5.14 ± 2.05
H _o	0.78	0.57	0.32	0.38	0.64	0.59	0.54 ± 0.16
H _e	0.86	0.81	0.46	0.46	0.84	0.74	0.69 ± 0.18
F _{is}	0.10	0.31	0.30	0.17	0.25	0.21	0.22
HWE	0.4029	0.0001	0.1525	0.4748	0.1005	0.1999	

RN = Ranong; PN = Phangnga; PK = Phuket; ST = Satul.

P values were adjusted for multiple comparisons using the Bonferroni correction: $P < 0.0083$ (0.05/6).

Table 3 Pairwise genetic differentiation (above diagonal) from program Arlequin V.3.11 and estimated number of migrants between four Indian mackerel populations (below diagonal) from the program POPGENE V.1.31.

	RN	PN	PK	ST
RN	***	0.0049	0.0052	0.0192
PN	5	***	0.0034	0.0193
PK	7	10	***	0.0036
ST	6	4	4	***

RN = Ranong; PN = PhangNga; PK = Phuket; ST = Satul. *** = Not applicable.

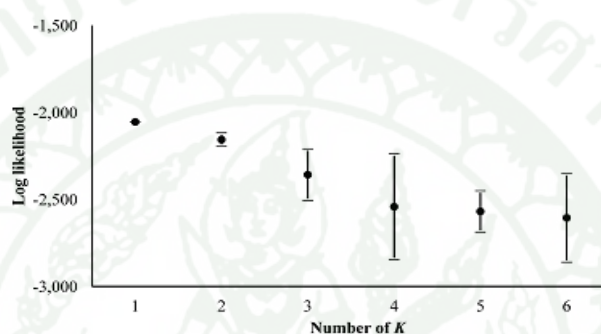


Figure 2 Mean (closed circles) and standard deviation (vertical lines) of log likelihood values for K , the number of putative clusters of Indian mackerel calculated using the STRUCTURE program.

DISCUSSION

The Andaman Sea stocks of Indian mackerel exhibited moderate levels of genetic variability within populations and no population structure ($F_{ST} = 0.012$). The four stocks were very similar in terms of allelic distribution and the amount of heterozygosity. The results suggested that a lack of genetic differentiation was likely due to the impact of migration. For marine species, migration can have a substantial impact on the extent of population substructure (Hellberg, 2009). It is believed that adult Indian mackerel migrate from coastal waters to spawn in the open sea where sufficient food is available and environmental conditions are optimal (Collette and Nauen, 1983). Individual fish may spawn five

times or more per year and release multiple batches of 25,000 eggs per spawn (Sumontha *et al.*, 2010). Indian mackerel are found to spawn year round, peaking in two phases, from December to March and from August to September (Krajangdara, 2007), and they are believed to spawn in the open sea from Ranong to Satul provinces. The migratory behavior of Indian mackerel may lead to a congregation of fish from different geographical origins. To avoid sampling of individuals from the population mixture, Indian mackerel samples from the four locations were collected at about the same time. The samples of Indian mackerel in this study appeared to represent fish of a similar age, based on length-frequency distributions (data not shown). This lack of population structure also was supported by non-significant ($P > 0.05$) pairwise

F_{ST} values and population assignment analysis. All four samples were assigned to the same cluster with the highest probability. For the few studies that have assessed the genetic stock structure of Indian mackerel in Peninsular India and the Andaman Sea (Menezes *et al.*, 1993; Jayasankar *et al.*, 2004), there were no genetic differences reported among populations.

The genetic connection between the four sampled sites is further demonstrated by the number of migrants estimated between populations. Gene flow can be expressed as the product of the effective population size and the fraction of migrants per generation (Hedrick, 2005). Alternatively, gene flow can be determined from the number of migrants using rare allele frequencies from samples of different populations (Barton and Slatkin 1986). Alleles that are relatively rare overall but common in a few populations suggest these populations are connected by gene flow (Hellberg, 2009). The current results indicated that rare alleles were present at loci *Rbr-7*, *Rbr-8*, and *Rbr-13* with frequencies ranging from 0.003 to 0.009 in all samples. The estimated exchange of individuals varied from 4 to 10 across neighboring populations. Migrating Indian mackerel are believed to cover over 100 km (Krajandara *et al.*, 2007). Studies in marine species have indicated that the relationship between the gene flow and distance varies at different geographic scales. At small spatial scales, movement among populations is equally likely and there will be no relationship between the gene flow and distance (Hellberg, 2009). In the present study, it was likely that a lack of association between the gene flow and distance was due to the relatively small area that was studied, where the distance between sampling sites ranged from 140 to 500 km. This observation also was reported for stocks of spotted mackerel (*Scomber australasicus*) off Taiwan (Tzeng, 2007). In other studies of pelagic fishes, there was no evidence of a migration pattern even over large geographical scales for king mackerel (*Scomberomorus cavalla*) in the

western Atlantic Ocean and the Gulf of Mexico (Broughton *et al.*, 2002), for chub mackerel (*Scomber japonicus*) across the Mediterranean Sea and Atlantic Ocean (Zardoya *et al.*, 2004) and for bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Pacific and the Indian Oceans (Chiang *et al.*, 2006, 2008).

Reductions in the effective population size (N_e), which are crucial for maintaining variation, adaptation and survival of populations have been documented in commercial species of marine fish. For example, overfishing was reported to be a major factor causing a significant reduction in the effective population size and reduced genetic diversity in an exploited stock of New Zealand snapper *Pagrus auratus* (Hauser *et al.*, 2002). It is understood that the number of fish in the population is much larger than N_e because of overlapping generations, skewed sex ratios and the variation in the reproductive success of breeders (Bagley *et al.*, 1999). The effective size of a population can be estimated for the contemporary (local) or long-term time frame. While the long-term N_e is important for the maintenance of genetic variation and adaptability, the local N_e is crucial for determining the impact of short-term threats, such as genetic drift and inbreeding (Luikart *et al.*, 2010). Because the contemporary N_e is more relevant to the current status of Indian mackerel stocks, the present study estimated local N_e using the linkage disequilibrium (one-sample) method. If a single demographic unit of Indian mackerel were assumed, the estimated effective population size would be moderate ($N_e = 336$; 95% CI: 165-3233) based on the minimum size of 50 individuals for the short-term conservation of genetic diversity (Nelson and Soule, 1987). The current findings imply that the Indian mackerel stocks seem in little danger of inbreeding and genetic drift. To obtain reasonably precise estimates of N_e for exploited migratory fish species, researchers may need to sample repeatedly over the course of the spawning period (Hallerman, 2003). However, it would be useful to obtain fisheries data on the spawning stock biomass to estimate the census population

size (N) and to obtain the ratio of $N_e:N$. Low $N_e:N$ ratios appear to be characteristic of highly fecund species with high juvenile mortality and the information provides powerful insight into spawning behavior and recruitment of marine species (Hellberg, 2009; Waples and Do, 2010).

CONCLUSION

This study demonstrated that microsatellite markers developed from short mackerel were useful for estimating the genetic diversity and population structure of its congener, Indian mackerel. Moreover, these estimated genetic parameters were used to reveal the stock structure, migration pattern and effective breeding size of the population. The results suggest that the Andaman Sea stocks of Indian mackerel constitute a single population with moderate levels of genetic variation. These findings also support a management strategy by the Thai Department of Fisheries for Indian mackerel to be considered as a single stock. The effective population size estimate of these Andaman Sea samples was about 330 based on a single stock unit, although a more precise estimate would be needed. The present study provides baseline information on the genetic component of the Indian mackerel. This genetic data can be integrated with population dynamic data to establish the stock extent and composition for the effective management of the fisheries. In addition, sampling across temporal scales would be useful for monitoring genetic changes in the long-term. Sampling over the full extent of the species' range from Africa and the Red Sea in the west to the Pacific islands and Japan in the east would yield a complete picture of any geographic genetic stock structure.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was part of the first author's Master's thesis and was supported by the AG-BIO/PERDO-CHE Special Program for Higher

Education. Partial support was obtained from the National Research Council (Grant # PS2555-TT008). The authors would like to thank the staff of the Andaman Sea Fisheries Research and Development Center for providing the samples.

LITERATURE CITED

- Bagley, M.J., D.G. Lindquist and J.B. Geller. 1999. Microsatellite variation, effective population size, and population genetic structure of vermilion snapper, *Rhomboplite aurorubens*, off the southeastern USA. **Mar. Biol.** 134: 609–620.
- Barton, N.H. and M. Slatkin. 1986. A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. **Heredity** 56: 409–415.
- Broughton, R.E., L.B. Stewart and J.R. Gold. 2002. Microsatellite variation suggests substantial gene flow between king mackerel (*Scomberomorus cavalla*) in the western Atlantic Ocean and Gulf of Mexico. **Fish. Res.** 54: 305–316.
- Chiang, H.C., C.C. Hsu, H.D. Lin, G.C. Ma, T.Y. Chiang and H.Y. Yang. 2006. Population structure of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the South China Sea, Philippine Sea and western Pacific Ocean inferred from mitochondrial DNA. **Fish. Res.** 79: 219–225.
- Chiang, H.C., C.C. Hsu, G.C.C. Wu, S.K. Chang and H.Y. Yang. 2008. Population structure of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean inferred from mitochondrial DNA. **Fish. Res.** 90: 305–312.
- Collette, B.B. and C.E. Nauen. 1983. FAO species catalogue. Scombrids of the world. Vol. 2, An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. **FAO Fish. Synopses** 125(2): 137.
- Department of Fisheries. 2000–2010. **The Marine Fisheries Statistics: Base on the Sample Survey (1997–2007)**. Fishery Statistics

- Analysis and Research Group, Information Technology Center, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives. Bangkok, Thailand.
- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** 1: 47–50.
- Evanno, G., S. Regnaut and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Mol. Ecol.** 14:2611–2620.
- Guo, S.W. and E.A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics** 48: 361–372.
- Hallerman, E.M. 2003. Random genetic drift, pp. 197–214. In E.M. Hallerman (ed.), **Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists**. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA.
- Hauser L., G.J. Adcock, P.J. Smith, J.H. Bernal Ramírez and G.R. Carvalho. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 99: 11742–11747.
- Hedrick, P.W. 2005. **Genetics of Populations**. 3rd ed. Jones and Bartlett, Sudbury, MA, USA. 737 pp.
- Hellberg, M.E. 2009. Gene flow and isolation among populations of marine animals. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 40: 291–310.
- Jayasankar, P., P.C. Thomas, M.P. Paulton and J. Mathew. 2004. Morphometric and genetic analyzes of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) from peninsular India. **Asian Fish. Sci.** 17: 201–215.
- Krajangdara, T., P. Puntuleng, P. Chalee and P. Hussadee. 2007. **Reproductive Biology of Short Mackerel *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) and Indian Mackerel *R. kanagurta* (Cuvier, 1816) in Thai water**. Technical paper No. 19/2007. Marine Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives. Bangkok, Thailand. 36 pp.
- Luikart, G., N. Ryman, D. Tallmon, M. Schwartz and F. Allendorf. 2010. Estimation of census and effective population sizes: The increasing usefulness of DNA-based approaches. **Conserv. Genet.** 11: 355–373.
- Menezes, M.R., S. Naik and M. Martins. 1993. Genetic divergence in the Indian mackerel *Rastrelliger kanagurta* (Cuv) from the coastal waters of peninsular India and the Andaman Sea. **Indian J. Fish.** 40: 135–141.
- Nelson, K. and M. Soulé. 1987. Genetical conservation of exploited fishes, pp.345–368. In N. Ryman and F. Utter, (eds.). **Population Genetics & Fishery Management**. University of Washington Press. Seattle, WA, USA.
- Ovenden, J.R., D. Peel, R. Street, A.J. Courtney, S.D. Hoyle, S.L. Peel and H. Podlich. 2007. The genetic effective and adult census size of an Australian population of tiger prawns (*Penaeus esculentus*). **Mol. Ecol.** 16: 127–138.
- Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155: 945–959.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Mol. Ecol. Resour.** 8: 103–106.
- Srinulgray, T. and S. Piyapattanakorn. 2009. Genetic diversity of short mackerel *Rastrelliger brachysoma* populations in the Gulf of Thailand and Andaman Sea revealed by ISSR marker, pp. 254–260. In Kasetsart University, (eds.). **Proceedings of 47th Kasetsart University Annual Conference: Science, Bangkok (Thailand)**. Kasetsart University. Bangkok, Thailand.

- Sumontha, M., S. Boonsuk, S. Panjarat, T. Jaiyen and J. Ritthisaman. 2010. **Stock Assessment of Indian Mackerel (*Rastrelliger kanagurta* (Cuvier, 1816)) along the Andaman Sea Coast of Thailand**. Technical paper No. 13/2010. Marine Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives. Bangkok, Thailand. 38 pp.
- Taggart, J.B., R.A. Hynes and P.A. Prodöhl, A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. **J. Fish Biol.** 40: 963–965.
- Tzeng, T.D. 2007. Population structure and historical demography of the spotted mackerel (*Scomber australasicus*) off Taiwan inferred from mitochondrial control region sequencing. **Zool. Stud.** 46: 565–663.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills and P. Shipley. 2004. Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Mol. Ecol. Notes** 4: 535–538.
- Waples, R. 1998. Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetic differentiation in high gene flow species. **J. Hered.** 89: 438–450.
- Waples, R.S. and C. Do. 2010. Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: A largely untapped resource for applied conservation and evolution. **Evol. Appl.** 3: 244–262.
- Yeh, F.C., R.-C. Yang, T.B.J. Boyle, A.-H. Ye and J.X. Mao. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.
- Zardoya, R., R. Castillo, C. Grande, L. Favre-Krey, S. Caetano, S. Marcato, G. Krey and T. Patarnello. 2004. Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. **Mol. Ecol.** 13: 1785–1798.

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายณัฐ หมั่นพลศรี
วัน-เดือน-ปี-เกิด	1 มกราคม พ.ศ. 2529
สถานที่เกิด	จังหวัดหนองคาย
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (การประมง) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนา บัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน คณะกรรมการการอุดมศึกษา - ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2555 จากสำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สัญญาเลขที่ ภค./2555-ชท.08