

คำนำ

กุ้งขาว กุ้งขาวแวนนาไม หรือกุ้งขาวแปซิฟิก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* มีชื่อสามัญตาม Food and Agriculture Organization (FAO) ว่า White leg shrimp เป็นกุ้งพื้นเมืองที่เลี้ยงกันแพร่หลายในเขตทวีปอเมริกาใต้ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 เป็นต้นมา กรมประมงได้อนุญาตให้นำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวมาเพาะเลี้ยงในประเทศ (ทรงทรัพย์, 2552) เนื่องจากเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่ายและมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี จึงได้รับความนิยมเลี้ยงจากเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งทะเลเป็นอย่างมาก จนในปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทยส่วนใหญ่นิยมเลี้ยงกุ้งขาวเป็นสัตว์น้ำชายฝั่งอันดับหนึ่งทดแทนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วยในทุกพื้นที่ทั่วประเทศ แต่ในปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งขาวประสบกับปัญหาต่างๆ มากมายจึงทำให้ผลผลิตกุ้งขาวลดต่ำลง จากสถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2556 พบว่าปริมาณผลผลิตกุ้งขาวในปี พ.ศ. 2556 ทั้งหมดมีปริมาณ 310,700 ตัน คิดเป็นมูลค่า 55,781.90 ล้านบาท ซึ่งลดลงจากปี พ.ศ. 2555 ถึง 277,500 ตัน คิดเป็นมูลค่าที่ลดลงถึง 17,007.20 ล้านบาท (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมประมง, 2558) ซึ่งผลผลิตกุ้งขาวที่ลดต่ำลงมีหลายสาเหตุประกอบกัน อาทิเช่น ปัญหาความเสื่อมโทรมของบ่อเลี้ยงและการจัดการในการเลี้ยง ที่สำคัญที่สุดคือปัญหาการระบาดของโรคตายด่วน หรือโรค EMS (Early Mortality Syndrome) และปัญหากุ้งโตช้า ซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่เข้าใจว่าเป็นผลมาจากการผสมเลือดชิด (Inbreeding) ของสายพันธุ์ที่ใช้เลี้ยง ทำให้เกิดความเสื่อมทางพันธุกรรม (กัญจกรีย์ และคณะ, 2550) และจากการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวที่อาศัยการคัดเลือกเฉพาะกุ้งขาวตัวที่โตดีมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ มีผลให้กุ้งเจริญพันธุ์เร็ว ตลอดจนขาดการศึกษาเรื่องพันธุกรรมของประชากร ขาดการบริหารจัดการพ่อแม่พันธุ์และการดำรงรักษาพันธุ์ตามหลักพันธุศาสตร์ที่ดี ทั้งที่การดำเนินงานดังกล่าวเป็นปัจจัยที่สำคัญยิ่งต่อความยั่งยืนของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทุกชนิด (พนม และคณะ, 2555)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic Diversity) หมายถึง ความผันแปรของยีนหรือหน่วยพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง (ศรีจรรยา, 2546) ความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถบ่งบอกได้ในสองระดับ คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (วรางคณา, 2552) ซึ่งการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะมีบทบาทสำคัญทำให้สิ่งมีชีวิตมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรมากขึ้น โดยอาศัยกลไกการจัดเรียงตัวใหม่ของยีน (Recombination) ในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Meiosis) ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเกิดเมื่อสมาชิกของประชากรมีการแยกตัวออกจากประชากรเดิม และลดการถ่ายทอดยีน (Gene flow) ระหว่างประชากร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสมมูลยีน และความถี่อัลลีล (Allele) เปลี่ยนแปลงไป และต่อมาประชากรที่แยกจากกันจะมีลักษณะของวิวัฒนาการที่แตกต่างออกไป เพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง (Hedrick, 1985) สำหรับการตรวจวัดปริมาณความหลากหลายทางพันธุกรรม การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากร สามารถดำเนินการได้โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพระดับโมเลกุล (Molecular biotechnology) ในเรื่องของเครื่องหมายพันธุกรรม (Genetic marker) (พนม และคณะ, 2552)

เครื่องหมายพันธุกรรม (Genetic marker) หมายถึงสิ่งบอกตำแหน่งบนจีโนม (Genome) ซึ่งอาจเป็น ยีนที่กำหนดโปรตีนเกิดเป็นฟีโนไทป์ที่สังเกตได้จากการมองเห็นหรือโดยการตรวจทางเคมี เป็นยีนที่มีคุณสมบัติ ให้โปรตีนในรูปแบบที่จำแนกความแตกต่างได้ หรือเป็นดีเอ็นเอ (DNA) ที่ไม่ใช่ยีน เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอในจีโนมที่มีสถานะหลายรูปแบบ (Polymorphism) และสามารถจำแนกรูปแบบที่แตกต่างกันได้จากเทคนิคทางโมเลกุล ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมที่ดีควรมีความผันแปรสูง มีรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบง่าย ๆ เช่นการ ถ่ายทอดยีนแบบเดี่ยว และเป็นลักษณะหรือดีเอ็นเอที่ถูกตรวจหาและติดตามได้ง่าย (อมรา, 2542)

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คณะผู้วิจัยเลือกใช้เครื่องหมายพันธุกรรมที่มีชื่อว่า ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (Microsatellite DNA) ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ที่ซ้ำกันช่วงสั้น ๆ (Simple sequence repeats, SSRs) ขนาดประมาณ 1 - 6 นิวคลีโอไทด์ มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 2 ซ้ำขึ้นไปไม่เกิน 100 ซ้ำ และแต่ละชุด ซ้ำเรียงต่อกันอยู่ในทิศทางเดียวกันตลอด (Tandem repeat) พบกระจายทั่วไปในจีโนม และมีตำแหน่งอยู่ใน ส่วนของ Noncoding region ซึ่งความหลากหลายเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของจำนวนซ้ำ และมีรายงาน พบว่าสูงถึง 10^{-2} ต่อรุ่น (Weber and Wong, 2003) ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ เป็น เครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความหลากหลายสูง การแสดงออกเป็นแบบซ่มร่วม (Co-dominant) สามารถศึกษา ได้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ซึ่งต้องการปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียง เล็กน้อย ผลที่ได้สามารถนำไปวิเคราะห์ได้ และสามารถทำซ้ำโดยผลที่ได้ไม่เปลี่ยนแปลง พบกระจายทั่วไปใน จีโนมทั้งในระหว่างยีนและภายในยีน (ทักษิณา, 2552) นอกจากนี้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอยังมีจุดเด่นที่ สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ สามารถพัฒนาไพรเมอร์สำหรับไมโครแซทเทลไลท์ในสัตว์น้ำข้ามชนิดที่อยู่ในสกุล เดียวกันได้ (Cross-species amplification) เช่น ปลาดุกอูย-ปลาดุกยักษ์-ปลาเทโพ ปลาดุกอูย-ปลาสร้อย และปลาทุ-ปลาลัง เป็นต้น (สุภาวดี, 2559)

ด้วยเหตุนี้การประยุกต์ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ในการประเมินความหลากหลาย ทางพันธุกรรมของกุ้งขาวจัดเป็นแนวทางที่มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้ได้ข้อมูลความหลากหลายทาง พันธุกรรมที่ถูกต้องและเชื่อถือได้ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะถูกนำไปใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการ เพาะเลี้ยงและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์กุ้งขาวของประเทศไทยในอนาคต

วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกุ้งขาวจากโรงเพาะฟักของกรมประมง และ โรงเพาะฟักของเอกชนในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

1.การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างขาว่วยน้ำกุ้งขาวโรงเพาะฟักของกรมประมงและโรงเพาะฟักของเอกชน จำนวน 6 ประชากร (ตารางที่ 1) โดยเก็บตัวอย่างขาว่วยน้ำในสารละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 1 รายละเอียดเก็บตัวอย่างกุ้งขาว 6 ประชากร

รหัสประชากร	แหล่งตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
WH01	โรงเพาะฟักของกรมประมง จ.สงขลา	127
WH02	โรงเพาะฟักของกรมประมง จ.สงขลา	116
WH03	โรงเพาะฟักของกรมประมง จ.สงขลา	76
WH04	โรงเพาะฟักเอกชน จ.ปัตตานี	90
WH05	โรงเพาะฟักเอกชน จ.ตรัง	40
WH06	โรงเพาะฟักของกรมประมง จ.นครศรีธรรมราช	62

2.การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากขาว่วยน้ำกุ้งขาว โดยวิธี Proteinase K/Phenol-Chloroform ดัดแปลงจากวิธีของ Taggart *et. al.* (1992) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน (NanoDrop Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

3.การวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction หรือ PCR โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ (Microsatellite DNA Marker) จำนวน 7 ตำแหน่ง คือ CNM-MG-339, CNM-MG-479, Lvan0014, Lvan0016, Lvan0017, Lvan0022 และ TUMXLv.9.93 รายละเอียดตามตารางที่ 2 และมีส่วนผสมของสารละลายในการทำปฏิกิริยา PCR (Schuelke, 2000) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง

Locus	GenBank		Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')
	Accession No.	Repeat motif		
CNM-MG-339	-	(ACAAA)4	AAACAACATATTGCAGTTC	AAGCGTCAGATTCCAG
CNM-MG-479	-	T16	GTGAAGTTGGGATTATAG	CTGCCAGTTTAGCGAC
Lvan0014	EU419945	(AGAC)3...(ACAG)5	GTGGGTGTCTGTGGTACTTGAG	ATGGTTGTTCTCTGGCTCTTCT
Lvan0016	EU419946	(GA)5C(AGAC)4...(CAGG)5	TGTCACCCGAAAGATATGAGAG	CATGGCTTCCCTTTGTTTATC
Lvan0017	EU419947	(CT)10	GTAACATGCCCTCACTCACTCA	TGTCGCTGAGAGTTTATCATGG
Lvan0022	EU419950	(CAGA)6	GTGTGCCTATTTCTTATCTTAACGC	CTCTCGCTCTCGCTCTGTCTAT
TUMXLv.9.93	AF360115	(AG)9	GGTGTGTGTTTTGGTGATTTTG	CATTGATGCGTTTTCTTTAGGG

ตารางที่ 3 ส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR (Schuelke, 2000)

ส่วนผสมของสารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Distilled water	2.69
10x Buffer	1.00
dNTP mix	0.80
Bovine Serum Albumin (BSA)	0.10
Forward Primer + M13 Sequence	0.04
Reverse Primer	0.16
M13 Sequence + Fluorescence labeled	0.16
Taq DNA Polymerase	0.05
DNA Template	5.00
ปริมาตรรวม (ไมโครลิตร)	10.00

และสภาวะของปฏิกิริยา PCR (Schuelke, 2000) เป็นดังนี้

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 2 นาที	} 27 รอบ
อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที	
อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที	
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที	
อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที	} 8 รอบ
อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที	
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที	
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที	

นำผลผลิต PCR (PCR Product) ที่ได้มาแยกด้วยเทคนิค 6% Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis จากนั้นถ่ายภาพแถบอัลลีล (Allele) ด้วยเครื่อง Gel documentation และอ่านผลแถบอัลลีลที่ได้

4.การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร โดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.32 คำนวณความถี่ของอัลลีล (Alleles frequency) จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (Number of Alleles per locus) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีเฉลี่ยทั้งค่าสังเกตและค่าคาดหวัง (Observed and Expected heterozygosity) และทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) ในแต่ละประชากร โดยการวิเคราะห์ ณ ตำแหน่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (Polymorphic locus) ด้วยวิธี Likelihood ratio test และวิเคราะห์รวมทุกตำแหน่งที่สำรวจด้วยวิธี Chi-square test

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร โดยการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ F (F-Statistics) ด้วยโปรแกรม POPGENE version 1.32 และสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี UPGMA จากโปรแกรม POPTREEW web version (Takezaki *et. al.*, 2014)

ผลการศึกษา

1.การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร (ตารางที่ 4) พบว่าประชากรที่มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่พบต่อตำแหน่ง (Averages observed number of alleles = n_a) สูงสุดคือ WH04, WH05, WH03, WH02, WH06 และ WH01 โดยมีค่าเท่ากับ 11.00 ± 2.83 , 10.29 ± 2.36 , 7.57 ± 1.51 , 4.86 ± 1.35 , 4.71 ± 1.38 และ 2.57 ± 0.98 ตามลำดับ และจำนวน อัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งที่ถ่วงด้วยความถี่อัลลีล (Averages effective number of alleles = n_e) มีค่าสูงสุดในประชากร WH04, WH05, WH03, WH02, WH06 และ WH01 โดยมีค่าเท่ากับ 6.29 ± 1.86 , 6.16 ± 0.93 , 4.42 ± 0.60 , 3.47 ± 0.91 , 3.27 ± 0.86 และ 2.42 ± 0.92 ตามลำดับ

สำหรับประชากรที่มีค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (Observed heterozygosity = H_o) มีค่าสูงสุดคือ WH05, WH02, WH04, WH03, WH01 และ WH06 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.78 ± 0.14 , 0.77 ± 0.14 , 0.71 ± 0.16 , 0.68 ± 0.21 , 0.54 ± 0.34 และ 0.53 ± 0.14 ตามลำดับ ส่วนค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี (Expected heterozygosity = H_e) มีค่าสูงสุดในประชากร WH05, WH04, WH03, WH02, WH06 และ WH01 มีค่า 0.85 ± 0.03 , 0.83 ± 0.06 , 0.78 ± 0.03 , 0.70 ± 0.08 , 0.68 ± 0.09 และ 0.52 ± 0.25 ตามลำดับ

ค่าความหลากหลายของยีน (Gene diversity = I) มีค่าสูงสุดในประชากร WH04, WH05, WH03, WH02, WH06 และ WH01 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.00 ± 0.28 , 1.99 ± 0.17 , 1.68 ± 0.08 , 1.33 ± 0.25 , 1.30 ± 0.27 และ 0.84 ± 0.44 ตามลำดับ

เมื่อทำการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) พบว่าประชากรทั้งหมดมีการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P_{HWE} < 0.05$)

ตารางที่ 4 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรกุ่มขาว 6 ประชากร (N=จำนวนตัวอย่างในแต่ละประชากร n_a =จำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่พบต่อตำแหน่ง n_e =จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งที่ถ่วงด้วยความถี่อัลลีล H_o =ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี H_e =ค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี และ I=ค่าความหลากหลายของยีน)

ตำแหน่ง		ประชากร						ค่าเฉลี่ย
		WH01	WH02	WH03	WH04	WH05	WH06	
CNM-MG339	N	111	111	64	83	38	53	
	n_a	4	5	6	9	12	3	7.57±3.39
	n_e	3.96	4.12	4.80	6.44	7.18	2.91	5.44±1.62
	H_o	0.95	0.85	0.75	0.82	0.84	0.45	0.78±0.17
	H_e	0.75	0.76	0.80	0.85	0.87	0.66	0.80±0.08
	I	1.38	1.49	1.68	1.98	2.15	1.08	1.72±0.39
CNM-MG479	N	124	116	76	78	40	62	
	n_a	2	6	9	10	8	5	7.43±2.94
	n_e	2.00	3.52	4.45	5.72	6.58	3.45	4.62±1.67
	H_o	0.58	0.93	0.75	0.85	0.77	0.50	0.74±0.16
	H_e	0.50	0.72	0.78	0.83	0.86	0.71	0.75±0.13
	I	0.69	1.40	1.78	1.92	1.96	1.39	1.60±0.48
Lvan0014	N	124	115	70	90	40	60	
	n_a	2	3	6	9	8	3	5.86±2.93
	n_e	1.95	2.63	4.82	3.58	4.95	2.85	3.53±1.22
	H_o	0.63	0.56	0.86	0.64	0.87	0.80	0.72±0.13
	H_e	0.49	0.62	0.80	0.72	0.81	0.65	0.69±0.12
	I	0.68	1.03	1.66	1.56	1.74	1.07	1.33±0.43
Lvan0016	N	110	111	75	87	40	56	
	n_a	3	6	7	17	14	6	10.43±5.42
	n_e	2.78	4.91	3.76	9.29	5.91	4.66	6.08±2.26
	H_o	0.18	0.86	0.48	0.55	0.62	0.50	0.53±0.22
	H_e	0.64	0.80	0.74	0.90	0.84	0.79	0.80±0.09
	I	1.06	1.68	1.54	2.43	2.11	1.66	1.87±0.48

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตำแหน่ง	ประชากร							ค่าเฉลี่ย
		WH01	WH02	WH03	WH04	WH05	WH06	
Lvan0017	N	127	115	76	85	40	62	
	n_a	3	5	10	10	9	4	8.00±3.19
	n_e	2.44	3.92	3.75	5.81	5.54	2.08	4.31±1.54
	H_o	0.70	0.76	0.75	0.80	0.87	0.37	0.71±0.18
	H_e	0.59	0.75	0.74	0.83	0.83	0.52	0.73±0.13
	I	0.99	1.46	1.64	1.95	1.91	0.96	1.58±0.43
Lvan0022	N	119	113	75	90	39	60	
	n_a	3	6	8	12	12	6	9.00±3.60
	n_e	2.79	2.69	4.01	7.94	7.45	2.87	4.65±2.43
	H_o	0.76	0.85	0.69	0.84	0.90	0.60	0.77±0.11
	H_e	0.64	0.63	0.76	0.88	0.88	0.66	0.75±0.12
	I	1.06	1.20	1.66	2.26	2.19	1.38	1.69±0.51
TUMXLv9.93	N	121	115	68	66	37	59	
	n_a	1	3	7	10	9	6	7.29±3.46
	n_e	1.00	2.51	5.31	5.22	5.52	4.04	4.05±1.83
	H_o	0.00	0.61	0.32	0.44	0.54	0.46	0.39±0.22
	H_e	0.00	0.60	0.82	0.81	0.83	0.76	0.66±0.32
	I	0.00	1.00	1.79	1.87	1.87	1.55	1.43±0.74
ค่าเฉลี่ย	N	119.5	113.5	72	84	39	59	139.21
	n_a	2.57±0.98	4.86±1.35	7.57±1.51	11.00±2.83	10.29±2.36	4.71±1.38	7.94±3.36
	n_e	2.42±0.92	3.47±0.91	4.42±0.60	6.29±1.86	6.16±0.93	3.27±0.86	4.67±1.60
	H_o	0.54±0.34	0.77±0.14	0.68±0.21	0.71±0.16	0.78±0.14	0.53±0.14	0.67±0.11
	H_e	0.52±0.25	0.70±0.08	0.78±0.03	0.83±0.06	0.85±0.03	0.68±0.09	0.74±0.12
	I	0.84±0.44	1.33±0.25	1.68±0.08	2.00±0.28	1.99±0.17	1.30±0.27	1.60±0.45

2.การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

ค่าสัมประสิทธิ์ F (F-Statistics) เป็นค่าที่แสดงความสัมพันธ์ของอัลลีลภายในประชากร ซึ่งสามารถบอกได้ว่าประชากรนั้นมีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อยหรือไม่ (Nei, 1977) จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร โดยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ F (F-Statistics) พบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรกุ่มขาวทั้ง 6 ประชากร (F_{st}) มีค่าระหว่าง 0.0877 – 0.2549 โดยมีค่า F_{st} เฉลี่ยเท่ากับ +0.1501 ส่วนการประเมินการผสมเลือดชิดวิเคราะห์จากค่า Fixation index (F_{is}) พบว่ามี 2 ตำแหน่งจาก 7 ตำแหน่ง (Lvan0016 และ TUMXLv9.93) ที่มีค่าเป็นบวก ($F_{is} = +0.3154$ และ $+0.3753$) หมายความว่า ค่าเฮเทอโรไซโกตน้อยกว่าที่ควรจะเป็น เกิดขึ้นเนื่องจากการมีการผสมเลือดชิด หรือมีการรวมกันของ

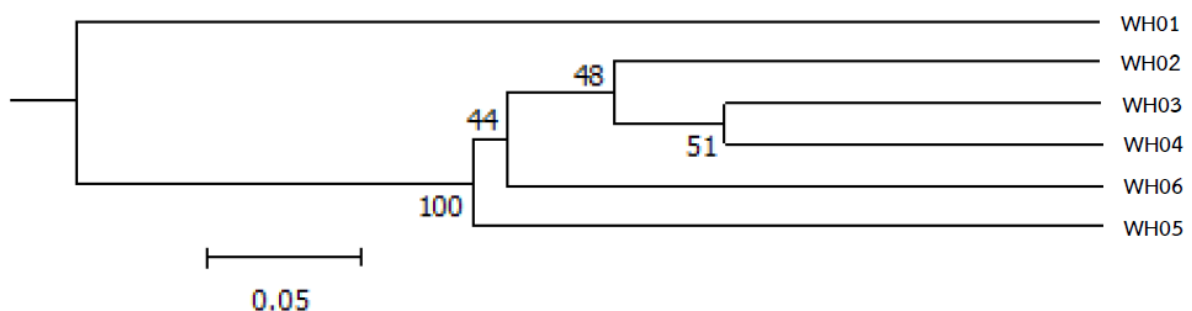
ประชากรที่มีความถี่อัลลีลต่างกัน (Wahlinds' effect) เป็นต้น ส่วนในตำแหน่ง CNM-MG479, CNM-MG339, Lvan0014, Lvan0017 และ Lvan0022 มีค่าเป็นลบ หมายความว่าค่าเฮเทอโรไซโกตมากกว่าที่ควรจะเป็น ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าสัมประสิทธิ์ F (F-Statistics) ในแต่ละตำแหน่งของประชากร (F_{st} =ค่าที่วัดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรต่างๆ F_{is} =ค่าที่บอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรย่อย และ F_{it} =ค่าที่บอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรทั้งหมด)

ตำแหน่ง	F_{is}	F_{it}	F_{st}
CNM-MG339	-0.0015	+0.1263	+0.1276
CNM-MG479	-0.0363	+0.1161	+0.1470
Lvan0014	-0.0746	+0.0595	+0.1248
Lvan0016	+0.3154	+0.4200	+0.1528
Lvan0017	-0.0045	+0.1529	+0.1567
Lvan0022	-0.0517	+0.0406	+0.0877
TUMXLv9.93	+0.3753	+0.5346	+0.2549
ค่าเฉลี่ย	+0.0702	+0.2098	+0.1501

3.แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรกุ่มขาวทั้งหมด 6 ประชากร ด้วยวิธี UPGMA ดังภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่าประชากรแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยประชากรกุ่มขาวจากโรงเพาะฟักของกรมประมงในจังหวัดสงขลา (WH01) และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยประชากรกุ่มขาวจากโรงเพาะฟักของกรมประมงในจังหวัดสงขลา (WH02, WH03) โรงเพาะฟักของกรมประมงในจังหวัดนครศรีธรรมราช (WH06) โรงเพาะฟักของเอกชนในจังหวัดปัตตานี (WH04) และโรงเพาะฟักของเอกชนในจังหวัดตราด (WH05) ซึ่งภายในกลุ่มที่ 2 นี้มีการแบ่งย่อยประชากรกุ่มขาวออกเป็นอีกหลายๆ กลุ่ม แต่ค่าการเข้าส่วนใหญ่มีค่าอยู่ระหว่าง 44-51 เปอร์เซ็นต์ มีเพียงจุดแยกระหว่างกลุ่ม WH05 กับ WH02, WH03, WH04 และ WH06 เท่านั้นที่มีความการเข้าสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 1 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree)

สรุปและวิจารณ์ผล

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าประชากรกึ่งขาวจากโรงเพาะฟักเอกชนในจังหวัดปัตตานี (WH04) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรมากที่สุด รองลงมาคือประชากรกึ่งขาวจากโรงเพาะฟักของเอกชนในจังหวัดตราด (WH05) และประชากรกึ่งขาวจากโรงเพาะฟักของกรมประมงในจังหวัดสงขลา (WH03) โดยมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่พบต่อตำแหน่ง (n_a) อัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งที่ถ่วงน้ำหนักด้วยความถี่อัลลีล (n_e) ค่าสังเกตเฮเตอโรไซโกซิตี (H_o) และค่าความหลากหลายของยีน (I) เท่ากับ 11.00 ± 2.83 10.29 ± 2.36 7.57 ± 1.51 , 6.29 ± 1.86 6.16 ± 0.93 4.42 ± 0.60 , 0.71 ± 0.16 0.78 ± 0.14 0.68 ± 0.21 และ 2.00 ± 0.28 1.99 ± 0.17 1.68 ± 0.08 ตามลำดับ ซึ่งจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่พบต่อตำแหน่งและค่าสังเกตเฮเตอโรไซโกซิตีจากการศึกษาในครั้งนี้มีค่าสูงกว่าการศึกษาของ Valles-Jimenez *et. al.* (2005) ที่ทำการศึกษาศรีสร้างพันธุ์ศาสตร์ประชากรของกึ่งขาวจากประเทศเม็กซิโกถึงประเทศปานามาด้วยความแปรปรวนของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยมีค่าเท่ากับ 7.4–8.6 และ 0.241–0.388 ตามลำดับ และมีค่าสูงกว่าการศึกษาของ Perez-Enriquez *et. al.* (2009) ที่ทำการศึกษาสถานะความหลากหลายทางพันธุกรรมของพ่อแม่พันธุ์กึ่งขาวในประเทศเม็กซิโก โดยมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยที่พบต่อตำแหน่งและค่าสังเกตเฮเตอโรไซโกซิตี เท่ากับ 8.98 และ 0.57 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีค่าสังเกตเฮเตอโรไซโกซิตีสูงกว่าการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่ำในกึ่งขาว 5 ประชากรในประเทศคิวบาโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่มีค่าเท่ากับ 0.27 (Artiles *et. al.*, 2011) แต่มีค่าสังเกตเฮเตอโรไซโกซิตีต่ำกว่าจากการศึกษาของจารุวรรณ และคณะ (2556) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการระบุพ่อแม่ลูกของประชากรกึ่งขาวปลอดเชื้อโรคในโรงเพาะฟัก โดยมีค่าสังเกตเฮเตอโรไซโกซิตีรุ่นพ่อแม่และรุ่นลูก เท่ากับ 0.891 และ 0.813 ตามลำดับ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรกึ่งขาวทั้ง 6 ประชากรมีค่าสูง ($F_{st} = 0.0877-0.2549$) แสดงให้เห็นว่าประชากรกึ่งขาวทั้ง 6 ประชากรมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกึ่งขาว 3 รุ่น (F_5 , F_6 และ F_7) ที่มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ ($F_{st} = -0.004$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประชากรกึ่งขาวทั้ง 3 รุ่นมี Homogeneity สูง (Luvesuto *et. al.*, 2007) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Perez-Enriquez *et. al.* (2009) ที่มีค่า F_{st} เพียง 0.015

จากแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าประชากรกึ่งขาวแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยประชากรกึ่งขาวจากโรงเพาะฟักของกรมประมงในจังหวัดสงขลา (WH01) และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยประชากรกึ่งขาวจากโรงเพาะฟักของกรมประมงในจังหวัดสงขลา (WH02, WH03) โรงเพาะฟักของกรมประมงในจังหวัดนครศรีธรรมราช (WH06) โรงเพาะฟักของเอกชนในจังหวัดปัตตานี (WH04) และโรงเพาะฟักของเอกชนในจังหวัดตราด (WH05) โดยประชากรกึ่งขาวภายในกลุ่มที่ 2 มีพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกัน แต่แตกต่างจากประชากรกึ่งขาวในกลุ่มที่ 1 ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการประชากรกึ่งขาวในกลุ่มที่ 2 เกิดจากการนำพ่อแม่พันธุ์จากแหล่งเดียวกันมาผสมข้ามกับพ่อแม่พันธุ์ที่มีอยู่ภายในโรงเพาะฟักนั้นๆ จึงทำให้ประชากรกึ่งขาวในกลุ่มที่ 2 ทั้ง 5 ประชากรมีพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกัน

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกึ่งขาวทั้ง 6 ประชากรที่ทำการศึกษาในครั้งนี้อยู่ในเกณฑ์ดี มีความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลางถึงมากที่สุด (พิจารณาจากค่า $F_{st}=0.0877-0.2549$ เทียบเคียง

กับ Wright (1978) โดยค่า $F_{st}=0.00-0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ค่า $F_{st}=0.05-0.15$ แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง ค่า $F_{st}=0.15-0.25$ แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก และค่า $F_{st}>0.25$ แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด) มีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์ได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สะท้อนให้เห็นว่าประชากรกุ้งขาวในประเทศไทยยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูง ปัญหาที่ก่อให้เกิดโรคภัยและปัญหาที่เชื้อโรคที่เกษตรกรส่วนใหญ่เข้าใจว่าเป็นผลมาจากการผสมเลือดชิดของสายพันธุ์ที่ใช้เลี้ยงนั้น น่าจะมีสาเหตุอื่นที่ไม่ใช่พันธุกรรมของกุ้ง เช่น การจัดการบ่อที่ไม่เหมาะสมทำให้บ่อเลี้ยงและแหล่งน้ำเสื่อมโทรม เป็นต้น แม้กระนั้นเกษตรกรก็ควรที่จะทำการตรวจสอบและเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวก่อนที่จะนำมาเพาะขยายพันธุ์ทุกครั้ง เพื่อลดการเกิดปัญหาการผสมเลือดชิดและเพิ่มแหล่งพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวที่มีคุณภาพของไทยให้มีศักยภาพด้านการผลิตเพิ่มสูงขึ้นและมีความยั่งยืนต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่านของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเขต ๖ (สงขลา) ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำนครศรีธรรมราช โรงเพาะฟักเอกชนในจังหวัดตราดและจังหวัดปัตตานี ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณชาโตชิ คูโบตะ และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเขต ๔ (กระบี่) ทุกท่านที่อำนวยความสะดวก ให้อำนวยความสะดวกเครื่องมือและอุปกรณ์ในระหว่างการเดินทางมาดำเนินการทดลอง ซึ่งการศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการความร่วมมือทางวิชาการระหว่างไทย-ญี่ปุ่น โครงการ “การพัฒนาเทคโนโลยีด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อความมั่นคงและความปลอดภัยทางอาหารเพื่อศตวรรษหน้า” (Development of Aquaculture Technology for Food Security and Food Safety in the Next Generation)

เอกสารอ้างอิง

- กัณธรีย์ เจริญทวี, สุภาวดี พุ่มพวง, อุทัยรัตน์ ณ นคร และ สุริยัน ธัญกิจจานุกิจ. 2550. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกุ้งก้ามกรามจากโรงเพาะฟักและธรรมชาติ. วารสารเทคโนโลยีการประมง ปีที่ 1 ฉบับที่ 1. 50-58.
- จารุวรรณ ชาญณรงค์, ชูย กอง, อัครพงษ์ สวัสดิพงษ์, ญอน ขาง และ เลิศลักษณ์ เงินศิริ. 2556. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการระบุพ่อแม่ลูกของประชากรกุ้งขาวปลอดเชื้อโรคร้ายในโรงเพาะฟัก. ใน: เรื่องเต็มการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51 สาขาวิทยาศาสตร์, สาขาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. วันที่ 5-7 กุมภาพันธ์ 2556. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร. หน้า 18-25.
- ทรงทรัพย์ อรุณกมล. 2552. การใช้ *Schizochytrium limacinum* ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone) และผลที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันและความทนทานต่อความเครียด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 76 หน้า.

- ทักษิณา เหมยคำ. 2552. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวาย *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) จากโรงเพาะฟักในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 70 หน้า.
- พนม กระจำวงศ์ สอดสุข, ศรีรัตน์ สอดสุข, ธัญญ์ สักรณกิจ, พลชาติ ผิวเณร และ ภูวนัย ชัยศรี. 2552. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างระหว่างประชากรในปูม้าจากแหล่งธรรมชาติของไทยโดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลต์และการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโต. การประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2552. 161-176.
- พนม กระจำวงศ์ สอดสุข, สุภาพ ไพรพนาพงศ์, นิพนธ์ เสนอินทร์, ศรีรัตน์ สอดสุข และ พลชาติ ผิวเณร. 2555. การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในประชากรปลากะพงขาวจากแหล่งเพาะพันธุ์. *Thai J. Genet.* 5(2) : 166-182.
- วรางคณา พระคุณ. 2552. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ในอ่าวไทยตอนบน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 92 หน้า.
- ศรีจรรยา สุขมนินต์. 2546. การพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์สำหรับปลาดุกอูยและการประยุกต์เพื่อการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 105 หน้า.
- ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมประมง. 2558. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2556. เอกสารฉบับที่ 7/2558. กรมประมง, กรุงเทพมหานคร. 92 หน้า.
- สุภาวดี พุ่มพวง. 2559. จีโนมิกส์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 236 หน้า
- อมรา คัมภีรานนท์. 2542. พันธุศาสตร์มนุษย์. บริษัท แท็กซี่แอนด์เจอร์นัลพับลิเคชั่น, กรุงเทพมหานคร. 308 หน้า.
- Artiles, A., I. Rodriguez, A. Perez, L. Perez and G. Espinosa. 2011. Low genetic variability in the fifth introduction of *Litopenaeus vannamei* in Cuba, as estimated with microsatellite markers. *Biotechnol. Aplicat.* 28:147-150.
- Hedrick, P. W. 1985. Genetic of Population. Jones and Bartlett Publ. Inc., Boston. 629 pp.
- Luvesuto, E., P. Domingues de Freitas and P. M. Galetti Junior. 2007. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). *Genet. Mol. Biol.* 30(4): 1156-1160.
- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Human. Genet. Ann.* 1: 225-233.
- Perez-Enriquez, R., F. Hernandez-Martinez and P. Cruz. 2009. Genetic diversity status of white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico. *Aquaculture* 297:44-

50.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature. Biotech.* 18:233-234.

Taggart, J. B., R. A. Hynes, P. A. Prodohl and A. Ferguson. 1992. A simplified protocol of routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish. Biol.* 40:963-965.

Takezaki, N., M. Nei and K. Tamura. 2014. POPTREEW: Web version of POPTREE for constructing population tree from allele frequency data and computing some other quantities. *Mol. Biol. Evol.* 3 pp.

Valles-Jimenez, R., P. Cruz and R. Perez-Enriquez. 2005. Population Genetic Structure of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA Variation. *Mar. Biotechnol.* 6:475-484.

Weber, J. L. and C. Wong. 2003. Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1123 - 1128.

Wright, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Vol.4: Variability Within and Among Natural Populations. Chicago: University of Chicago Press.