

## บทนำ ความสำคัญและที่มาของปัญหาของการวิจัย

ปลาโพง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pangasius bocourti* นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปตามภาษาพื้นบ้าน เช่น ปลาเผา ปลาโพง ปลาแยง และอ้ายดอง ปลาชนิดนี้จัดอยู่ในวงศ์ปลาสาวย และปลาสังกะวาด (Pangasiidae) มีลักษณะส่วนหัวกลม ปากแคบ รูปร่างป้อม ท้องอูม ลำตัวตอนหน้าค่อนข้างกลม และแบนข้างเล็กน้อยที่ด้านท้าย ครีบไขมันเล็ก ปลาวัยอ่อนมีสีเทาเหลืองหรือเขียวอ่อน ข้างลำตัวมีแถบคล้ำ ครีบอกมีแต้มสีจาง ปลาตัวเต็มวัยมีสีเทาอบน้ำตาลอ่อนหรือฟ้าอ่อน ท้องสีขาว ครีบสีจาง ครีบหางมีแถบสีคล้ำจาง มีขนาดประมาณ 60-80 ซม. ปลาวัยอ่อนกินแมลง ปลาตัวเต็มวัยกินพืชเป็นส่วนใหญ่ อาจกินแมลงและหอยบ้าง พบในบริเวณลุ่มน้ำโขงถึงอำเภอเชียงของ จังหวัดเชียงราย และในแม่น้ำเจ้าพระยา บริโภคโดยการปรุงสดและรมควัน และยังสามารถเลี้ยงเป็นปลาสวยงามได้อีกด้วย หน่วยงานหลักกรมประมงในขณะนี้มีนโยบายส่งเสริมให้เกษตรกร โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเลี้ยงปลาชนิดนี้เป็นปลาเศรษฐกิจชนิดใหม่ เช่นเดียวกับประเทศเวียดนาม ปลาโพง เป็นปลาเศรษฐกิจตัวใหม่ของคนภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่นิยมเลี้ยงเพื่อการบริโภคและส่งออกเป็นสินค้าประมงที่สำคัญที่ทั่วโลกกำลังให้ความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจาก จัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีเนื้อสีขาวและรสชาติดี และเป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศ เช่น กลุ่มประเทศสหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา และในอนาคตอาจมีตลาดใหม่ในประเทศรัสเซียและตลาดเอเชีย ปัจจุบันประเทศที่ส่งออก ปลาโพงในรูป Filet มีเพียงประเทศเดียว คือประเทศเวียดนาม ในปัจจุบันปัญหาที่กักกันการค้าถือว่าเป็นเรื่องใหญ่สำหรับผู้ส่งออกรายเล็กๆ อย่างประเทศเวียดนามเพราะเกิดปัญหาเรื่องการเลี้ยงและการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์และการผสมพันธุ์กันเองจนเกิดปัญหาเลือดชิด ทำให้ปลามีขนาดเล็กและการเจริญพันธุ์ก่อนวัยที่เหมาะสม ทำให้ประเทศเวียดนามและประเทศไทยกำลังเผชิญปัญหาอย่างหนัก ในปัจจุบันนี้ยังไม่มีหน่วยงานทางราชการใดที่เป็นหน่วยงานหลักในประเทศไทยทำการศึกษาและวิจัยในเชิงลึกเกี่ยวกับการจัดการระบบพ่อแม่พันธุ์ปลาชนิดนี้ที่ชัดเจนมากนัก แต่พบว่ามีกำลังส่งเสริมการเพาะและการเลี้ยงจากหน่วยงานของกรมประมง

จากการศึกษาวิเคราะห์ในขั้นต้นถึงศักยภาพทางการตลาดและการผลิตของโลกในขณะนี้พบว่า ปลาชนิดนี้เป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศสูง และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกาเป็นตลาดใหญ่ที่มีความต้องการในการบริโภคสูงมาก โดยสหภาพยุโรปต้องการนำเข้าเพื่อทดแทนปลา Halibut ซึ่งมีคุณลักษณะของเนื้อสีขาว ก้างน้อย และไขมันต่ำ (Low fat content) ส่วนตลาดใหม่ที่มีอนาคต ได้แก่ ยุโรปตะวันออก รัสเซีย และเอเชีย ทั้งนี้ความต้องการของตลาดในภาพรวมนั้น มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เฉลี่ยร้อยละ 45 ต่อปี ในขณะที่มีผู้ผลิตและจำหน่ายรายใหญ่ผูกขาดเพียงรายเดียวเท่านั้นคือ ประเทศเวียดนาม

จากความสำคัญและความเป็นไปได้ในการเข้ามาศึกษาและทำการวิจัยอย่างต่อเนื่องและจริงจังในปลาเศรษฐกิจตัวใหม่ที่กำลังได้รับความนิยมอย่างสูงสุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในขณะที่ในแง่ของการพัฒนาสายพันธุ์และการจัดการระบบพ่อแม่พันธุ์ของปลาชนิดนี้ได้อย่างไรเพื่อให้ได้ลักษณะตรงตามที่ต้องการของประเทศและในประเทศต้องการ เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของการส่งออกและส่งเสริมให้เป็นปลาเศรษฐกิจของไทยที่เลี้ยงง่ายและโตเร็ว เนื้อมีสีขาวนวล ก้างน้อย ปริมาณไขมันแทรกระหว่างกล้ามเนื้อไม่มากเกินไป และคุณภาพตรงตามความต้องการของผู้บริโภค ซึ่งเราจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาและคัดแยกสายพันธุ์ที่แท้จริงออกมาก่อน เนื่องจากภาวะปัจจุบันปลาชนิดนี้มีการผสมข้ามสายพันธุ์กับปลาสรวย และ ปลาเทโพ ทำให้เกิดการสับสนในการจัดการพ่อแม่พันธุ์และลูกที่ได้มีลักษณะที่ไม่ตรงตามความต้องการของตลาด คือ เนื้อมีสีเหลืองนวล ซึ่งตลาดต่างประเทศต้องการปลาที่มีเนื้อสีขาวและมันนวล อีกทั้งพบว่าปลาชนิดนี้มีการผสมกันในสายเลือดเดียวกันมาเป็นเวลานานแล้วในบางพื้นที่ และในปัจจุบันพบว่ามี การปนเปื้อนของสายพันธุ์กับปลาในกลุ่ม *Pangasius* ด้วยกันเอง อันได้แก่ ปลาสรวย ปลาเทโพ ปลาเทพา ทำให้ได้ลูกปลาที่มีลักษณะด้อยลงกว่าเดิม คุณภาพเนื้อปลาเปลี่ยนไป ดังนั้นหากมีการจัดการที่ถูกต้อง สามารถระบุสายพันธุ์ที่แท้จริงได้ ทำการคัดแยกสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางโมเลกุลได้ ก็จะทำให้ปลาชนิดนี้สามารถพัฒนาส่งเสริมให้เป็นปลาเศรษฐกิจตัวใหม่ของไทยเพื่อการส่งออกประกอบกับรัฐบาลได้ประกาศนโยบายและให้ความสำคัญต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารของประเทศ ในฐานะที่เป็นอุตสาหกรรมยุทธศาสตร์หลักในการสร้างเสถียรภาพทางเศรษฐกิจให้กับสังคมและชุมชน ภายใต้บริบทของการพัฒนาเศรษฐกิจอุตสาหกรรมแนวใหม่ที่เน้นระบบเศรษฐกิจแบบสมดุล (Balance Growth) และชุมชนเข้มแข็งและเพื่อสนับสนุนนโยบายของรัฐบาลในการแก้ไขปัญหาและเพิ่มมูลค่าการส่งออกให้กับประเทศ เพื่อให้เกิดการสนับสนุนการพัฒนาปลาชนิดนี้ซึ่งมุ่งหวังที่จะให้เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจตัวใหม่ของไทยที่มีคุณภาพอย่างยั่งยืน

จากผลการพัฒนางานวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 ที่ผู้วิจัยได้วางแผนทำการศึกษาและพัฒนา marker แบบไมโครแซทเทลไลท์ที่ไพรเมอร์จากปลาโง่งอย่างน้อยจำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือทางชีวโมเลกุลในการตรวจสอบและการจำแนกสายพันธุ์ของปลาโง่งในประเทศไทย ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่ไพรเมอร์จัดเป็นเครื่องหมายที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์ เนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่ให้ความแม่นยำสูง แม้ว่าการใช้ต้นทุนในการพัฒนาเครื่องหมายนี้จะสูงมากกว่าชนิดอื่นๆ ผู้วิจัยคาดหวังว่าจะนำไมโครแซทเทลไลท์ที่ไพรเมอร์ที่พัฒนาได้นี้ ไปใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์ของปลาโง่ง เพื่อเป็นประโยชน์ในการจำแนกและบ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาโง่งในประเทศไทยต่อไป

## วรรณกรรม ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ปลาโพง หรือ ปลาเผา (*Pangasius bocourti*) เป็นชื่อปลาที่นิยมเรียกกันในแถบจังหวัด นครพนม มุกดาหาร ในภาคกลางและภาคเหนือ เรียกว่า "ปลาโพง" เป็นปลาน้ำจืดของไทยมีถิ่นกำเนิด ในลุ่มน้ำเจ้าพระยาและลุ่มน้ำโขง นิยมบริโภคในตลาดท้องถิ่นภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปัจจุบันมีการ เลี้ยงในประเทศเวียดนามแถบสามเหลี่ยมปากแม่น้ำโขงสามารถส่งออกไปยังสหรัฐอเมริกาและประเทศ แถบยุโรป ปลาโพงเป็นชนิดที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคมาก เพราะเนื้อมีลักษณะขาวนวลรับประทาน เนื่องจากชาวยุโรปและชาวอเมริกันชอบบริโภคปลาที่มีเนื้อสีขาว ปัจจุบันประเทศไทยเริ่มมีการเลี้ยงปลา เเผาในแม่น้ำโขงแถบจังหวัดหนองคายและนครพนม เริ่มเลี้ยงแพร่หลายมากขึ้นแถบอำเภอท่าอุเทน จังหวัดนครพนมและขยายสู่แม่น้ำสงคราม วิธีการเลี้ยงเกษตรกรจะรวบรวมลูกพันธุ์ปลาจากธรรมชาติ ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม นำมาเลี้ยงในกระชังโดยให้อาหารเม็ดลอยน้ำ ลักษณะและการ เจริญพันธุ์ปลาโพงเป็นปลาตระกูลเดียวกับปลาสวายที่มีส่วนหัวกลมมน ส่วนท้อง ไม่มีสัน มีเมือกมาก ชอบอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำไหลที่มีออกซิเจนละลายน้ำสูงโดยเฉพาะในแม่น้ำโขง และจะพบในช่วงเดือน พฤษภาคมถึงมิถุนายนของทุกปีเท่านั้น ปลาโพงจัดเป็นปลากินเนื้อ ในธรรมชาติปลาชนิดนี้มีอัตราส่วน เพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1:1.5 ไข่ปลาโพงเป็นไข่ติดจมน้ำ มีลักษณะกลม สีขาวอมเหลืองใส เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 1.28 มิลลิเมตร ความดกไข่เฉลี่ย 157,040 ฟอง จากแม่ปลาน้ำหนักเฉลี่ย 8,680 กรัม ในการศึกษาความสมบูรณ์เพศจากการจับปลาตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน 2538 ที่บ้าน ปากอิง ตำบลศรีดอนชัย อำเภอเชียงของ จังหวัดเชียงราย พบว่าปลาที่จับได้ทุกตัวอยู่ในวัยเจริญพันธุ์ และยังพบว่าลักษณะเด่นของปลาโพงที่แสดงถึงความแตกต่างจากปลาชนิดอื่นในตระกูลเดียวกันนั้น นอกจากส่วนหัวที่กลมมนกว่าและกระเพาะลม ซึ่งแบ่งเป็นสองตอนแล้ว เมื่อลองสัมผัสดูจะพบว่าปลา โพงมีเมือกที่เหนียวเป็นจำนวนมาก เนื่องจากปลาโพงมีต่อมสร้างเมือก (mucous gland) ซึ่งจะขับเมือก ออกมาบริเวณรูโคนครีบทู จำนวน 3 รู

การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์แม่ปลาเจริญพันธุ์ เมื่ออายุได้ 4 ปี ขึ้นไป ในปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์สังเกต ความแตกต่างระหว่างเพศไม่ได้ พ่อแม่พันธุ์ปลาโพงในปัจจุบันได้มาจากวิธีรวบรวมปลาโพงอายุ 1 ปี จากธรรมชาติมาเลี้ยง โดยเลี้ยงปลาเพศผู้และเพศเมียในบ่อเดียวกัน เมื่อปลาโพงมีอายุ 4 ปี จึงนำมาขุน ด้วยอาหารผสม ให้กินวันละ 1% ของน้ำหนักตัว (อาหารผสม = ปลาเบ็ดบดละเอียด:รำละเอียด:ปลา ปั่น อัตราส่วน 2:2:1 ร่วมกับวิตามินอี 0.050 กรัมต่อกิโลกรัม, วิตามินซี 0.025-0.050 กรัมต่อกิโลกรัม และน้ำมันหมัก 0.5-1 %) นอกจากนั้นต้องคอยดูแลเพิ่มน้ำในบ่อเสมอ การเพาะพันธุ์เริ่มได้ในเดือน มีนาคมจนถึงเมษายน

การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ ช่วงเจริญพันธุ์ คัดเลือกแม่ปลาที่มีความสมบูรณ์ทางเพศ โดยการใช้ Flexible Catheter หรือใช้สายยางเล็กๆ ดูดไข่ เพื่อนำไข่มาวัดเส้นผ่าศูนย์กลางไข่ด้วยเวอร์เนียมิเตอร์ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไข่เท่ากับ 1.6-1.8 มิลลิเมตร) ส่วนปลาเพศผู้ที่สมบูรณ์เต็มที่ เพียงกดเบาๆ ที่ช่องน้ำเชื้อก็จะไหลออกมา (สำนักงานประมงจังหวัดนครพนม, 2549)

ปลาโมงเป็นปลาที่มีสายเลือดใกล้ชิดกับปลากลุ่มปลาสร้อย ปลาเทโพ ปลาเทพา และยังสามารถผสมข้ามสายพันธุ์ในกลุ่มดังกล่าวได้ด้วย ทำให้ได้ลูกผสมทั้งที่เป็นลักษณะที่ต้องการและไม่ต้องการของตลาดผู้บริโภค และมีความยุ่งยากต่อการจำแนกด้วยสายตา การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาโมงจึงมีความจำเป็นสำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนการอนุรักษ์ และการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้เกิดการเพาะเลี้ยงปลาโมงที่สามารถพัฒนาการเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ ที่ให้ผลผลิตต่อไร่สูงเพื่อการส่งออกที่ยั่งยืน และยังช่วยให้ทราบสายพันธุ์ที่มีในประเทศไทย ทำให้มีความแม่นยำในการคัดเลือกสายพันธุ์ เพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ดีที่สามารถนำไปส่งเสริมให้กับเกษตรกร หรือผู้ทำการเพาะเลี้ยงปลาโมงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการรายงานเรื่องการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคในการหาแถบ DNA และโปรตีนในปลาต่างประเทศและปลาพื้นเมืองของไทยมีด้วยกันหลายวิธี เช่น เทคนิค DNA fingerprint มีรายงานในเรื่องการหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาแซลมอนลูกผสม (Galbreath *et al.*,1997), ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรปลา sockeye salmon (Thorgaard *et al.*,1995), ความเหมือนและความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) จาก 5 สายพันธุ์ (Bosworth and Wolters, 1997), การศึกษาพันธุกรรมของลูกผสมรุ่นที่ 1 ของปลาแซลมอนชนิดต่าง ๆ โดยเทคนิค RAPD (Elo *et al.*,1997), ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาแซลมอนที่ได้มาจากแม่น้ำ 3 แห่ง ด้วยเทคนิค RFLP (Clifford *et al.*,1997), ความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาดุกอุยจากพื้นที่ 3 แห่ง ในแม่น้ำเจ้าพระยา จากเนื้อเยื่อตับและไข่ปลา ด้วยวิธี RFLP (นิภาพร, 2539), ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ กัน 4 แห่งในประเทศไทย วิเคราะห์ตัวอย่างจากเลือด โดยเทคนิค Microsatellite, ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ กัน 4 แห่งในประเทศไทย วิเคราะห์ตัวอย่างจากเลือดด้วยเทคนิค Isosymes variation (Na-nakorn *et al.*,1999) และสำหรับการศึกษาในปลาหมอไทยจะใช้วิธี random amplification of polymorphic DNA (RAPD) และการวิเคราะห์ isozyme variation

ปัจจุบันเครื่องหมายพันธุกรรมได้เข้ามามีบทบาทสำคัญต่อการประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอซึ่งพบกระจายอยู่ทั่วไปตลอดทั้งจีโนมและมีความผันแปรสูง มีการแสดงผลแบบลักษณะข่มร่วม ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงทำให้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้ในการวางแผนจัดการกับปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการประมงได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูง นอกจากนั้นแล้วไมโครแซทเทลไลท์ยังเป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลที่เหมาะสมต่อการศึกษาลายๆ ด้าน เช่น การศึกษาแผนที่ยีน ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญและจำเป็นต่อการศึกษาลักษณะปริมาณ และยังสามารถนำไปสู่การพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธี MAS (Marker-assisted selection) ได้ในขั้นต่อไป ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ หรือ Short tandem repeat (STR) เป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเรียงตัวกันประมาณ 1-6 นิวคลีโอไทด์ โดยการซ้ำติดกันไปเรื่อยๆ เป็นช่วงยาว เช่น ไดนิวคลีโอไทด์ มีลำดับเบสซ้ำชุดละ 2 bp ได้แก่ (CA) $n$  คือ มีลำดับเบส CA จำนวน  $n$  ซ้ำ เช่น CACACA....CA ส่วนไตรนิวคลีโอไทด์ มีลำดับเบสซ้ำชุดละ 3 bp ได้แก่ (TCC) $n$  คือมีลำดับเบส TCC จำนวน  $n$  ซ้ำ เช่น TCCTCCTCC...TCC ความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเกิดจากการขาดหายไปของลำดับเบสซ้ำ (deletion) หรือการสอดแทรกของลำดับเบสซ้ำ (insertion) การกลายนี้เกิดจากกระบวนการเข้าคู่มิดตำแหน่งของลำดับเบส ในขณะที่มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ ด้วยเหตุที่ไม่โครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมีคุณสมบัติที่เหมาะสมหลายประการสำหรับเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม ทำให้มีการศึกษาพัฒนาไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ความผันแปรของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในสัตว์น้ำหลายชนิด ศรีจรรยา (2546) ศึกษาการพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์สำหรับปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) โดยจากการสร้างห้องสมุดจีโนมของปลาดุกอุยและคัดเลือกด้วยโพรบ (GT) $_{15}$  ได้พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอปลาดุกจำนวน 2,841 โคลน ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 173 โคลน พบว่า 41 โคลน มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยสามารถจำแนกประเภทของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอได้เป็น perfect, imperfect และ compound repeat ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะพบไมโครแซทเทลไลท์ประเภท perfect repeat (61.36) และมีเบสซ้ำชนิด di-nucleotide มากที่สุด และสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้จำนวน 23 คู่ ซึ่งพบว่าไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ มีความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยมีจำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 2-13 อัลลีล และมีค่า observed heterozygosity อยู่ในช่วง 0.10-0.80 ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นมาสามารถนำไปศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและสร้างแผนที่โครโมโซมของปลาดุกอุยต่อไปได้ ศรีรัตน์ (2547) ศึกษาการวิเคราะห์ความเป็นพ่อแม่ลูกของกึ่งกุลาดำโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ โดยศึกษารูปแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอ Microsatellite Markers ของพ่อแม่ลูกกึ่งกุลาดำ ด้วยวิธี PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ของกึ่งกุลาดำ หลังจากนั้นนำไปแยกความแตกต่างหารูปแบบ

Microsatellite Marker ของกุ้งกุลาดำแต่ละตัว โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 6% denaturing polyacrylamide gel สำเร็จแล้วย้อมดูแถบของดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (Silver stain) จากไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ได้แก่ DFUPm 103, DFUPm104, DFUPm111, DFUPm303 และ DFUPm 308 สามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่ลูกของกุ้งกุลาดำได้อย่างชัดเจน โดยลูกกุ้งกุลาดำจะไต่ยีนจากพ่อและแม่อย่างละครึ่ง Charoentawee and Na-nakorn (2006) ศึกษาการจำแนกลักษณะของกุ้งก้ามกรามโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์สำหรับกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) จากห้องสมุดจีโนมของกุ้งก้ามกรามโดยใช้ไบโอไทเนิลโพรบ (biotinylated probe) ในการคัดแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ 6 ชนิด คือ (AG)<sub>10</sub>, (TG)<sub>10</sub>, (CAA)<sub>10</sub>, (CAG)<sub>10</sub>, (GAT)<sub>10</sub>, และ (TAC)<sub>10</sub> ลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์และออกแบบไพรเมอร์ได้จาก 20 โลไซ 10 โลไซหลากหลายรูปแบบจากลำดับที่ 5-17 อัลลิล เฉลี่ยต่อตำแหน่ง และค่าเฉลี่ยค่าสังเกตเทอโรโซโกซิติอยู่ระหว่าง 0.27-0.83 การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์เพื่อใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์และใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของกุ้งก้ามกราม นอกจากนั้นยังพบการรายงานการศึกษาในปลาหลายชนิด เช่น แอดแลนติกคอด (*Gadus morhua*) (Brooker et al., 1994), seabass (*Dicentrarchus labrax*) (Garcia de Leon et al., 1995), ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Lee and Kocher, 1996), ปลาไน (*Cyprinus capio*) (Aliah et al., 1999), ปลาดุกยักษ์ (*C.garipinus*) (Galbusera et al., 1996), ปลาดุกอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) (Waldbieser and Bosworth, 1997), ปลากดเหลือง (*Mystus nemurus*) (Usmani et al., 2001) และปลาตะเพียนขาว (*Pantius gonionotus*) (Kamonrat et al., 2002) เป็นต้น ข้อมูลของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาวิจัยทางด้านประมง การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ใช้ศึกษาโครงสร้างของประชากร ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากรสัตว์น้ำ ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนทางพันธุกรรมของประชากรสัตว์น้ำ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและทำประวัติของประชากรปลาและสัตว์น้ำ ตลอดจนทั้งสามารถใช้ประโยชน์ในการทำแผนที่ยีน

ปัญหาเรื่องของการผสมข้ามสายพันธุ์ของปลาโมงกับปลาในกลุ่มสวาย เทโพ เทพา ตลอดจนผสมในสายเลือดชิด เนื่องจากการจัดการพ่อแม่พันธุ์ที่ไม่ได้มาตรฐาน เพราะผู้เพาะเลี้ยงไม่สามารถจำแนกชนิดปลาที่ถูกต้องตามสายพันธุ์ได้ด้วยตาเปล่า ดังนั้นการนำไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ของปลาโมงมาใช้ในการหาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ในประเทศไทย จึงมีความจำเป็นในการศึกษาเป็นอย่างยิ่ง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน ในการตรวจสอบสายพันธุ์ที่ถูกต้อง และการจัดการระบบพ่อแม่พันธุ์อย่างถูกต้องทางวิชาการ การส่งเสริมการเลี้ยงปลาโมงซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจน้ำจืดตัวชนิดใหม่ที่มีแนวโน้มทางการตลาดสูง และเป็นปลาที่มีความต้องการทั้งในและต่างประเทศ สามารถที่จะสร้างรายได้เข้าสู่

ประเทศได้อย่างยั่งยืนในอนาคต หากสามารถจัดการและมีระบบการจำแนกสายพันธุ์ได้อย่างถูกต้องและชัดเจน เพื่อประโยชน์ต่อวงการเพาะเลี้ยงและการพัฒนาสายพันธุ์ปลาโพงและกลุ่มปลาที่มีสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดต่อไป

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อนำไมโครแซทเทลไลท์ที่ไพรมอร์จำนวนอย่างน้อย 6 คู่ไพรมอร์ ที่พัฒนาได้จากงานวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาโพงในประเทศไทยด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ที่ไพรมอร์

### ขอบเขตของโครงการวิจัย

นำไมโครแซทเทลไลท์ที่ไพรมอร์จำนวนอย่างน้อย 6 คู่ไพรมอร์ ที่พัฒนาได้จากงานวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 และคัดเลือกไมโครแซทเทลไลท์ที่ไพรมอร์จากผลงานวิจัยในกลุ่มที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอย่างน้อย 10 คู่ไพรมอร์ ไปตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของปลาโพงในประเทศไทย

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. ตัวอย่างปลาโพงในการศึกษา

เก็บรวบรวมตัวอย่างปลาโพงจากกลุ่มแม่น้ำโขง จำนวน 4 จังหวัดซึ่งถือเป็นตัวแทนของปลาโพงในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดหนองคาย จังหวัดนครพนม จังหวัดมุกดาหาร และจังหวัดอุบลราชธานี จำนวนแหล่งละ 25 ตัว รวมทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง ด้วยการซื้อจากเกษตรกรหรือชาวประมงจากแหล่งต่างๆ โดยเก็บรักษาตัวอย่างปลาโพงใน Absolute ethanol (Kirby, 1990)

#### 2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาโพงในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

##### 2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปลาโพง

ตัดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อปลาโพงให้มีน้ำหนักประมาณ 25 mg ใส่ลงในหลอด microcentrifuge แล้วเติม Lysis buffer 500 ul (50 mM Tri-Cl, 50mM EDTA, pH 8.0), 0.125 เปอร์เซ็นต์ (w/v) SDS, 20 mg/ml proteinase K) เพื่อให้ย่อยโปรตีนที่อยู่ในเนื้อเยื่อ นำไปต้มใน waterbath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จึงกำจัดโปรตีนและเศษเซลล์ออกโดยการเติม phenol:chloroform: isoamyl alcohol mixture ปริมาตร 500ul พลิกหลอดเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที หากยังไม่แยกชั้นสมบูรณ์ให้นำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก

ครั้ง ดูดชั้นบน (aqueous phase) จากนั้น สกัดซ้ำด้วย chloroform ลงไป 500 ul แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บชั้นบน ประมาณ 300 ul ใส่ในหลอด microcentrifuge ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม 3 M sodium acetate (pH 6.0) ปริมาตร 10 ul ร่วมกับการเติม absolute ethanol ปริมาตร 600 ul พลิกหลอดเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวออกให้หมด แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ วางหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง (ดัดแปลงจาก Sambrook and Russell, 2001) จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นหนึ่งช้อนชาหรือ TE buffer ปริมาตร 25 ul นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบและใช้งานต่อไป

## 2.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

### 1) Agarose gel electrophoresis

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยเครื่อง horizontal electrophoresis (OWL EasyCast™ Horizontal System Model B1, Portsmouth, NH USA) ด้วย 0.8% agarose gel (GenePure LE Agarose (ISO BIO EXPRESS, Spain) ผ่านสารตัวกลาง 1X TAE Buffer โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอประมาณ 1ul ผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 1 ul ให้เข้ากันแล้วหยอดลงในหลุมบนแผ่นเจลสำหรับแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ทำการปล่อยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วย Gel star Nucleic Acid Gel Stain (LONZA, Rockland, ME USA) ประมาณ 10 นาที ตรวจสอบดูลักษณะและขนาดของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอได้โดยการหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/HindIII Marker (Fermentas, USA.) ปริมาตร 3 ul ร่วมด้วย ทำการบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation System (Sygene, INC., UK) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์คุณภาพและปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมกับการนำไปใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอต่อไป

### 2) Spectrophotometer

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Spectrophotometer, UV/VIS typ, Beckman Coulter™ Model DU 530, USA.) โดยทำการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการหาความเข้มข้นด้วยจำนวนเท่าการเจือจาง (dilution factor) 100 เท่า โดยการนำสารละลายดีเอ็นเอ 5 ul ผสมกับน้ำกลั่นบริสุทธิ์หนึ่งช้อนชาหรือ 495 ul ภายในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการย้ายใส่ cuvette แล้วนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260 nm และ 280 nm โดยใช้ น้ำกลั่นหนึ่งช้อนชาหรือเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากสมการ

$$\text{OD ratio} = A_{260}/A_{280}$$

เมื่อ  $A_{260}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ,  $A_{280}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน

ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอพิจารณาจาก (สิรินดา, 2541)

OD ratio น้อยกว่า 1.65 แสดงว่า ดีเอ็นเอมีโปรตีนปนเปื้อน

OD ratio ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ เหมาะที่จะนำไปใช้งานต่อไป

OD ratio มากกว่า 1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอมีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (ug/ml) =  $A_{260} \times 50$  (ug/ml) x dilution factor

เมื่อ สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 50 ug/ml จะวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 1.0 บันทึก

ข้อมูลความเข้มข้นและความบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์คุณภาพและปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมกับการนำไปใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอต่อไป

### 2.3 การเพิ่มชิ้นส่วนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทดสอบความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์

จำนวน 15 คู่ไพรเมอร์ ซึ่งได้จากการพัฒนาขึ้นโดย ศิริภาวี่ และคณะ (2552) จำนวน 6 คู่ ได้แก่ PC1, PC3, PC4, PC13, PC14 และ PC15 และไพรเมอร์ที่ได้จาก นภาพร และคณะ (2551) จำนวน 11 คู่ ได้แก่ Pg-2, Pg-3, Pg-6, Pg-16, Pg-17, Pg-20, PSP-G505, PSP-G507, PSP-G509, PSP-G576 และ PSP-G579 ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ปริมาณการทำปฏิกิริยา 10 ul จะประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อปลาโมงความเข้มข้น 100 ng/ul ปริมาตร 1ul, 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.3 @ 25°C) (NEW ENGLAND BioLabs Inc.,USA.) ปริมาตร 1 ul, 1mM dNTPs (QIAGEN, Germany) ปริมาตร 2 ul, 5 uM/ul Forward และ Reverse primer ปริมาตรอย่างละ 1 ul, 5 U Taq DNA polymerase (NEW ENGLAND BioLabs Inc.,USA.) ปริมาตร 0.1 ul และ sterile deionized water ปริมาตร 3.9 ul จากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ (Thermal Cycle with combi block, Biometra T gradient, UPS, UK.) ที่อุณหภูมิและเวลาดังนี้

เริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, primer annealing โดยอุณหภูมิขึ้นกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 เป็นเวลา 45 วินาที, primer extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาทีและสิ้นสุดด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาทำการเติม Denature loading dye (40 mM Urea, 15 mM Sucrose,

0.5% Bromophenol Blue, 0.5% Xylene Cyanol,) ปริมาตร 3 ul ผสมให้เข้ากันแล้วทำการ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที นำไปตรวจสอบไมโครเซทท์ไลท์ที่เอ็นเอต่อไป

**ตารางที่ 1.** ไมโครเซทท์ไลท์ไพรเมอร์ของปลาโงจำนวน 6 คู่

| Primer | Clone    | Sequence (5'----->3') | Tm('C) |
|--------|----------|-----------------------|--------|
| PC1-F  | Clone 2  | TTTGTGCCTGAACACCTCTC  | 60     |
| PC1-R  |          | GACATTTGGAGCTGTGAGAG  | 60     |
| PC3-F  | Clone 3  | CACAGTGATGACTTACACAGG | 62     |
| PC3-R  |          | ATAGTGACAGAGGGAGAGTG  | 60     |
| PC4-F  | Clone 3  | TTTGACACTCTCCCTCTGTC  | 60     |
| PC4-R  |          | AGAGACAGACACAGATGGAG  | 60     |
| PC13-F | Clone 27 | AGTCTACTGTTGAGGGTAGG  | 60     |
| PC13-R |          | GTTGTCAGGAATCCTACTGC  | 60     |
| PC14-F | Clone 29 | TAATCCTCGCCTTTTGTGCC  | 60     |
| PC14-R |          | TTTGAGCTGTGAGAGTGGAG  | 60     |
| PC15-F | Clone 29 | TTTTGTGCCTCCACTCTCAC  | 60     |
| PC15-R |          | AGCCTTGTAGCATAAGCACC  | 60     |

**ที่มา :** ศิริภาวี และคณะ (2552)

**ตารางที่ 2.** ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ของปลาบึกและปลาเทโพจำนวน 10 คู่

| Primer   | Motifs               | Primer sequence (5'-3')                                   | Annealing Temperature (C) |
|----------|----------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------|
| Pg-2     | AY364901             | F: TGTGTCTAATCTTGTCCGTGCTG<br>R: TACTGTTGGACCAGACGTTCCCTC | 60                        |
| Pg-6     | AY364903             | F: CATCTCATGCCGTCATTACTGTG<br>R: AAAGTCCTAAAGGCTGCTTCAAC  | 60                        |
| Pg-3     | AY364902             | F: CCAGCCCACATTAGGTAGCATC<br>R: ACTAAAAGGCCTGACCCTTAGC    | 60                        |
| Pg-16    | AY364907             | F: TCATCTGTGCTTTTCCCTGAGAC<br>R: GATCTCATTACGGACACAAAGG   | 60                        |
| Pg-17    | AY364908             | F: AGCATGTTCTTCCTCCAACACTG<br>R: CAGCTGCTGTGAAAGGTAGTTAGC | 60                        |
| Pg-20    | AY364909             | F: TCCCACTACTCCCACCCACTTAC<br>R: TATCTCTGATTTTGCACCACAGG  | 60                        |
| PSP-G507 | (GATA) <sub>22</sub> | F:GTGGGAACACAAATGAGAATGTAA<br>R:TGAAAAGCCTTTAATGTTGACACA  | 52                        |
| PSP-G513 | (GATA) <sub>22</sub> | F:CACTCTTTCTTTTCCCTCCGTTAT<br>R:GTGAGTCGCCTTAAAAAGTGATGG  | 52                        |
| PSP-G576 | (GATA) <sub>12</sub> | F:AACTCCAAAATCCTCCCAGACTTT<br>R:GACAATTTTCATGAACACCCCTCTC | 52                        |
| PSP-G579 | (GATA) <sub>11</sub> | F:GAGAGGGGGTGAAATAATGATAGG<br>R:ATGGTTCTCCTGCAAGCAATGTCT  | 52                        |

**ที่มา :** นภาพร และคณะ (2551)

## 2.4 การตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอและการบันทึกข้อมูล

ตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยนำมาแยกขนาดโดยเครื่อง vertical electrophoresis (Mini-ProteinIII, Bio Rad, USA) ด้วย 6% denaturing polyacrylamide gel (Bio RAD, USA.) ผ่านสารละลายตัวกลาง 1M TBE buffer โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 75 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาย้อมแผ่นเจลด้วย Gel star Nucleic Acid Gel Stain (LONZA, Rockland, ME USA) ประมาณ 10 นาที จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV เปรียบเทียบขนาดไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas, USA) ทำการบันทึกภาพและขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation Sytem (Sygene, INC., UK) แล้วแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอให้อยู่ในรูป 0 หรือ 1 (binary data)

## 3. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์สภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาโพงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ด้วยพารามิเตอร์ต่างๆดังนี้

### 3.1 การคำนวณหาความถี่ของอัลลีล (Allele frequency) ของแต่ละตำแหน่ง คำนวณได้จาก

$$X_{ij} = \frac{2D + H}{2N}$$

เมื่อ  $X_{ij}$  = ความถี่อัลลีลที่  $i$  ที่โลกัส  $j$ ,  $D$  = จำนวนอัลลีลที่มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัส,

$H$  = จำนวนอัลลีลที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส และ  $N$  = จำนวนอัลลีล

### 3.2 การคำนวณหาจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (number of allele per locus, $N$ ) (Hedrick, 1985) คำนวณได้จาก

$$MNA = \frac{TNA}{N}$$

เมื่อ  $MNA$  = จำนวนอัลลีลเฉลี่ยจากทุกตำแหน่งในทุกประชากร  $TNA$  = จำนวนอัลลีลจากทุกตำแหน่งในทุกประชากร และ  $N$  = จำนวนตำแหน่ง

### 3.3 การคำนวณหาค่าเฮตเทอโรไซโกซิติ (Heterozygosity) (Nei, 1978) คำนวณได้

จาก

#### 1. ค่าเฮตเทอโรไซโกซิติที่ได้จากการสังเกต (Observed heterozygosity : $H_o$ )

$$H_o = \frac{N_H}{N}$$

เมื่อ  $H_o$  = ค่าเฮตเทอโรไซโกซิติที่ได้จากการสังเกต,  $N_H$  = จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮตเทอโรไซกัส และ  $N$  = จำนวนตัวอย่างที่ให้ข้อมูลทั้งหมด

#### 2. ค่าเฮตเทอโรไซโกซิติคาดหวัง (Expected heterozygosity : $H_e$ )

$$H_e = 1 - \sum_{i=1} P_i^2$$

เมื่อ  $H_e$  = ค่าเฮตเทอโรไซโกซิติคาดหวัง,  $P_i$  = ค่าความถี่อัลลีลใดๆ ที่โลกัสนั้น และ  $n$  = จำนวนของอัลลีล

### 3.4 การคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance, $D$ )

ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance,  $D$ ) เป็นค่าที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร คำนวณโดยนำค่าความถี่อัลลีลของแต่ละโลกัสมาวิเคราะห์ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมด้วยวิธี Nei72 (Nei, 1978) ด้วยโปรแกรม NTSYSpc V 2.10 ตามสูตร

$$D_{ij} = \ln_{cvs} \left[ \sum_k \right]$$

### 3.5 การทดสอบ Hardy-Weinberg Equilibrium

ทดสอบความถี่ในไทป์ในแต่ละตำแหน่งของแต่ละประชากรว่า มีความสอดคล้องกับ Hardy-weinberg equilibrium หรือไม่ โดยการประมาณค่า Exact  $p$ -value ด้วยวิธี Markov chain ตามวิธีการของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization: 1000, Batches: 1000, Iterations per batch: 1000) ในโปรแกรม GENEPOP version 4.0.10 (Raymond and Rousset, 1995a) และปรับระดับความน่าจะเป็น ( $p$ -value) สำหรับการให้ข้อมูลชุดเดิมวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (Multiple test) ด้วย Bonferroni correction (Hochberg, 1988; Rice, 1989)

### 3.6 การทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากร (Differentiation between populations)

ทดสอบความถี่อัลลีลของแต่ละประชากรว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยการประมาณค่า  $P$ -value ด้วยวิธี Markov chain (Raymond and Rousset, 1995b) (Dememorization: 1000, Batches: 1000, Iterations per batch: 1000) ในโปรแกรม GENEPOP version 4.0.10 (Raymond and Rousset, 1995a) และปรับระดับความน่าจะเป็น ( $P$ -value) สำหรับการใช้ข้อมูลชุดเดิมวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (Multiple test) ด้วย Bonferroni correction (Hochberg, 1988; Rice, 1989)

### 3.7 การจัดแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การจำแนกกลุ่มของประชากรปลาโพงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยนำค่าเฉลี่ยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาโพง โดยการนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้ในข้อ 3.5.5 มาจัดสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Dendrogram) ระหว่างกลุ่มประชากรปลาโพงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Arithmetic Mean) (Sneath and Sokal, 1973) ด้วยโปรแกรม TFGA Version 1.3 (Miller, 1997)

### 3.8 การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient) (Wright, 1978)

ค่าสัมประสิทธิ์เอฟเป็นที่นิยมใช้กันมากในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างประชากรโดยใช้ตรวจสอบการแยกเป็นคนละประชากร หรือเปรียบเทียบระหว่างประชากรย่อยที่รวมเป็นประชากรใหญ่ก็ได้ ค่าที่จะแสดงถึงการเบี่ยงเบนหรือลดลงของเฮตเทอโรไซโกซิตีหรือบางครั้งอาจเรียกว่าเป็นค่าสัมประสิทธิ์ของการผสมเลือดชิด ทำการทดสอบว่าประชากรที่ศึกษามีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อยหรือไม่ โดยพิจารณาจากค่า  $F_{IS}$   $F_{ST}$   $F_{IT}$  เพื่อวัดค่าความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากรย่อย โดยคำนวณตามวิธีของ Nei (1978) ดังนี้

$$F_{IS} = \frac{H_s - H_0}{H_s}$$

$$H_s$$

เมื่อ  $H_0$  = ค่าเฉลี่ยของค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตของทุกประชากรย่อย และ

$H_s$  = ค่าเฉลี่ยของค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีคาดหวังของทุกประชากรย่อย

ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีภายในประชากรย่อย ได้แก่ การคัดพันธุ์โดยมนุษย์หรือการคัดพันธุ์โดยธรรมชาติ การขาดช่วงทางพันธุกรรม (Genetic drift) การกลาย (อุทัยรัตน์ ฅ นคร, 2543) การผสมเลือดชิด การผสมพันธุ์ที่ไม่เป็นแบบสุ่ม และการที่ประชากรแบ่งเป็นประชากรย่อย (สิรินดา ยุ่นฉลาด, 2541) ทำให้ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีลดลงหรือเพิ่มขึ้นก็ได้ ค่า  $F_{ST}$  จึงอาจมีค่าบวกหรือลบระหว่าง 1 ถึง +1

$F_{ST}$  ใช้ประมาณค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรย่อย คือ วัดอัตราการผสมเลือดชิดภายในประชากรย่อย เปรียบเทียบกับประชากรทั้งหมด (Total population)

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

เมื่อ  $H_S$  = ค่าเฉลี่ยของค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีคาดหมายของทุกประชากรย่อย

และ  $H_T$  = ค่าเฉลี่ยของค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีคาดหมายของประชากรรวมทั้งหมด

ค่า  $F_{ST}$  ใช้วัดความเบี่ยงเบนระหว่างประชากรย่อยเปรียบเทียบกับประชากรรวมทั้งหมด ความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยเกิดจากความแตกต่างของความถี่อัลลีลระหว่างประชากรย่อย การแบ่งประชากรใหญ่ให้เป็นประชากรย่อยมักจะทำให้ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีลดลง ค่า  $F_{ST}$  จึงมักมีค่าเป็นบวกระหว่าง 0 ถึง 1

จากการศึกษาโครงสร้างประชากรโดยค่าสัมประสิทธิ์เอฟ โดย Wright (1978) ได้ให้ความหมายของค่า  $F_{ST}$  ในแต่ละช่วงดังนี้

ค่าระหว่าง 0.00-0.05 แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย

ค่าระหว่าง 0.05-0.15 แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง

ค่าระหว่าง 0.15-0.25 แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก

ค่า 0.25 ขึ้นไป แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด

$F_{IT}$  วัดอัตราการผสมเลือดชิด หรือความเบี่ยงเบนของแต่ละตัวอย่างเปรียบเทียบกับประชากรทั้งหมด

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_0}{H_T}$$

เมื่อ  $H_0$  = ค่าเฉลี่ยของค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตของทุกประชากรย่อย

และ  $H_T$  = ค่าเฉลี่ยของค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีคาดหวังของประชากรรวมทั้งหมด

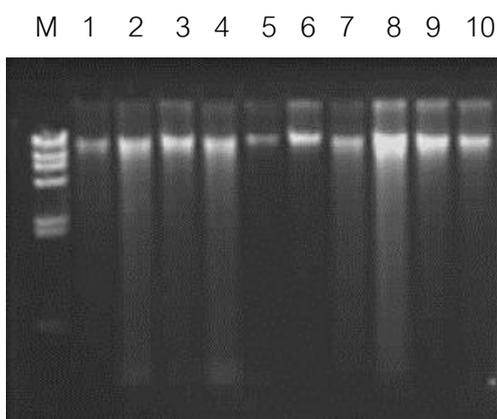
ค่า  $F_{IT}$  เป็นค่าเปรียบเทียบระหว่างแต่ละตัวอย่างเมื่อเทียบกับประชากรรวมทั้งหมดจึงมีค่าได้ตั้งแต่ -1 ถึง +1

## ผลการวิจัย

### 1. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

ผลของการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปลาโพงด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน Phenol-Choroform Extraction (Sambrook and Russell, 2001) แล้วทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel พบว่าจีโนมดีเอ็นเอของปลาโพงที่ได้จากการสกัดมีคุณภาพดี มีแถบคมชัด ไม่ฉีกขาด เนื่องจากทำการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อเยื่อปลาโพงด้วยการใช้เอ็นไซม์ Proteinase K แทนการบดเนื้อเยื่อปลาโพงให้ละเอียด และจีโนมดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 23 Kb เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/*HindIII* Marker

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 nm และ 280 nm แล้วทำการคำนวณค่าความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อปลาโพงจากจังหวัดหนองคาย จังหวัดนครพนม จังหวัดมุกดาหาร และจังหวัดอุบลราชธานี มีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 1.468-1.893 แสดงว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์เหมาะที่จะนำไปใช้งานต่อไป (สิรินดา, 2541) ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อปลาโพงจากจังหวัดอุบลราชธานีมีค่าเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 722.6 ng/ul และค่าเฉลี่ยสูงสุดในจังหวัดหนองคายโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1,043 ng/ul ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 1 และ 2



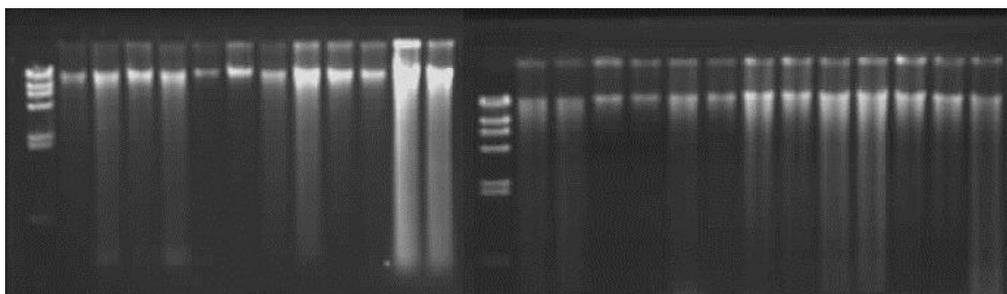
ภาพที่ 1. จีโนมดีเอ็นเอของปลาโพง

หมายเหตุ: M คือ Lambda DNA/*HindIII* Marker, เลขที่ 1-10 คือตัวอย่างดีเอ็นเอของปลาโพงจากจังหวัดมุกดาหาร

ตารางที่ 3. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

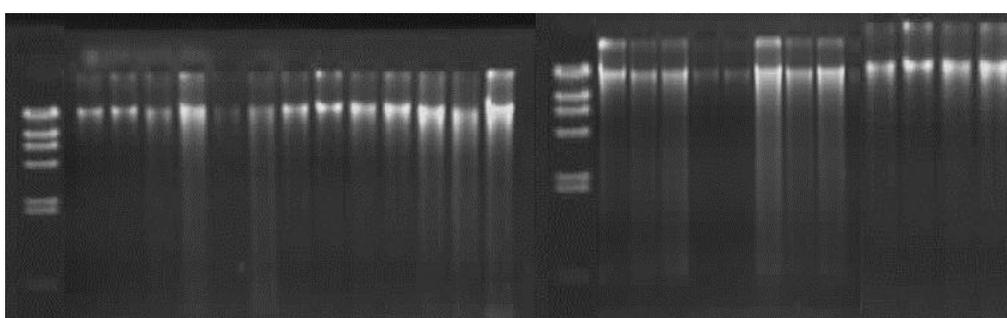
| แหล่งที่มา<br>ของปลา<br>โมง | ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง |        | ค่าความ<br>บริสุทธิ์<br>ของดีเอ็นเอ | ความเข้มข้นของดี<br>เอ็นเอ (ng/ul) |           | หมายเหตุ                             |
|-----------------------------|-----------------------|--------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------|--------------------------------------|
|                             | 260 nm                | 280 nm |                                     | ค่าต่ำสุด-<br>ค่าสูงสุด            | ค่าเฉลี่ย |                                      |
| หนองคาย                     | 0.110-                | 0.066- | 1.650-                              | 550-                               | 1,043     | Dilution<br>factor<br>เท่ากับ<br>100 |
| นครพนม                      | 0.616                 | 0.365  | 1.843                               | 3,080                              | 787.4     |                                      |
| มุกดาหาร                    | 0.101-                | 0.013- | 1.652-                              | 505-                               | 774.8     |                                      |
| อุบลราชธานี                 | 0.340                 | 0.191  | 1.843                               | 1,700                              | 722.6     |                                      |
|                             | 0.047-                | 0.028- | 1.468-                              | 235-                               |           |                                      |
|                             | 0.603                 | 0.330  | 1.893                               | 3,015                              |           |                                      |
|                             | 0.099-                | 0.055- | 1.662-                              | 495-                               |           |                                      |
|                             | 0.324                 | 0.195  | 1.841                               | 1,620                              |           |                                      |

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25



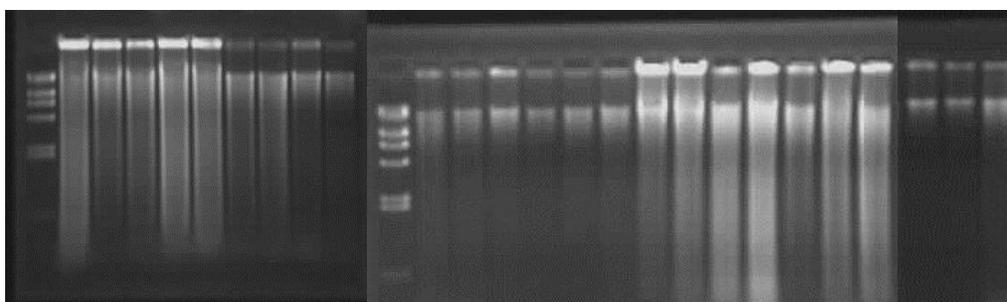
MD (1-25)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25



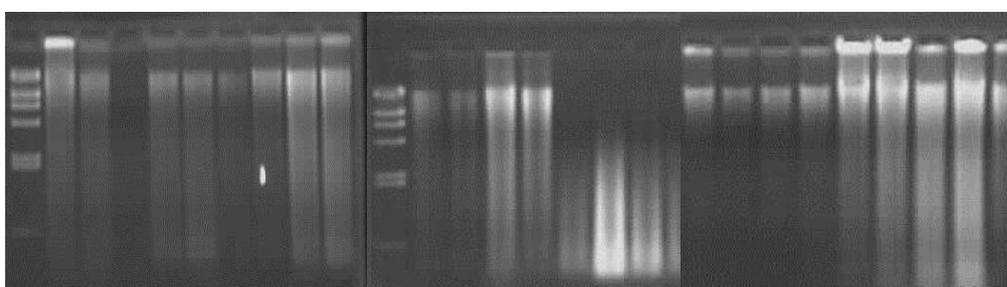
NP (1-25)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 M 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25



UB (1-25)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 M 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25



NK (1-25)

## ภาพที่ 2. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างปลาโมง

MD=มุกดาหาร, NP=นครพนม, UB=อุบลราชธานี, NK=หนองคาย, M= Lamb DNA/*HinIII* Marker (Fermentas, USA.)

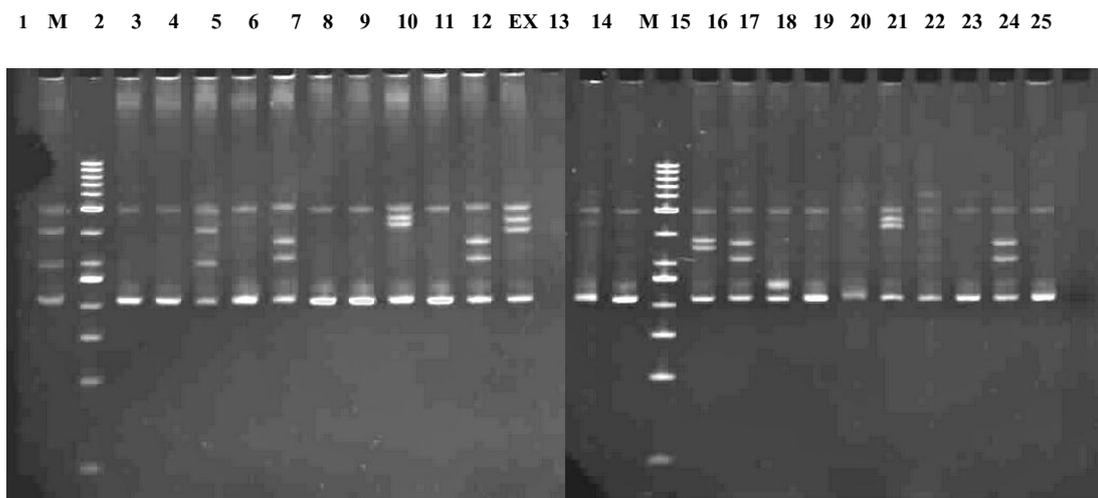
## 2. การศึกษาความหลากหลายของปลาโพงด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

### 2.1 ความถี่อัลลีลของตัวอย่างประชากรปลาโพงในประเทศไทย

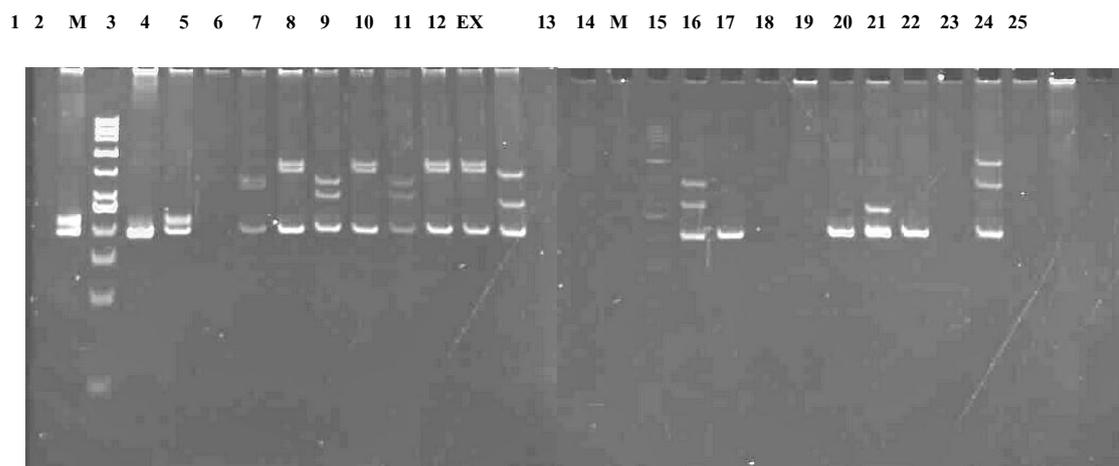
จากการศึกษาความหลากหลายของตัวอย่างประชากรปลาโพงในประเทศไทย 4 ประชากร ได้แก่ ประชากรปลาโพงจากจังหวัดหนองคาย จังหวัดนครพนม จังหวัดมุกดาหาร และจังหวัดอุบลราชธานี ประชากรละ 25 ตัว รวมทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง คือ PC3, PC13, PC14, PG2 และ PG20 โดยที่ตำแหน่ง PC3 พบจำนวนอัลลีล 5 อัลลีล (ขนาด 200-249) ตำแหน่ง PC13 พบจำนวนอัลลีล 6 อัลลีล (ขนาด 118-140) ตำแหน่ง PC14 พบจำนวนอัลลีล 5 อัลลีล (ขนาด 200-249) ตำแหน่ง PG2 พบจำนวนอัลลีล 3 อัลลีล (ขนาด 258-276) และตำแหน่ง PG20 พบจำนวนอัลลีล 3 ตำแหน่ง (ขนาด 206-210) ความถี่อัลลีลของแต่ละตำแหน่งในแต่ละประชากรแสดงไว้ในตารางที่ 4 และภาพที่ 3,4 และ 5 สำหรับตัวอย่างในตำแหน่ง PC3, PC13 และ PG20 ตามลำดับ

ตารางที่ 4. แสดงความถี่อัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง ในประชากรปลาโพง 4 ประชากร

| อัลลีล      | NK   | NP   | MH   | UB   |
|-------------|------|------|------|------|
| <b>PC3</b>  |      |      |      |      |
| N           | 25   | 25   | 25   | 25   |
| 211         | 0.97 | 0.92 | 0.93 | 0.79 |
| 224         | 0.00 | 0.07 | 0.00 | 0.06 |
| 233         | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.08 |
| 235         | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.04 |
| 237         | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 0.02 |
| 239         | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| <b>PC13</b> |      |      |      |      |
| 125         | 0.29 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| 134         | 0.29 | 0.27 | 0.23 | 0.31 |
| 138         | 0.12 | 0.16 | 0.10 | 0.14 |
| 143         | 0.06 | 0.14 | 0.23 | 0.25 |
| 148         | 0.10 | 0.14 | 0.10 | 0.08 |
| 156         | 0.12 | 0.16 | 0.19 | 0.10 |
| <b>PC14</b> |      |      |      |      |
| 204         | 0.20 | 0.04 | 0.25 | 0.46 |
| 210         | 0.29 | 0.23 | 0.52 | 0.20 |
| 224         | 0.20 | 0.50 | 0.10 | 0.32 |
| 238         | 0.11 | 0.15 | 0.10 | 0.00 |
| 250         | 0.18 | 0.06 | 0.02 | 0.02 |
| <b>PG2</b>  |      |      |      |      |
| 248         | 0.76 | 0.96 | 0.84 | 0.84 |
| 258         | 0.12 | 0.00 | 0.06 | 0.04 |
| 276         | 0.12 | 0.04 | 0.09 | 0.10 |
| <b>PG20</b> |      |      |      |      |
| 208         | 0.76 | 0.43 | 0.31 | 0.45 |
| 212         | 0.10 | 0.26 | 0.31 | 0.27 |
| 221         | 0.05 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 229         | 0.07 | 0.30 | 0.37 | 0.27 |



NK (1-25)

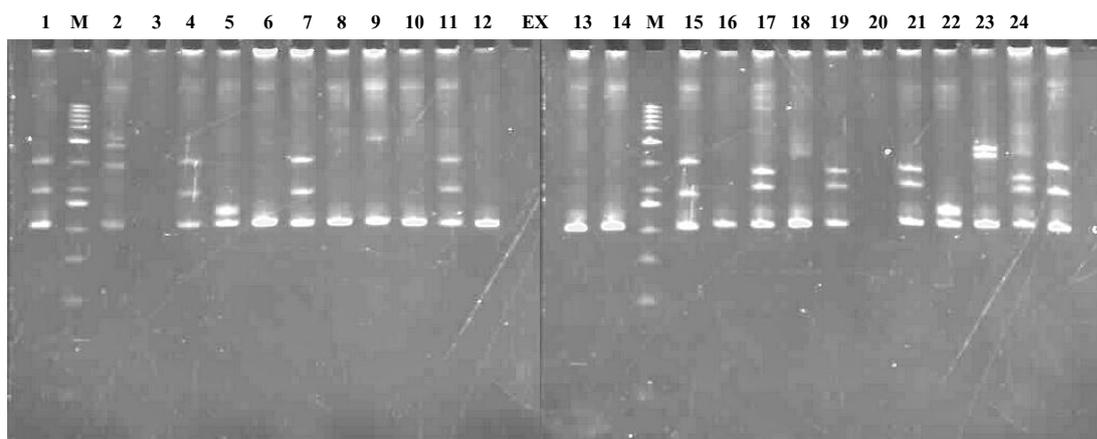


NP (1-25)

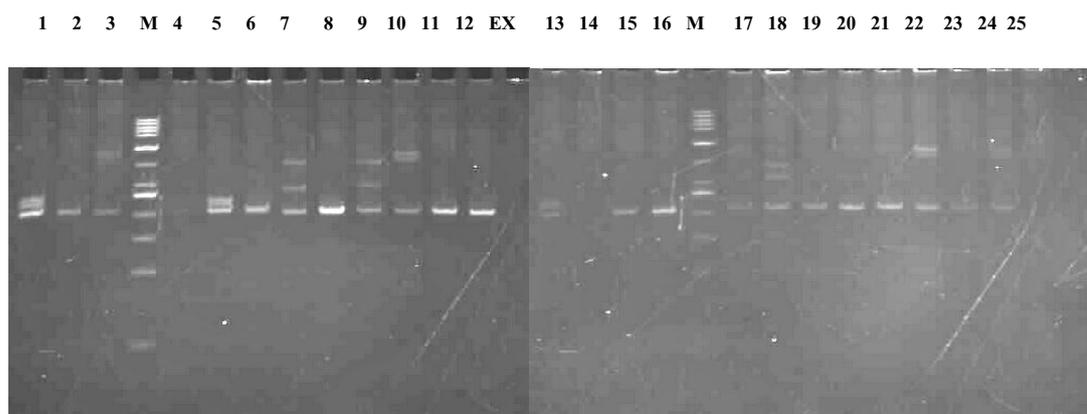
ภาพที่ 3. การศึกษาความหลากหลายของปลาโพงด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ไพรมเมอร์ PC3

NK = หนองคาย, NP = นครพนม, MD = มุกดาหาร, UB = อุบลราชธานี

M = Gene Ruler<sup>TM</sup> 50 bp DNA Ladder (Fermentas, USA)



MD (1-25)

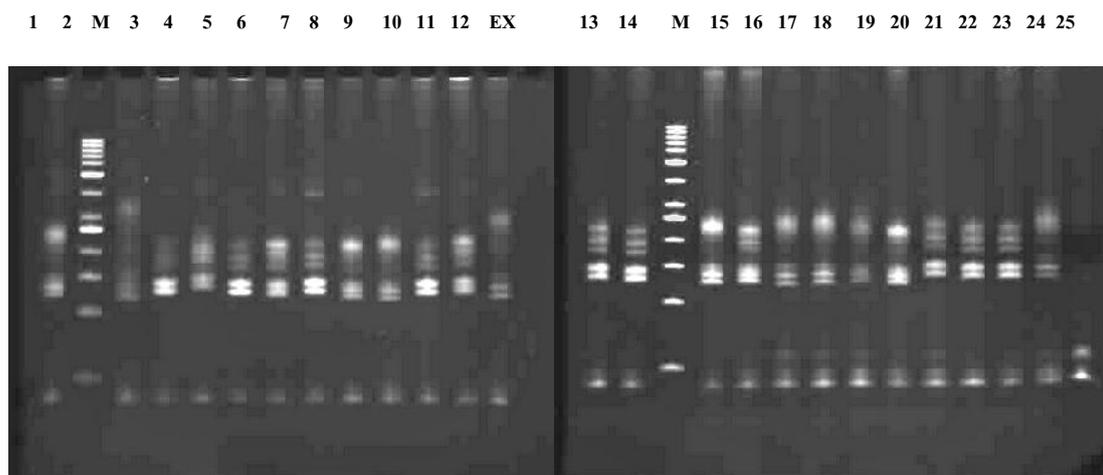


UB (1-25)

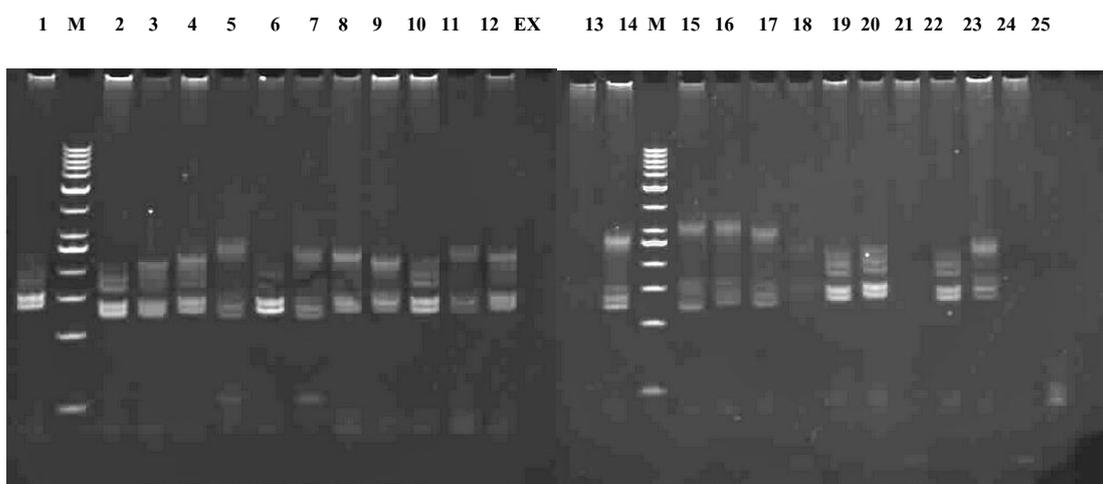
ภาพที่ 3. การศึกษาความหลากหลายของปลาโพงด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ที่ไพรเมอร์ PC3 (ต่อ)

NK = หนองคาย, NP = นครพนม, MD = มุกดาหาร, UB = อุบลราชธานี

M = Gene Ruler<sup>TM</sup> 50 bp DNA Ladder (Fermentas, USA)



NK (1-25)



NP (1-25)

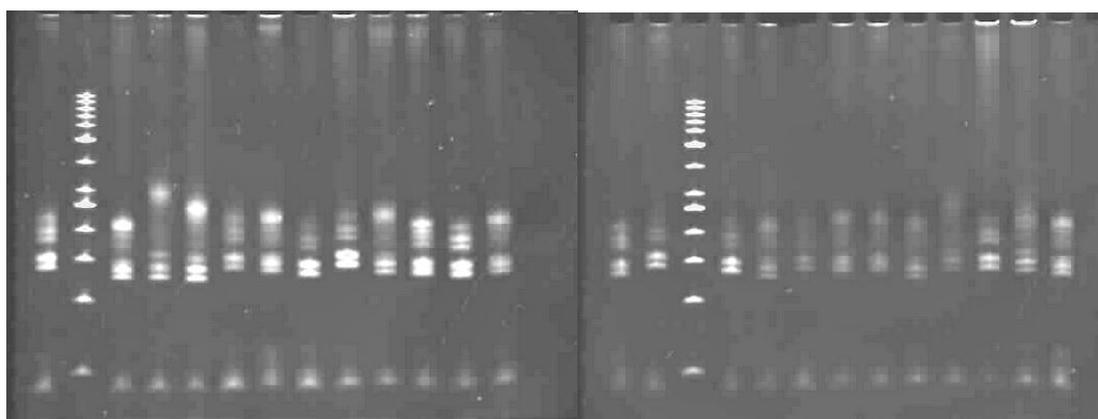
**ภาพที่ 4.** การศึกษาความหลากหลายของปลาโม่งด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ไพรมเมอร์ PC13  
 NK = หนองคาย, NP = นครพนม, MD = มุกดาหาร, UB = อุบลราชธานี  
 M = Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas, USA)

1 M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 EX      13 14 M 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25



**MD (1-25)**

1 M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 EX      13 14 M 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

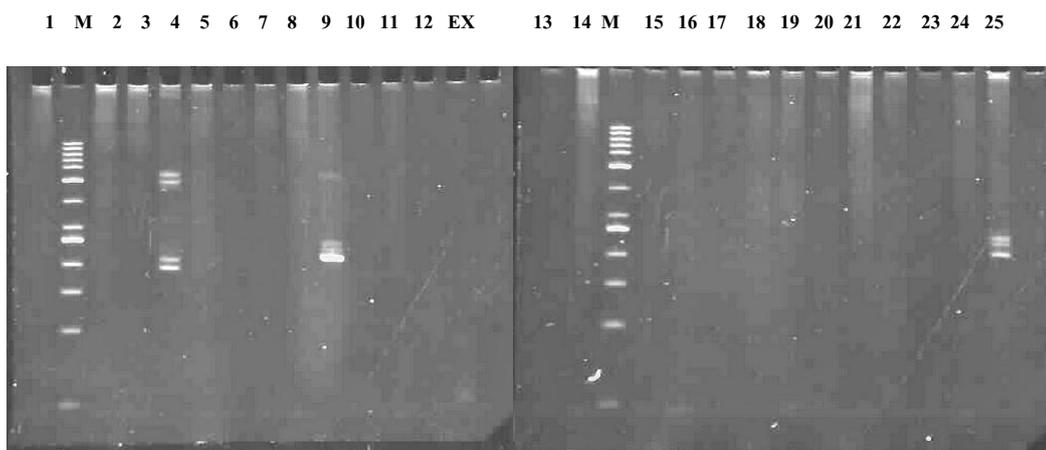


**UB (1-25)**

**ภาพที่ 4.** การศึกษาความหลากหลายของปลาโม่งด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ที่ไพรเมอร์ PC13 (ต่อ)

NK = หนองคาย, NP = นครพนม, MD = มุกดาหาร, UB = อุบลราชธานี

M = Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas, USA)



NK (1-25)

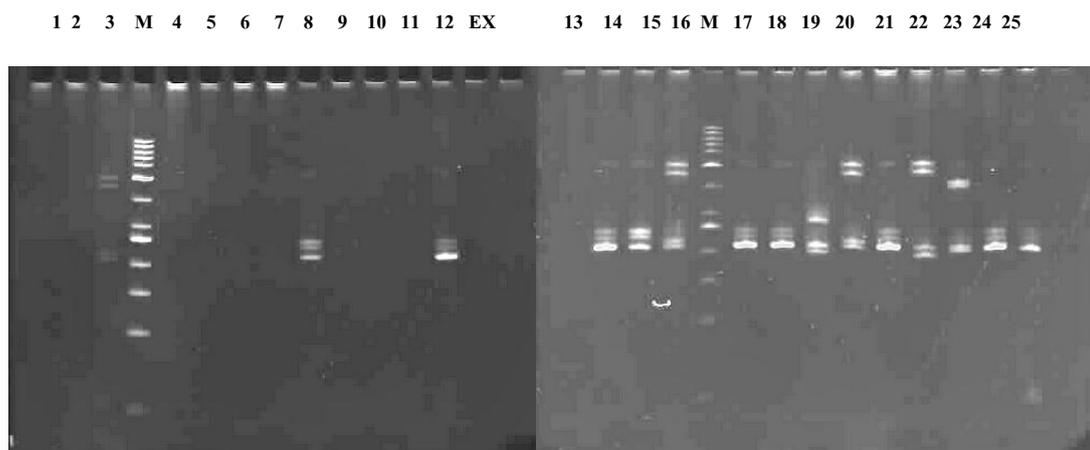


NP (1-25)

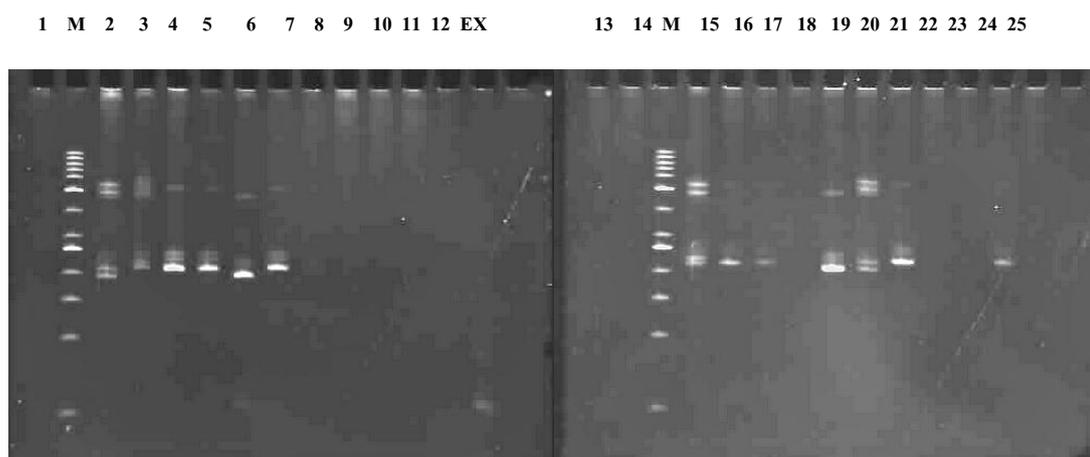
ภาพที่ 5. การศึกษาความหลากหลายของปลาโม่งด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ไพรมเมอร์ PG20

NK = หนองคาย, NP = นครพนม, MD = มุกดาหาร, UB = อุบลราชธานี

M = Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas, USA)



MD (1-25)



UB (1-25)

ภาพที่ 5. การศึกษาความหลากหลายของปลาโม่งด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์ไพรมเมอร์ PG20 (ต่อ)

NK = หนองคาย, NP = นครพนม, MD = มุกดาหาร, UB = อุบลราชธานี

M = Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas, USA)

## 2.2 จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง

จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งในตัวอย่างประชากรปลาโง่งในประเทศไทย 4 ประชากร มีค่าดังนี้ ประชากรปลาโง่งจากจังหวัดหนองคาย (NK = 4.0) นครพนม (NP = 3.8) มุกดาหาร (MH = 4.2) และอุบลราชธานี (UB = 4.4) โดยมีค่าเฉลี่ยจากทุกประชากรเท่ากับ 4.1 ดังแสดงในตารางที่ 5

## 2.3 Effective number of allele ( $n_e$ )

Effective number of allele ในตัวอย่างประชากรปลาโง่งในประเทศไทย 5 ประชากร มีดังนี้ ประชากรปลาโง่งจากจังหวัดหนองคาย (NK = 2.71) นครพนม (NP = 2.71) มุกดาหาร (MH = 2.72) และอุบลราชธานี (UB = 2.66) โดยมีค่าเฉลี่ยจากทุกประชากรเท่ากับ 2.70 แสดงในตารางที่ 6

## 2.4 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี

ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีเป็นค่าที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในตัวอย่างประชากรปลาโง่งในประเทศไทย 4 ประชากร โดยค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตี ( $H_o$ ) และค่าคาดหวังเฮตเทอโรไซโกซิตี ( $H_e$ ) แสดงไว้ในตารางที่ 7 จากการศึกษาพบว่าค่าคาดหวังเฮตเทอโรไซโกซิตีมีค่าอยู่ระหว่าง 0.48-0.55 และค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตีอยู่ระหว่าง 0.48-0.60 ค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตีส่วนใหญ่มีค่าสูงกว่าค่าคาดหวังเฮตเทอโรไซโกซิตี

**ตารางที่ 5.** แสดงจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งในตัวอย่างประชากรปลาโง่งในประเทศไทย 4 ประชากร

| ประชากร | ตัวอย่าง | จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง |      |      |     |      | จำนวนอัลลีลเฉลี่ย |
|---------|----------|-----------------------|------|------|-----|------|-------------------|
|         |          | PC3                   | PC13 | PC14 | PG2 | PG20 |                   |
| NK      | 25       | 2                     | 6    | 5    | 3   | 4    | 4.0               |
| NP      | 25       | 2                     | 6    | 5    | 2   | 4    | 3.8               |
| MH      | 25       | 3                     | 6    | 5    | 3   | 4    | 4.2               |
| UB      | 25       | 5                     | 6    | 4    | 3   | 4    | 4.4               |
|         | 25       |                       |      |      |     |      | 4.1               |

ตารางที่ 6. แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง Effective number of allele ( $n_e$ ) จากตัวอย่างประชากรปลาโมงในประเทศไทย 4 ประชากร

| ประชากร | ตัวอย่าง | Effective number of allele ( $n_e$ ) |      |      |      |      | ค่าเฉลี่ย<br>$n_e$ |
|---------|----------|--------------------------------------|------|------|------|------|--------------------|
|         |          | PC3                                  | PC13 | PC14 | PG2  | PG20 |                    |
| NK      | 25       | 1.04                                 | 4.62 | 4.60 | 1.64 | 1.65 | 2.71(1.75)         |
| NP      | 25       | 1.15                                 | 5.48 | 2.97 | 1.08 | 2.85 | 2.71(1.79)         |
| MH      | 25       | 1.13                                 | 5.31 | 2.80 | 1.38 | 2.97 | 2.72(1.66)         |
| UB      | 25       | 1.56                                 | 4.76 | 2.82 | 1.36 | 2.81 | 2.66(1.35)         |
|         | 25       |                                      |      |      |      |      | 2.70               |

ตารางที่ 7. แสดงค่าเฉลี่ยค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตี ( $H_o$ ) และค่าคาดหมายเฮตเทอโรไซโกซิตี ( $H_e$ ) จากตัวอย่างประชากรปลาโมงในประเทศไทย 4 ประชากร

| ประชากร | ตัวอย่าง | ค่าเฉลี่ย  |            |
|---------|----------|------------|------------|
|         |          | $H_o$      | $H_e$      |
| NK      | 25       | 0.48(0.32) | 0.49(0.32) |
| NP      | 25       | 0.52(0.40) | 0.48(0.35) |
| MH      | 25       | 0.50(0.36) | 0.51(0.30) |
| UB      | 25       | 0.60(0.28) | 0.55(0.22) |
|         | 25       | 0.53       | 0.51       |

## 2.5 การทดสอบ Hardy-Weinberg Equilibrium

การทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กด้วยวิธี Markov chain และปรับระดับความน่าจะเป็นด้วย Bonferroni correction (ตารางที่ 8) พบว่าตำแหน่ง PC3 มีประชากรปลาโพงจากนครพนม มุกดาหาร และอุบลราชธานี ที่มีความถี่ในไทป์ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ส่วนประชากรปลาโพงจากหนองคาย ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าได้ ตำแหน่ง PC13 สามารถวิเคราะห์ค่าได้ในประชากร หนองคาย เพียงประชากรเดียวซึ่งพบว่ามีความถี่ในไทป์อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ส่วนประชากรปลาโพงจาก นครพนม มุกดาหาร และอุบลราชธานีมีความถี่ในไทป์ไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก โดยเบี่ยงเบนไปในทางที่มีเฮตเทอโรไซโกตมากกว่าที่คาดหมาย ตำแหน่ง PC14 สามารถวิเคราะห์ค่าได้ในประชากร จังหวัดหนองคาย เพียงประชากรเดียวซึ่งพบว่ามีความถี่ในไทป์อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ส่วน ประชากรปลาโพงจาก นครพนม มุกดาหาร และอุบลราชธานีมีความถี่ในไทป์ไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์ เบิร์ก โดยเบี่ยงเบนไปในทางที่มีเฮตเทอโรไซโกตมากกว่าที่คาดหมาย ตำแหน่ง PG2 สามารถวิเคราะห์ ค่าได้ในประชากรจังหวัดหนองคาย นครพนม มุกดาหาร และอุบลราชธานี ที่มีความถี่ในไทป์ในสมดุล ฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก สำหรับตำแหน่ง PG20 สามารถวิเคราะห์ค่าได้ในประชากรจังหวัดหนองคาย นครพนม มุกดาหาร และอุบลราชธานี ที่มีความถี่ในไทป์ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

ตารางที่ 8. แสดงการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ในประชากรปลาโพง 4 ประชากร

| ประชากร | p-value              |                      |                      |                      |                      |
|---------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|         | PC3                  | PC13                 | PC14                 | PG2                  | PG20                 |
| NK      | -                    | 0.4184 <sup>ns</sup> | 0.0090 <sup>ns</sup> | 0.7796 <sup>ns</sup> | 0.0583 <sup>ns</sup> |
| NP      | 1.0000 <sup>ns</sup> | 0.0000 <sup>*</sup>  | 0.0053 <sup>*</sup>  | 1.0000 <sup>ns</sup> | 0.1135 <sup>ns</sup> |
| MH      | 1.0000 <sup>ns</sup> | 0.0249 <sup>*</sup>  | 0.0005 <sup>*</sup>  | 0.1112 <sup>ns</sup> | 0.0236 <sup>ns</sup> |
| UB      | 1.0000 <sup>ns</sup> | 0.0000 <sup>*</sup>  | 0.0008 <sup>*</sup>  | 0.4243 <sup>ns</sup> | 0.0610 <sup>ns</sup> |

หมายเหตุ: ns คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

\* คือ  $p < 0.0025$  (Bonferroni correction) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

- คือ คำนวณไม่ได้

## 2.6 การทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากร

เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากรด้วยวิธี Markov chain 6 คู่ประชากรปรับระดับความน่าจะเป็นด้วย Bonferroni correction ( $P < 0.004$ ) พบว่าคู่ประชากรที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรที่ไม่โครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง PC3 มีจำนวน 1 คู่ประชากร ได้แก่ อุบลราชธานี-หนองคาย ที่ตำแหน่ง PC14 มีจำนวน 4 คู่ประชากร ได้แก่ มุกดาหาร-นครพนม อุบลราชธานี-หนองคาย อุบลราชธานี-นครพนม และอุบลราชธานี-มุกดาหาร และที่ตำแหน่ง PG20 มีจำนวน 3 คู่ประชากร ได้แก่ นครพนม-หนองคาย มุกดาหาร-นครพนม และอุบลราชธานี-หนองคาย ส่วนตำแหน่ง PC13 และ PG2 ทุกประชากรไม่มีความแตกต่างระหว่างประชากร และเมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากรทุกตำแหน่งด้วย Fisher's method พบว่ามีความแตกต่างระหว่างประชากรเช่นเดียวกับในตำแหน่ง PC3, PC14 และ PG20 (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9. แสดงการทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากรปลาโงในประเทศไทย 4 ประชากร

| คู่ประชากร | p-value               |                       |                       |                       |                       |                        |
|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
|            | PC3                   | PC13                  | PC14                  | PG2                   | PG20                  | ทุกตำแหน่ง             |
| NP-NK      | 0.09917 <sup>ns</sup> | 0.24611 <sup>ns</sup> | 0.00811 <sup>ns</sup> | 0.00896 <sup>ns</sup> | 0.00074 <sup>*</sup>  | 0.000012 <sup>*</sup>  |
| MH-NK      | 0.36173 <sup>ns</sup> | 0.08141 <sup>ns</sup> | 0.03308 <sup>ns</sup> | 0.64881 <sup>ns</sup> | 0.00000 <sup>*</sup>  | Highly sign.           |
| MH-NP      | 0.06323 <sup>ns</sup> | 0.84219 <sup>ns</sup> | 0.00006 <sup>*</sup>  | 0.08798 <sup>ns</sup> | 0.47989 <sup>ns</sup> | 0.000460 <sup>*</sup>  |
| UB-NK      | 0.00148 <sup>*</sup>  | 0.07327 <sup>ns</sup> | 0.00029 <sup>*</sup>  | 0.44332 <sup>ns</sup> | 0.00263 <sup>*</sup>  | 0.000001 <sup>*</sup>  |
| UB-NP      | 0.10541 <sup>ns</sup> | 0.71994 <sup>ns</sup> | 0.00000 <sup>*</sup>  | 0.09699 <sup>ns</sup> | 0.96481 <sup>ns</sup> | Highly sign.           |
| UB-MH      | 0.08351 <sup>ns</sup> | 0.83017 <sup>ns</sup> | 0.00020 <sup>*</sup>  | 0.91484 <sup>ns</sup> | 0.37617 <sup>ns</sup> | 0.006366 <sup>ns</sup> |

หมายเหตุ: ns คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

\* คือ  $p < 0.0025$  (Bonferroni correction) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

Highly sign มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

## 2.7 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาโงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 4 ประชากรมีค่าอยู่ระหว่าง 0.0489-0.0953 โดยประชากรปลาโงที่มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด ได้แก่ ประชากรจังหวัดมุกดาหารกับประชากรจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.0489 และประชากรที่มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุด ได้แก่ ประชากรจังหวัดหนองคายกับประชากรจังหวัดอุบลราชธานีมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.0953 (ตารางที่ 10)

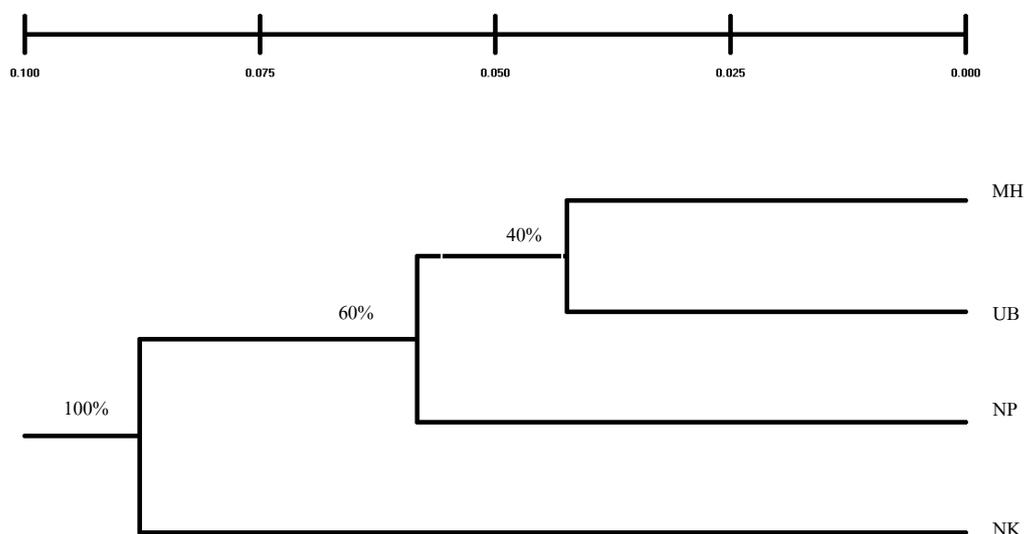
ตารางที่ 10. ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาโพง 4 ประชากร

|    | NK     | NP     | MH     | UB |
|----|--------|--------|--------|----|
| NK | -      | -      | -      | -  |
| NP | 0.0760 | -      | -      | -  |
| MH | 0.0772 | 0.0595 | -      | -  |
| UB | 0.0953 | 0.0490 | 0.0489 | -  |

### 2.8 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

จากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรปลาโพงทั้ง 4 ประชากรสามารถ นำมาจัดแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA ได้ดังภาพที่ 6

จากแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าประชากรปลาโพงที่นำมาศึกษาในครั้งนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยประชากรจังหวัดหนองคาย ส่วนกลุ่มที่สองเป็นประชากรจังหวัดนครพนม มุกดาหาร และอุบลราชธานี



ภาพที่ 6. แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA

จากภาพที่ 6 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA ของประชากรปลาโพง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่จำแนกกลุ่มโดยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ (เปอร์เซ็นต์ที่แสดง หมายถึง จำนวนร้อยละของซ้ำที่จุดแยก (node) นี้จะปรากฏเหมือนเดิมจากการสุ่ม 1,000 ครั้ง)

## 2.9 ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient)

ผลของการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์เอฟแสดงดังตารางที่ 4.8 ค่าความแตกต่างของ อัลลีลภายในประชากร ( $F_{IS}$ ) มีค่าอยู่ในช่วง -0.01623-0.1320 พบโลกัสที่มีค่า  $F_{IS}$  เป็นลบในโลกัส PC3, PC13, PG2 และ PG20 โดยมีค่าเท่ากับ -0.0919, -0.1623, -0.0171 และ -0.0599 ตามลำดับ แสดงว่าโลกัสดังกล่าวมีค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตสูงกว่าค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีคาดหมาย และพบโลกัสที่มีค่า  $F_{IS}$  เป็นบวกในโลกัส PC14 โดยมีค่าเท่ากับ 0.1320 แสดงว่าโลกัสดังกล่าวมีค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตต่ำกว่าค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีคาดหมาย เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยทุกตำแหน่งมีค่าเท่ากับ -0.0379

ค่าความแตกต่างของอัลลีลของประชากรทั้งหมด ( $F_{IT}$ ) มีค่าอยู่ระหว่าง -0.1537-0.2143 พบโลกัสที่มีค่า  $F_{IT}$  เป็นลบในโลกัส PC3 และ PC13 โดยมีค่าเท่ากับ -0.0446 และ -0.1537 ตามลำดับ แสดงว่าโลกัสดังกล่าวมีค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตสูงกว่าค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีคาดหมาย และพบโลกัสที่มีค่า  $F_{IT}$  เป็นบวกในโลกัส PC14 PG2 และ PG20 โดยมีค่าเท่ากับ 0.2143 0.0048 และ 0.0119 ตามลำดับ แสดงว่าโลกัสดังกล่าวมีค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตต่ำกว่าค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีคาดหมาย เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยทุกตำแหน่งมีค่าเท่ากับ 0.0145 แสดงให้เห็นว่าประชากรปลาโพงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีแนวโน้มที่จะมีค่าโฮโมไซโกตมากกว่าค่าคาดหมาย ซึ่งสอดคล้องกับค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตีดังกล่าว

จากการศึกษาโครงสร้างประชากรโดยค่าสัมประสิทธิ์เอฟ โดย Wright (1978) ได้ให้ความหมายของค่า  $F_{ST}$  ในแต่ละช่วงดังนี้

ค่าระหว่าง 0.00-0.05 แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย

ค่าระหว่าง 0.05-0.15 แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง

ค่าระหว่าง 0.15-0.25 แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก

ค่า 0.25 ขึ้นไป แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด

ค่าความแตกต่างของอัลลีลระหว่างประชากร ( $F_{ST}$ ) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0074-0.0948 และมีค่าเฉลี่ยทุกตำแหน่งมีค่าเท่ากับ 0.0505 แสดงดังตารางที่ 4.8 ผลที่ได้สามารถนำมาทดสอบค่าเฉลี่ยของค่า  $F_{ST}$  ด้วยวิธี Bootstrapping ที่ความเชื่อมั่น 95% ได้เนื่องจากมีจำนวนไพรเมอร์ มีจำนวนเพียงพอ จึงสามารถยืนยันได้ว่าประชากรที่ศึกษาแบ่งออกเป็นประชากรย่อยจริง

ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีภายในประชากรได้แก่ การคัดพันธุ์โดยมนุษย์หรือการคัดพันธุ์ทางธรรมชาติ การขาดช่วงทางพันธุกรรม (Genetic drift) การกลาย (อุทัยรัตน์, 2543) การผสมเลือดชิด การผสมพันธุ์ที่ไม่เป็นแบบสุ่ม และการที่ประชากรแบ่งเป็นประชากรย่อย (สิรินดา, 2541) ทำให้ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีลดลงเป็นผลทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงตามไปด้วยเช่นกัน

จากการศึกษาโครงสร้างประชากรโดยค่าสัมประสิทธิ์เอฟ โดย Wright (1978) เมื่อพิจารณาค่า  $F_{ST}$  ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.0505 แสดงว่า โครงสร้างประชากรปลาโพงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ทำการศึกษามีความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง ซึ่งสอดคล้องกับค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณได้อยู่ในช่วง 0.0489-0.0953 และแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาโพงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มประชากรที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ ประชากรปลาโพงจากจังหวัดนครพนม มุกดาหาร และอุบลราชธานี กลุ่มประชากรปลาโพงที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกลุ่มอื่นๆ มากที่สุด คือ ประชากรปลาโพงจากจังหวัดหนองคาย

ตารางที่ 11. ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient)

| ตำแหน่ง   | $F_{IS}$       | $F_{ST}$      | $F_{IT}$      |
|-----------|----------------|---------------|---------------|
| PC3       | -0.0919        | 0.0434        | -0.0446       |
| PC13      | -0.1623        | 0.0074        | -0.1537       |
| PC14      | 0.1320         | 0.0948        | 0.2143        |
| PG2       | -0.0171        | 0.0215        | 0.0048        |
| PG20      | -0.0599        | 0.0678        | 0.0119        |
| ค่าเฉลี่ย | <b>-0.0379</b> | <b>0.0505</b> | <b>0.0145</b> |

## สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาความหลากหลายของตัวอย่างประชากรปลาโพงในประเทศไทย 4 ประชากร ได้แก่ ประชากรปลาโพงจากจังหวัดหนองคาย นครพนม มุกดาหาร และอุบลราชธานี ประชากรละ 25 ตัว รวมทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพโรมอร์ 5 ตำแหน่งคือ PC3, PC13 และ PC14 (ศิริภาวี และคณะ, 2552) PG2 และ PG20 (นภาพร และคณะ, 2551) โดยที่ตำแหน่ง PC3 พบจำนวนอัลลิล 6 อัลลิล (ขนาด 211-239) ตำแหน่ง PC13 พบจำนวนอัลลิล 6 อัลลิล (ขนาด 125-156) ตำแหน่ง PC14 พบจำนวนอัลลิล 5 อัลลิล (ขนาด 204-250) ตำแหน่ง PG2 พบจำนวนอัลลิล 3 อัลลิล (ขนาด 248-276) และ PG20 พบจำนวนอัลลิล 4 อัลลิล (ขนาด 208-229) ซึ่งจำนวนอัลลิลทั้ง 5 ตำแหน่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดอัลลิลอ้างอิง ความถี่อัลลิลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถบอกได้ว่าตัวอย่างปลาโพงที่สุ่มเก็บมาในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรปานกลาง ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้ถือเป็นตัวแทนของประชากรของปลาโพงในประเทศไทยเนื่องจากเป็นปลาที่มีการเจริญเติบโตและแพร่กระจายได้ดีที่สามารถพบได้ตามลุ่มทางเดินแม่น้ำโขงเป็นหลักเท่านั้น ลุ่มน้ำอื่นๆ มีการสุ่มเก็บตัวอย่างแต่ไม่สามารถทำการรวบรวมตัวอย่างปลาโพงจากธรรมชาติได้

การศึกษาจำนวนอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่งมีค่าอยู่ในช่วง 3.8-4.4 อัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่งมีค่าต่ำสุดพบในประชากรปลาโพงจังหวัดนครพนม และค่าเฉลี่ยสูงสุดพบในประชากรปลาโพงจังหวัดอุบลราชธานี โดยมีค่าเฉลี่ยจากทุกตำแหน่งทุกประชากรเท่ากับ 4.1 อัลลิลต่อตำแหน่งถือได้ว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ในระดับปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ 75 ตำแหน่ง ในปลาน้ำจืด 13 ชนิด ซึ่งมีค่าอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่งเท่ากับ 7.5 (De Woody and Avise, 2000) อย่างไรก็ตามค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้โดยตรงเนื่องจากตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ที่ศึกษาในปลาแต่ละชนิดนั้นแตกต่างกัน และถึงแม้จะใช้ไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่งเดียวกัน ความหลากหลายของไพโรมอร์ที่ได้ก็จะแตกต่างกันไป ดังนั้น การเปรียบเทียบกันก็เพื่อเป็นเกณฑ์ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ศึกษานั้นเป็นอย่างไร ซึ่งจากการเปรียบเทียบจะเห็นได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปลาโพงในประเทศไทยที่อยู่ในระดับปานกลางซึ่งถือเป็นหลักฐานทางการศึกษาอีกอย่างหนึ่งที่ใช้ในการพยากรณ์กลุ่มของประชากรปลาโพงในประเทศไทยเพื่อเป็นสัญญาณบ่งบอกถึงความคลาดเคลื่อนทางพันธุกรรมสัตว์น้ำ ที่ต้องมีการระวังเพื่อไม่ให้เกิดการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ในปลาครอบครัวเดียวกัน ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดลักษณะด้อยของคุณภาพเนื้อ และระบบสืบพันธุ์ได้ในอนาคต ส่วนการศึกษาค่า Effective number of allele เป็นจำนวนอัลลิลที่นำค่าความถี่มาพิจารณาด้วย โดยมีค่าเท่ากับจำนวนอัลลิลที่มีความถี่เท่ากัน ซึ่งสามารถให้สัดส่วนเฮตเทอโรไซโกตเท่าเดิม (Kimura and Crow, 1964) ในปลาโพง 4 ประชากร พบว่าค่า Effective number of allele มีค่าเท่ากับ 2.70 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าจำนวนอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่งที่

4.1 ซึ่งค่าที่ต่ำเนื่องจากบางอัลลีลที่พบในประชากรมีความถี่อัลลีลต่ำ rare allele โอกาสในการสูญเสีย rare allele ในประชากรจึงมีสูง ถ้าเกิดสภาพคอขวดขึ้นในประชากร โดยเฉพาะในประชากรปลาที่ได้จากโรงเพาะฟักที่ใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อยในการเพาะพันธุ์จะพบว่าในรุ่นลูกนั้นมีอัลลีลที่พบในรุ่นพ่อแม่พันธุ์หายไปบางส่วนซึ่งโดยส่วนใหญ่พบว่าเป็น rare allele โดยจะส่งผลทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรลดลงได้ (Norris et al., 1999; Xu et al., 2001; Hara and Sekino, 2003)

จากการศึกษาค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีพบว่า ค่าคาดหมายเฮตเทอโรไซโกซิตีมีค่าอยู่ระหว่าง 0.48-0.55 ซึ่งจังหวัดนครพนมมีค่าต่ำสุดคือ 0.48 ในขณะที่เดียวกันจากผลการทดลองพบว่าค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตีอยู่ระหว่าง 0.48-0.60 ซึ่งจังหวัดหนองคายมีค่าต่ำสุดคือ 0.48 ค่าเฉลี่ยสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตีมีค่าเท่ากับ 0.53 ซึ่งมีค่าสูงกว่าในปลาน้ำจืด 13 ชนิด ในขณะที่ DeWoody and Avise (2000) ศึกษาไว้เท่ากับ 0.46 ค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตีของปลาโพงที่ศึกษาในครั้งนี้มีค่าสูงกว่าค่าคาดหมายเฮตเทอโรไซโกซิตี เมื่อทดสอบสมมติฐานฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ทั้ง 4 ประชากร คือ หนองคาย นครพนม มุกดาหาร และอุบลราชธานี นอกจากนี้ไพรมอร์ที่นำมาใช้ในการศึกษาสามารถนำมาวิเคราะห์ข้อมูลได้ 5 ไพรมอร์ ซึ่งถือว่าเพียงพอกับการนำมาใช้ในการศึกษา เพราะถ้าศึกษาน้อยตำแหน่งอาจจะได้ข้อมูลที่ไม่สะท้อนถึงความเป็นจริงของประชากร ในทางทฤษฎีจึงควรใช้ตำแหน่งมากตำแหน่งเท่าที่จะเป็นไปได้โดยตำแหน่งที่มีความหลากหลายของอัลลีลสูงจะมีความสามารถในการแยกแยะความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่าตำแหน่งที่มีความหลากหลายของอัลลีลต่ำ (อุทัยรัตน์ และวงศ์ปฐม, 2551)

การศึกษาโครงสร้างประชากรโดยค่าสัมประสิทธิ์เอฟ โดย Wright (1978) พบว่าค่าความแตกต่างของอัลลีลระหว่างประชากร ( $F_{ST}$ ) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0074-0.0948 และมีค่าเฉลี่ยทุกตำแหน่งมีค่าเท่ากับ 0.0505 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมในประชากรปานกลาง

ซึ่งระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาโพงมีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปลาแม่น้ำ เช่น ปลา *European grayling* ( $F_{ST} = 0.394$ ) (Gum et al., 2003) *Brown trout* ( $F_{ST} = 0.279$ ) (Estoup et al., 1993) *Bull trout* ( $F_{ST} = 0.659$ ) (Spruell et al., 2003) *Cutthroat trout* ( $F_{ST} = 0.121$ ) (Wenburg et al., 1998) Jarabugo ( $F_{ST} = 0.112$ ) (Salgueiro et al., 2003) และมีค่าใกล้เคียงกับปลา *Salmo salar* ( $F_{ST} = 0.057$ ) (Norris et al., 1999) *Steelhead (Oncorhynchus mykiss)* ( $F_{ST} = 0.05$ ) (Nielsen, 1999) *Chinook salmon* ( $F_{ST} = 0.039$ ) (Beacham et al., 2003) *Brycon opalinus* ( $F_{ST} = 0.0432$ ) (Barroso et al., 2005) และปลา *Trout* ( $F_{ST} = 0.02$ ) (Nielsen et al., 1999) อย่างไรก็ตามค่า  $F_{ST}$  จากการศึกษาต่างๆ อาจไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง แม้นจะใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดเดียวกันก็ตาม เนื่องจากการเก็บตัวอย่างอาจครอบคลุมระยะทางภูมิศาสตร์แตกต่างกันทำให้ผลการศึกษาแตกต่างกันไป ค่า  $F_{ST}$  ที่คำนวณได้นั้น

อาจไม่ใช่ค่าที่ถูกต้องนัก เป็นเพียงข้อสรุปเบื้องต้นเท่านั้น เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีน้อยเกินไปมีเพียงพื้นที่ละ 25 ตัวอย่าง อาจจะไม่ใช้ตัวแทนทั้งหมดของตัวอย่างพื้นที่นั้นๆ จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีความสำคัญมากที่จะทำให้การศึกษามีความน่าเชื่อถือเพียงไร โดยทั่วไปถ้าความถี่อัลลีลในประชากรมีค่ามากกว่าหรือ เท่ากับ 0.05 ต้องเก็บตัวอย่างอย่างน้อย 50 ตัวอย่าง/ประชากรจึงจะสามารถตรวจพบอัลลีลนี้ได้ (ด้วยค่าความน่าจะเป็น 95%) (อุทัยรัตน์ และคณะ, 2551) ซึ่งอาจทำให้ได้ข้อมูลที่ไม่สะท้อนสภาพความเป็นจริงของประชากร นอกจากนี้จำนวนโพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลที่ได้มีเพียง 5 คู่โพรเมอร์เท่านั้นที่สามารถทดสอบค่าเฉลี่ยของค่า  $F_{ST}$  ด้วยวิธี Bootstrapping ได้ และสามารถยืนยันได้ว่าประชากรที่ทำการศึกษามีการกระจายตัวออกเป็นประชากรย่อยได้จริง

การสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) โดยใช้โปรแกรม TFPGA version 1.3 พบว่า ประชากรปลาโพงที่ศึกษาในครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรก คือ ประชากรปลาโพงจังหวัดหนองคาย มีค่า Bootstrap เท่ากับ 100% ส่วนกลุ่มที่สอง เป็นประชากรจังหวัดนครพนม มุกดาหาร และอุบลราชธานี มีค่า Bootstrap เท่ากับ 60% ซึ่งทั้งสองกลุ่มมีความสัมพันธ์สอดคล้องกันตามสภาพทางภูมิศาสตร์ โดยกลุ่มแรกคือ จังหวัดหนองคายอยู่ในแม่น้ำสายเดียวกันกับกลุ่มประชากรปลาโพงจังหวัดนครพนม มุกดาหาร และอุบลราชธานี แต่ระยะทางทางภูมิศาสตร์ของจังหวัดหนองคายที่มีระยะทางที่ไกลมากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มประชากรหลังที่ค่อนข้างจะอยู่ใกล้กันเมื่อดูระยะทางทางภูมิศาสตร์ซึ่งอาจจะทำให้ประชากรปลาโพงสามารถถ่ายเทพันธุกรรมระหว่างประชากรได้จึงทำให้พันธุกรรมใกล้เคียงกัน ข้อมูลที่ได้เป็นการสรุปเบื้องต้นเท่านั้น เนื่องจากค่า Bootstrap ส่วนใหญ่มีเพียง 40% และ 50% เท่านั้น ซึ่งมีค่าน้อย สุรินทร์ (2552) กล่าวว่า การทดสอบความเชื่อมั่นของ Tree ที่ได้จะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ตัวเลขที่ได้จากการทำ Bootstrap จะอยู่บนกิ่งของ Tree กิ่งใดมีค่าสูง (80-90%) แสดงว่าการจัดกลุ่มของ Taxon ที่อยู่รวมกันในกลุ่มนั้นมีความน่าเชื่อถือหรือความเป็นไปได้สูง ถ้าค่าของ Bootstrap ของกิ่งใดต่ำกว่า 50% แสดงว่าการจัดกลุ่มของ Taxon ที่อยู่รวมกันในกลุ่มนั้นอาจยังไม่ถูกต้อง หรือมีข้อมูลไม่เพียงพอควรศึกษาเพิ่มเติมหรือหาข้อมูลมาประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือมากขึ้น

### ข้อเสนอแนะการวิจัย

1. ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างปลาโมงมากขึ้นเพื่อให้ผลการทดลองที่แม่นยำมากขึ้น
2. ควรเพิ่มจำนวนคู่ไพรมอร์ในการทดสอบให้มากขึ้น และต้องเป็นไพรมอร์ที่พัฒนามาจากปลาในกลุ่มที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม เพื่อจะได้ผลการทดลองที่แม่นยำมากขึ้น
3. การเก็บตัวอย่างหากทิ้งไว้เป็นเวลานาน จะทำให้สกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณน้อยลง และมีคุณภาพต่ำ
4. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมจากงานวิจัยครั้งนี้ เพื่อให้สามารถจัดกลุ่มประชากรได้ และเป็นประโยชน์ต่อการจัดการระบบเพาะเลี้ยง และการจัดการพ่อแม่พันธุ์ต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. 2546. การผลิตและการพัฒนากุ้งกุลาดำในประเทศไทย. รายงานการประชุมวิชาการ ประมง ประจำปี พ.ศ. 2546. กรมประมง. หน้า 17-32.
- กัณฑ์รีย์ เจริญทวี. 2550. ความหลากหลายทางไมโครแซทเทลไลท์พันธุกรรมในประชากรกุ้ง ก้ามกรามจากโรงเพาะฟักและธรรมชาติ. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 66 หน้า
- กำธร โพธิ์ทองคำ. 2541. ชีววิทยาของปลาหมอไทย. แผนกทดลองและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ กองบำรุงพันธุ์สัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: [ม.ป.พ.].
- ชวลิต วิทยานนท์. 2544. ปลาน้ำจืด. สำนักพิมพ์นานมีบุ๊คส์ กรุงเทพมหานคร. 116 หน้า.
- วิชัย บุญแสง, อัญชลี ทศนาจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรา สิทธิดิถรัตน์ และสกล พันธุ์ ยิ้ม. 2541. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ... จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ
- วิวัฒน์ ปวารมภ์ และชัยศิริ ศิริกุล. 2538. การเพาะและอนุบาลลูกปลาโพง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 23/2538. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดเชียงราย กองประมงน้ำจืด กรมประมง. 82 หน้า.
- นภาพร ศรีพุฒินิพนธ์, ทิพย์สุดา ต่างประโคน, วงศ์ปฐม กมลรัตน์, และสพรรณ ชันน้ำเที่ยง. 2551. โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ. วารสารการประมง. หน้า 222-230.
- ปาริชาติ ศรีจำเริญ. 2547. การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างไก่พื้นเมืองไทย (Gallus gallus domesticus) ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์-พีซีอาร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า
- ศรีจรรยา สุขมนิมนต์. 2546. การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพโรเมอร์สำหรับปลาดุกขุยและการประยุกต์เพื่อการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 105 หน้า
- ศรีรัตน์ สอดสุข. 2547. การวิเคราะห์ความเป็นพ่อแม่ลูกของกุ้งกุลาดำโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 2/2547. กรมประมง สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ. 23 หน้า

- สุดาวัลย์ ศรีไพโรจน์. 2546. การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ที่โพรเมอร์ในปลากัด, *Betta splendens* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 105 หน้า
- อมรา คัมภีรานนท์. 2542. พันธุศาสตร์มนุษย์. บริษัทแท็กซี่ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.
- อัญชลี ทัศนชาจร เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต และอุทัยรัตน์ ณ นคร. 2546. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรกึ่งกุลาดำในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. วารสารวิธีวิทยาการวิจัย 16 (3) : 359-380.
- อุทัยรัตน์ ณ นคร. (2543). พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อุทัยรัตน์ ณ นคร และวงศ์ปฐม กมลรัตน์. (2551). พันธุศาสตร์ประชากรเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Aliah, R.S., M. Takagi, S. Dong, C.T. Teoh and N. Taniguchi. 1999. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio*. Fisheries Science 65(2): 235-239.
- Beckmann, J. S. and J.L. Weber. 1992. Survey of human and rat microsatellites. Genomics 12: 627-631.
- Brooker, A.L., D. Cook, P. Bentzen, J.M. Wright and R.W. Doyle. 1994. Organization of microsatellite differs between mammals and cold-water teleost fishes. Can. J. Fish Aquat. Sci. 151: 1959-1965.
- Berra, T.M. 1981. An atlas of distribution Freshwater fish families of the world. Univ. of Nebraska press: 74-75.
- Chambers, G.K. and E.S. MacAvoy. 2000. Microsatellite: consensus and controversy. Comp. Biochem. Physiol. 126B: 455-476.
- Charoentawee, K., S. Poompuang and U. Na-nakorn. 2006. Isolation and characterization of microsatellites in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Molecular Ecology Notes 6 (3) :823-825.
- Cheng, H. H., 1997. Mapping the chicken genome. Poult. Sci. 76: 1101-1107.
- Cheng, H. H., I. Levin, R. L. Vallejo, H. Khatib, J. J. Dodgson, L. B. Crittenden, and J. Hillel. 1995. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. Poult. Sci. 74: 1855-1874

- Crooijmans, R. P. M. A., A. B. F. Groen, A. J. Van Kampen, S. V. D. Beek, J. J. Vander Poel, and M. A. m. Groenen. 1996a. Microsatellites polymorphism in commercial broiler and layer lines estimated using pools blood sample. *Poult. Sci.* 75: 904-909.
- Crooijmans, R. P. M. A., P. A. M. van Oers, J. A. Van der Poel, And M. A. M. Groenen. 1996b. Preliminary linkage map of the chicken (*Gallus domesticus*) genome based on microsatellite markers: 77 new markers mapped. *Poult. Sci.* 75: 746-754.
- Crooijmans, R. P. M. A. A. B. F. Groen, A. J. Van Kampen, S. V. D. Beek, J. J. Van der Poel, and M. A. M. Groenen. 1996c. Microsatellites polymorphism in commercial broiler and layer lines estimated using pools blood samples. *Poult. Sci.* 75: 904-909.
- Estoup, A., P. Presa, F. Krieg, D. Vaiman and R. Guyomard. 1993. (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> microsatellite : a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity* 71: 488-496.
- Fondon, J. W. III, and Garner, H. R. 2004. Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1010:18058-18063
- Garcia de Leon, F.J., J.F. Dallas, B. Chatain, M. Canonne, J.J. Versini and F. Bonhomme. 1995. Development and use of microsatellite markers in sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Perciformes : Serranidae). *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 4(1): 62-68.
- Galbusera, P., F.A. Volckaert, B. Hellemans and F. Ollevier. 1996. Isolation and characterization of microsatellite markers in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Molecular Ecology* 5: 703-705.
- Gupta, P.K., H.S. Balyan, P.C. Sharma and B. Ramesh. 1996. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current science* 70: 45-54.
- Han, K., L. Li, G.M. Leclerc, A. M. Hays and B. Ely. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci for striped bass (*Morone saxatilis*). *Mar. Biotechnol.* 2: 405-408.
- Hedrick, P.W. 1985. *Genetics of Population*. Jones and Bartlett Publishers, Inc., USA.
- Hillel, J., T. schaap, A.Haberfeid, A. J. Jeffreys, Y. Plotzky, A. Cachaner, and U.Lavi. 1990. DNA fingerprints applied to gene introgression V. inbreeding programs. *Genet.* 124: 783-789.

- Kamonrat, W. 1996. Spatial Genetic Structure of Thai Silver Barb *Puntius gonionotus* (Bleeker) Populations in Thailand. Ph.D. Thesis, Dalhousie University.
- King, D. G. 1997. Evolutionary tuning knobs. *Endeavor* 21:36-40.
- Kirby, L.T. 1992. DNA Fingerprinting: An Introduction. W.H. Freeman and Company, New York.
- Landgraf, A. and H. Wolfes. 1993. Taq Polymerase (EC 2.7.7.7), pp. 31-58. *In* M.M. Burrell (ed.) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 16: Enzymes of Molecular Biology. Humana Press Inc., New Jersey, U.S.A.
- Liu, B. H., 1998. Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press LLC, Florida.
- Mackiewicz, M., D.E. Fletcher, S.D. Wilkins, A. Dewoodys and J.C. Avise. 2002. A genetic assessment of parentage in a natural population of dollar sunfish (*Lepomis marginatus*) based on microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 11: 1877-1883.
- May, B. and C.C. Krueger. 1990. Use of allozyme data for population analysis, pp. 157-171. *In* D.H. Whitmore, ed. *Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management*. CRC Press, Boston.
- McConnell, S.K., P. O'Reilly, L. Hamilton, J.M. Wright and P. Bentzen. 1995a. Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiation of North American and European populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 1863-1872.
- Morgan, T.S. and A.D. Rogers. 2001. Specificity and sensitivity of microsatellite markers for the identification of larvae. *Mar. Biol.* 139: 967-973.
- Morris, D.B., K.R. Richard and J.M. Wright. 1996. Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53: 120-126.
- Nei, M. 1972. Genetic Distance Between populations. *Amer. Nat.* 106: 283-292.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- O'Reilly, P.T. and J.M. Wright. 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *J. Fish Biol.* 47 (Sup. A): 29-55.
- Park, L.K. and P. Moran. 1995. Developments in molecular genetic techniques in fisheries, pp. 1-28. *In* G.R. Carvalho and T.J. Pitcher, eds. *Molecular Genetics in Fisheries*. Chapman &

- Hall, London.
- Richardson, B. J., Baverstock, P.R. and Adam, M. 1986. Allozyme electrophoresis : a handbook for animal systemics and population studies, Sydney : Academic Press.
- Roff, D.A., and Bentzen, P.1989. The ststistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: X 2 and the problems of small samples. Mol Bio Evol 6: 539-545.
- Rohlf, F. J. 1995. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistics Inc., New York. 271 p.
- Saiki, R.K. 1989. The design and optimization of the PCR, pp. 7 – 16. *In* H.A. Erlich, ed. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton press, New York.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis., 1989. Molecular cloning: A laboratory manual .2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sarkar , U.K.,P.K. Deepak , Kapoor , R. S. Negi , S.K. Paul and S. Singh. 2005. Captive breeding of climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch , 1972) with Wova – FH for conservation and aquaculture. Aquaculture Research 36 : 941-945.
- Sekino, M. and Hara, M. 2000. Genetic characteristics and relationships of climbing perch *Anabas testudineus* populations in Thailand. Fisheries Sci. 66: 840-845.
- Smith. R.R. 1945. The Fresh water Fish of Siam or Thailand. U.S. Nat. Mus. Bull. 188: 447-450.
- Takagi, M., N. Taniguchi, D.Cook and R.W. Doyle. 1997. Isolation and Characterization of Microsatellite Loci from Red Sea Bream *Pagrus major* and Detection in Closely Related Species. Fisheries Sci. 63: 199-204.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucl.Acids Res. 17: 6463-6471.
- Tyson, R.R. 1991. Systematic revistion of the asian catfish family Pangasiidae, with biological observation and description of three new speceedings of the Acedemy of Natural Sciences Philadelphia, 143:97-144.
- Usmani, S., S.G. Tan, S.S. Siraj and K. Yusoff. 2001. Isolation and characterization of microsatellites in the Southeast Asian river catfish *Mystus nemurus*. Molecular Ecology Notes 1: 264-266.
- Verstrepen, K. J., et al. 2005. Intragenic tandem repeats generate functional variability. Nat. Gen. 37:986-990.

- Vinces, M. D., et al. 2009. Unstable tandem repeats in promoters confer transcriptional evolvability. *Science* 324:1213-1216.
- Volckaert, F.A.M. and B. Hellemans. 1999. Survival, growth and selection in a communally reared multifactorial cross of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 171: 49-64.
- Wang, Z., J.L. Weber, G. Zhong and S.D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88: 1-6.
- Waldbieser, G.C. and B.G. Bosworth. 1997. Cloning and characterization of microsatellite loci in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Animal Genetics* 28: 295-298.
- Yue, G.H. and L. Orban. 2002. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. *Molecular Ecology Notes* 2, 99–100.