



วิทยานิพนธ์

การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงพันธุ์
ปลาดุกยักษ์ (*Clarias gariepinus*)

APPLICATION OF BIOTECHNOLOGY FOR
GENETIC IMPROVEMENT OF AFRICAN CATFISH
(*Clarias gariepinus*)

นางสาวอัญลักษณ์ วชิรไชยการ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. ๒๕๕๑

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อปรับปรุงพันธุ์ปลาคูยกัย (Clarias gariepinus)

Application of Biotechnology for Genetic Improvement of African Catfish
(Clarias gariepinus)

โดย

นางสาวอัญญลักษณ์ วชิรไชยการ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)
พ.ศ. 2551

อัญลักษณ์ วชิรไชยการ 2551: การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ปลาดุก
ยักษ์ (*Clarias gariepinus*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาวิชา
พันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D. 80 หน้า

ปลาดุกยักษ์ (*Clarias gariepinus*) ได้ถูกนำเข้ามาในประเทศไทยเพื่อการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ปี
พ.ศ. 2530 โดยไม่มีการจัดการพันธุกรรมที่ถูกต้อง ในปัจจุบันเกษตรกรพบว่าลักษณะที่สำคัญทาง
เศรษฐกิจของปลาดุกยักษ์ถดถอยลงมาก โดยมีความเป็นไปได้มากกว่าจะเกิดจากความเสื่อมโทรม
ทางพันธุกรรม ซึ่งมีวิธีแก้ไขวิธีหนึ่งคือการนำสายพันธุ์ที่แตกต่างกันมาผสมกัน ในการศึกษาครั้งนี้
ได้ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 6 ตำแหน่ง ศึกษาความหลากหลายทาง
พันธุกรรมของประชากรปลาดุกยักษ์ 4 ประชากร (สุพรรณบุรี อ่างทอง นครปฐม และ
นครสวรรค์) ผลการศึกษาสามารถแบ่งกลุ่มประชากรออกเป็น 2 กลุ่ม (กลุ่ม นครปฐม-นครสวรรค์
และกลุ่ม สุพรรณบุรี-อ่างทอง) ที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันชัดเจน ($F_{ST}=0.1444$) ความหลากหลาย
ทางพันธุกรรมภายในประชากรมีค่าปานกลาง ($A=4.67-12.17$; $A_e=3.15-5.80$; $A_r=4.67-9.65$;
 $H_o=0.50-0.69$; $H_e=0.67-0.80$) จึงได้คัดเลือกปลาประชากรอ่างทองและนครปฐมมาใช้ในการ
ทดลองผสมข้าม จากการศึกษาเปรียบเทียบปลาประชากรพ่อแม่กับลูกผสม พบว่าลักษณะความ
ยาวและน้ำหนักของปลาทดลองเมื่ออายุ 5, 10 และ 14 สัปดาห์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ การ
ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* (ค่า Antibody titre) ในช่วงที่ตอบสนอง
สูงสุดของปลาแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ค่าเฉลี่ย Phagocytosis activity ของลูกผสมมีค่า
สูงกว่าค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (ค่า heterosis=70.97%) ส่วนค่า Phagocytic index ไม่แตกต่างกันทาง
สถิติ นอกจากนั้นในการศึกษานี้ได้พัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ MHC class I gene ของปลาดุก
ยักษ์ขึ้นเป็นครั้งแรก และพบว่าลูกผสมมีแนวโน้มจะมีความหลากหลายของยีนนี้สูงกว่าสายพันธุ์
นครปฐมแต่ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์อ่างทอง

Anyalak Wachirachaikarn 2008: Application of Biotechnology for Genetic Improvement of African Catfish (*Clarias gariepinus*). Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Professor Uthairat Na-Nakorn, Ph.D. 80 pages.

African catfish, *Clarias gariepinus* was introduced to Thailand for aquaculture in 1987. The stocks have been maintained without proper genetic management. Currently farmers observed remarkable deterioration of economic important traits which was likely associated with genetic deterioration. One of the possible solutions is cross breeding between genetic distinct strains. The present study employed six microsatellite loci to elucidate genetic diversity of four African catfish strains in Thailand (Suphanburi, Angthong, Nakornpathom and Nakornsawan). The results revealed two distinct groups of strains (Nakornpathom-Nakornsawan and Suphanburi-Angthong group) as shown by F_{ST} of 0.1444. Genetic variation within populations was moderate ($A=4.67-12.17$; $A_e=3.15-5.80$; $A_r=4.67-9.65$; $H_o=0.50-0.69$; $H_e=0.67-0.80$). Then two genetically distinct populations were chosen (Angthong and Nakornpathom) for cross breeding. The comparison between the parental strains and reciprocal hybrids showed no difference of body weight and length through out the experiment. The specific immune response to *Aeromonas hydrophila* (Antibody titre) during the peak of response was not different among groups. Mean phagocytosis activity of the hybrid was significantly higher ($P<0.01$) than mean of parent (heterosis= 70.97%) while no difference was observed for phagocytic index. Moreover the present study developed a novel primer for the study on variation of MHC class I gene of African catfish for the first time. The study revealed that the variation of MHC class I gene of the hybrids was slightly higher than one of the parent (Nakornpathom) but not different with the other (Angthong).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. อุทัยรัตน์ ณ นคร ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ให้โอกาสในการทำงานพร้อมทั้งให้ความรู้คำแนะนำ ปรีกษา และตรวจสอบแก้ไขการทำวิทยานิพนธ์ในทุกกระบวนการให้มีสำเร็จสมบูรณ์โดยตลอด ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ และ ดร. ปิยะมา ทศนสุวรรณ กรรมการที่ปรึกษาร่วม เป็นอย่างสูงที่ให้คำแนะนำ ปรีกษา และแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วิภา หงษ์ตระกูล และ ดร. ประพศิตี ปิยะวิริยะกุล ที่ให้ความกรุณาแนะนำ และตรวจแก้วิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์กรม รังสินธุ์ คุณเพิ่มลาภ พูนเพิ่มพันธุ์ คุณธนาทิพย์ แผลมคม คุณศรีจรรยา สุขมนโนนต์ คุณเกตุณภัส ศรีไพโรจน์ คุณกิตติมา วาณิชกุล คุณณัฐพงษ์ ปานขาว คุณสุวินัย ปานขาว ที่คอยให้ความช่วยเหลือรวมทั้งอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ สำหรับการทำงานวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ และห้องปฏิบัติการ Japan International Research Center for Agricultural Science ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่อำนวยความสะดวกในการศึกษาค้นคว้าวิจัยทดลอง และขอบพระคุณฟาร์มปลาอุกยักษ์ทุกฟาร์มที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่าง

ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่และคุณตาเป็นอย่างสูงที่คอยให้คำสั่งสอน ให้การสนับสนุน ในด้านการศึกษา เป็นกำลังใจให้และเป็นแบบอย่างที่ดีมาโดยตลอด ขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ เพื่อน ๆ ณ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทุกคนที่มีส่วนร่วมในความสำเร็จของงานมา ณ ที่นี้ด้วย

อัญลัษณ์ วชิรไชยการ

เมษายน 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	11
ผลการทดลอง	22
วิจารณ์	39
สรุปและข้อเสนอแนะ	43
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	44
ภาคผนวก	55
ภาคผนวก ก	56
ภาคผนวก ข	59
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	80

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ข้อมูลการเก็บตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกยักษ์	11
2	รายละเอียดของไมโครแซเทลไลท์ไพรเมอร์ GenBank Accession number, ลำดับเบสซ้ำ, ลำดับเบสไพรเมอร์, annealing temperature และขนาดผลผลิต PCR	16
3	จำนวนตัวอย่างเฉลี่ยในแต่ละประชากร, ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง, ค่าเฉลี่ย Effective number of alleles, ค่าเฉลี่ย Allelic richness, ค่าสังเกตเฮเตอโรไซโกซิตี (H_o) และค่าคาดหวัง (H_e)	23
4	การทดสอบ Hardy-Weinberg Equilibrium ของประชากรปลาดุกยักษ์ทั้ง 4 ประชากร	25
5	การทดสอบ Genotypic disequilibrium ของประชากรปลาดุกยักษ์ทั้ง 4 ประชากร	26
6	การทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรปลาดุกยักษ์ทั้ง 4 ประชากร	27
7	ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม ของปลาดุกยักษ์ทั้ง 4 ประชากร	28
8	ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก ความยาว และอัตราการรอด ของลูกปลาดุกยักษ์ทั้ง 4 กลุ่มที่อายุ 5 สัปดาห์จากการทดลองในถังไฟเบอร์	29
9	ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก ความยาว และอัตราการรอด ของลูกปลาดุกยักษ์ทั้ง 4 กลุ่มที่อายุ 10-14 สัปดาห์จากการทดลองในกระชัง	30
10	ค่าเฉลี่ย Antibody titer และค่า %heterosis ของปลาดุกผสมภายในประชากร และระหว่างประชากรทั้ง 4 กลุ่มและกลุ่มควบคุม	31
11	ค่าเฉลี่ย %Phagocytosis activity และ %Phagocytic index ของลูกผสมทั้ง 4 กลุ่ม	33

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	ค่า No. of haplotype, No. of polymorphic sites, ค่า Average gene diversity over loci และ ค่าเฉลี่ย No. of pairwise differences ของแต่ละประชากร	35
ตารางที่ผนวกที่		
1	ความถี่อัลลีลของไมโทโครแซเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง ในประชากรปลาอุกยักษ์ 4 ประชากร	70

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี Neighbor-joining ของประชากรปลา ดุ๊กยักซ์ (เปอร์เซ็นต์ที่แสดง หมายถึง จำนวนร้อยละของซ้ำที่จุดแยก (node) นี้จะ ปรากฏเหมือนเดิมจากการสุ่ม 1,000)	28
2 กราฟค่าเฉลี่ย Antibody titer ของปลาลูกผสมภายในประชากรและระหว่าง ประชากรทั้ง 4 กลุ่ม และกลุ่มควบคุม	32
3 แผนภูมิแท่งแสดงค่า %Phagocytosis activity และ %Phagocytic index ของ ลูกผสมทั้ง 4 กลุ่มเปรียบเทียบกัน	33
4 ผลการทำ sequences alignment เปรียบเทียบความแปรผันของ MHC class I ของ ปลาดุ๊กยักซ์ทั้ง 20 haplotypes	36
ภาพผนวกที่	
1 จีโนมไทป์ของไมโครแซทเทลไลต์ในปลาดุ๊กยักซ์ทั้ง 6 ตำแหน่ง	57
2 ลักษณะการกลืนกินเชื้อโรคของ peripheral blood leukocytes (PBLs) ในแง่ของ Phagocytosis activity และ Phagocytic index	58

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ng	= nanogram (s) (10^{-9})
nm	= nanometer
N	= normal
Na ₂ CO ₃	= sodium carbonate
NaCl	= sodium chloride
NaOH	= sodium hydroxide
Na ₂ S ₂ O ₃	= sodium thiosulfate
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	= trisodium citrate
pH	= logarithm of reciprocal of hydrogen (H) ion
pmol	= picomole (s) (10^{-12})
rpm	= revolutions per minute
SDS	= sodium dodecyl sulfate
TBE	= Tris-borate EDTA buffer
TE	= Tris-EDTA buffer
TEMED	= <i>N, N, N', N'</i> -tetramethyl ethylenediamine
TNES-Urea	= Tris- NaCl- EDTA- Sodium dodesylsulfate
Tris base	= Tris (hydroxymethyl) methylamine
Tris- HCl	= Tris hydrochloride buffer

การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ปลาดุกยักษ์ (*Clarias gariepinus*)

Application of Biotechnology for Genetic Improvement of African Catfish (*Clarias gariepinus*)

คำนำ

ปลาดุกเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเป็นปลาที่เกษตรกรนิยมเลี้ยงเพื่อการค้ากันอย่างแพร่หลายมีผลผลิตภายในประเทศต่อปีสูงถึง 146,000 ตันในปี 2006 คิดเป็นมูลค่าผลผลิตเท่ากับ 3,447,488 บาทโดยประมาณ (FAO, 2006) ซึ่งนับว่าสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณผลผลิตของปลาน้ำจืดเศรษฐกิจชนิดอื่นๆและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในอดีตที่ผ่านมาได้มีการนำเข้าปลาดุกยักษ์ (*Clarias gariepinus*) ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกามายังประเทศไทยโดยผ่านทางประเทศลาว ในปัจจุบันเชื่อว่าปลาดุกยักษ์ที่เลี้ยงกันในประเทศไทยนำมาจาก 2 แหล่ง แหล่งแรกคือ เซ็นทรัล แอฟริกัน รีพับลิค เข้าประเทศไทยโดยผ่านทาง รัสเซีย เวียดนาม และลาวตามลำดับ แหล่งที่ 2 คือ อียิปต์ เข้าสู่ประเทศไทยโดยผ่านทางจีน ทั้งสองสายพันธุ์นี้มีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน และมีความเป็นไปได้ว่าขณะนี้สองสายพันธุ์อาจผสมปนกันอยู่ (Li *et al.*, 2000)

ปลาดุกยักษ์ เป็นปลาที่มีการเจริญเติบโตเร็วมาก สามารถกินอาหารได้แทบทุกชนิด มีความต้านทานโรคและทนทานต่อสภาพแวดล้อมสูง มีขนาดใหญ่เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ แต่เนื่องจากคุณภาพเนื้อไม่เป็นที่ยอมรับของคนไทย จึงมีผู้นำมาผสมข้ามกับปลาดุกอูย (สุจินต์ และคณะ, 2533) ผลปรากฏว่า ปลาดุกผสมที่ได้มีอัตราการเจริญเติบโตดีและทนทานต่อโรค เช่นเดียวกับปลาดุกยักษ์ ส่วนเนื้อมีลักษณะและรสชาติที่ดีเหมือนปลาดุกอูย ปลาดุกผสมซึ่งเรียกกันภายหลังว่า “ปลาดุกบิกอูย” จึงเป็นที่นิยมเลี้ยงของเกษตรกรมาจนกระทั่งปัจจุบัน

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเกษตรกรสังเกตว่าปลาดุกผสม มีการเจริญเติบโตและขนาดที่ลดลง มีความต้านทานโรคลดลง นอกจากนี้ ยังพบว่า ปลาดุกยักษ์ที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์มีการเจริญเติบโตต่ำกว่าเดิมมาก มีลักษณะภายนอก เช่น ลักษณะสีของลำตัวเปลี่ยนแปลงไป และความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อลดลง (เป็น การติดต่อก่อนตัว) ถึงแม้ว่าข้อสังเกตดังกล่าวอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงอาจไม่เหมาะสม แต่มีความเป็นไปได้ว่า อาจเกิดความเสื่อมโทรมทาง

พันธุกรรมขึ้นในสายพันธุ์ปลาอุกยักษ์ในประเทศไทย เนื่องจากขาดความรู้ที่ถูกต้องในการจัดการด้านพันธุกรรมของพ่อแม่พันธุ์

จากการศึกษาของ Li *et al.* (2000) พบว่ามีสายพันธุ์ปลาอุกยักษ์ในประเทศไทยมากกว่า 1 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าอาจมีแหล่งของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงกำหนดวัตถุประสงค์หลัก ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาอุกยักษ์จากฟาร์มเพาะพันธุ์ในประเทศไทย เพื่อคัดเลือกเฉพาะประชากรที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ จากนั้นได้ศึกษาผลของการผสมข้ามต่อลักษณะการเจริญเติบโตและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดุกยักษ์จากฟาร์มเพาะพันธุ์ในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาผลของการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ปลาดุกยักษ์ ที่มีพันธุกรรมแตกต่างกัน ต่อลักษณะการเจริญเติบโต อัตรารอด และลักษณะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

การตรวจเอกสาร

ปลาดุกยักษ์

ปลาดุกยักษ์ หรือปลาดุกรัสเซีย หรือปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) เป็นปลาชนิดหนึ่งที่อยู่ในครอบครัว Clariidae (Arndt *et al.*, 2003) ปลาชนิดนี้มีแหล่งกำเนิดในทวีปแอฟริกา เป็นปลาที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แข็งแรง และมีความต้านทานโรคสูง ปลาดุกยักษ์ที่เลี้ยงกันในประเทศไทยเชื่อได้นำมาจาก 2 แหล่ง แหล่งแรกคือ เซ็นทรัล แอฟริกัน รีพับลิค เข้าประเทศไทยโดยผ่านทาง รัสเซีย เวียดนาม และลาวตามลำดับ แหล่งที่ 2 คือ อียิปต์ เข้าสู่ประเทศไทยโดยผ่านทางจีน ทั้งสองสายพันธุ์นี้มีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน และมีความเป็นไปได้ว่าขณะนี้สองสายพันธุ์อาจผสมปนกันอยู่ (Li *et al.*, 2000) จากการศึกษาของ Galbusera (1997) ได้รายงานว่ปลาดุกยักษ์ในแหล่งธรรมชาติปัจจุบันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงกว่าในอดีต และยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาดุกยักษ์ในโรงเพาะฟักต่ำกว่าประชากรในแหล่งธรรมชาติ (Galbusera *et al.*, 1996; Galbusera, 1997) นอกจากนี้ Lal *et al.* (2003) รายงานว่า ปลาดุกยักษ์ในอินเดียซึ่งคาดว่ารับเข้ามาจากประเทศไทยโดยผ่านทางบังกลาเทศนั้น ประกอบด้วยปลาสองสายพันธุ์ผสมปนกันอยู่ และพบว่ามีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำจากการวิเคราะห์ Allozyme 8 ตำแหน่ง

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมและลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสัมพันธ์กับลักษณะ fitness-trait ของสัตว์ (Smouse, 1986; Britten, 1996) ซึ่งมีการยืนยันจากการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมที่เป็น neutral marker ในสัตว์น้ำ เช่น ในหอยสองฝา และปลาบางชนิด (Pongson and Zouros, 1994; Pongson and Fevolden, 1998) ความรู้ดังกล่าวนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ในการจัดการพ่อแม่พันธุ์เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ หรือในการอนุรักษ์ (Allendorf, 1986; Hedrick and Miller, 1992)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของปลา ซึ่งประชากรปลาที่มีความหลากหลายสูงมักจะมีลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจดี (Hansson and Westerberg, 2002; Anderson, 2001; David, 1998; Doyle and Herbingier, 1995) เช่น การศึกษาในกุ้ง *Penaeus stylirostris* โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (จากบริเวณ non-coding) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันกับความหลากหลายทางพันธุกรรม (Bierne *et al.*, 2000) เช่นเดียวกับการศึกษาในแมวน้ำ พบว่าน้ำหนักรวมและอัตราการรอดของลูกแมวน้ำมี

ความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันกับความหลากหลายทางพันธุกรรม (Coltman *et al.*, 1998) นอกจากนี้ Borrell *et al.* (2004) รายงานว่าค่าสเตเทอโรโซโกซิติจะแปรผกผันกับลักษณะไม่สมมาตร (fluctuating asymmetry) ในปลา Shikano and Taniguchi (2002) รายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรง (fitness – related trait) ในปลา guppy (*Poecilia reticulata*) โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซเทลไลต์พบว่า ค่าสเตเทอโรโซโกซิติมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะ fitness – related trait ซึ่งสามารถบอกถึงระดับของ inbreeding depression และลักษณะ heterosis ได้

Overturf *et al.* (2003) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในปลาเรนโบว์เทราท์ 5 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ที่มีค่าสเตเทอโรโซโกซิติสูง มีแนวโน้มจะมีค่าอัตราแลกเนื้อ (feed conversion ratio: FCR) สูง ส่วนค่า SGR (specific growth rate) สัมพันธ์ทางลบกับค่าสเตเทอโรโซโกซิติ ในขณะที่ค่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV titers) และค่าอัตราการตาย ไม่สัมพันธ์กับความหลากหลายทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตามผลสรุปจากการทดลองนี้อาจทำให้เกิดความเข้าใจผิดได้ เพราะสายพันธุ์ที่ใช้เพื่อการค้าผ่านการคัดเลือกเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโต ดังนั้นลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตก็จะดี ไม่เกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม นอกจากนี้สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือก มักจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงเป็นธรรมดา (Appleyard and Ward, 2006) จึงทำให้เข้าใจไปว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต และ FCR ที่ดี นอกจากนั้นแล้ว ค่าที่นำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ มีค่าอยู่ในช่วงแคบ (สเตเทอโรโซโกซิติมีค่าระหว่าง 0.65-0.83) และจำนวนคู่ของข้อมูลค่อนข้างน้อย

เนื่องจากจำนวนปลาคุยกัยที่นำเข้ามาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในโรงเพาะฟักมีจำนวนไม่มากนัก (small founder stock) และมีการเลี้ยงมาเป็นเวลานาน โดยอาจมีการจัดการพ่อแม่พันธุ์ที่ไม่ค่อยเหมาะสม จึงมีโอกาที่จะทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง และอาจเกิดการผสมเลือดชิด (inbreeding) ของประชากรในโรงเพาะฟักได้ ความเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ส่งผลเสียต่อลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ความต้านทานโรคลดลง (Allendorf and Phelps, 1980) เนื่องจากอัลลีลบางอัลลีลสูญหายไป โดยเฉพาะอัลลีลหายาก (rare alleles) ซึ่งมักเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค

ค่าที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรสามารถวัดได้จากค่าต่อไปนี้

1. จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (number of alleles per locus) (Hedrick, 1985)
2. ค่าเฉลี่ย effective number of alleles across loci (Kimura and Crow, 1964)
3. ค่าเฉลี่ย allelic richness ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลที่เป็นอิสระต่อจำนวนตัวอย่างต่อตำแหน่ง (Leberg, 2002)
4. ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีต่อตำแหน่งต่อ individual (Heterozygosity) หมายถึง ความถี่ของเฮเทอโรไซโกตต่อยีน 1 ตำแหน่ง ในปลาแต่ละตัว ซึ่งจะคำนวณทั้งค่าเฉลี่ยสังเกต (H_o) และค่าเฉลี่ยคาดหวัง (H_e)

H_o (observed heterozygosity) คือ สัดส่วนของเฮเทอโรไซกัสโนไทป์เฉลี่ยต่อตำแหน่ง คำนวณได้จากข้อมูลจริง

H_e (expected heterozygosity) คือ สัดส่วนของเฮเทอโรไซกัสโนไทป์เฉลี่ยต่อตำแหน่งที่ได้จากการคำนวณทางอ้อม โดยตั้งสมมติฐานว่าประชากรนั้นอยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) (Nei, 1978)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรสามารถวัดได้จากค่าต่อไปนี้

1. ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F- coefficient) เป็นค่าที่แสดงความสัมพันธ์ของอัลลีลภายในกลุ่มประชากร ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรนั้นๆ แบ่งออกเป็นประชากรย่อยหรือไม่ (Weir and Cockerham 1984; Hedrick, 1985)

F_{IS} เป็นค่าที่บอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรย่อย ซึ่งค่านี้มีทั้งค่าบวกและค่าลบ

F_{IT} เป็นค่าที่บอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรทั้งหมด

F_{ST} เป็นค่าที่วัดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรต่างๆ หากมีค่าสูงแสดงว่าตัวอย่างที่ศึกษานั้นมีการแบ่งเป็นประชากรย่อยจริง

2. ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เป็นค่าที่แสดงถึงจำนวนของอัลลีลที่ถูกแทนที่ต่อยีนหนึ่งตำแหน่ง หรือค่าที่บอกจำนวนของยีนหรือโคดอนที่มีการเปลี่ยนแปลงไปภายในยีนแต่ละตำแหน่ง หลังจากทีประชากรทั้งสองเริ่มแยกจากกัน สามารถคำนวณได้จากค่า genetic identity โดยค่า

ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรที่อยู่ใกล้กันจะมีค่าต่ำ แต่ถ้ามีสิ่งกีดขวางทางสภาพภูมิศาสตร์ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมก็จะสูงขึ้น จากข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรมนี้ สามารถนำไปสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้โดยวิธีการต่างๆ (Nei, 1978; Cavalli-Sforza and Edwards, 1967)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ ในสัตว์น้ำ

ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่นำมาใช้ประโยชน์ในด้านการประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกันมากในปัจจุบัน เนื่องจากไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอมีเป็นจำนวนมากและกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม รวมถึงมีความหลากหลายของอัลลีลสูง นอกจากนี้ยังมีข้อได้เปรียบเหนือเครื่องหมายพันธุกรรมประเภทโปรตีนในเรื่องความสะดวกของการเก็บตัวอย่าง อีกทั้งยังสามารถใช้ปริมาณตัวอย่างเพียงเล็กน้อยเพราะสามารถใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ในการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอได้ และยังสามารถเก็บตัวอย่างได้ตั้งแต่ยังเป็นเอ็มบริโอหรือระยะวัยอ่อนทำให้ช่วยลดระยะเวลาในการทดลองได้ ข้อได้เปรียบอีกประการหนึ่งคือไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอมีความละเอียด (resolution) ในการตรวจสอบความแตกต่างที่อาจมีเพียงเล็กน้อย เช่นความแตกต่างระหว่างประชากรโรงเพาะฟัก นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกแบบข่มร่วม (codominant) ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ละเอียดกว่าเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีการแสดงออกแบบข่มสมบูรณ์ (dominant) นอกจากนี้ Kalinowski (2002) ได้รายงานว่ามีไมโครแซทเทลไลต์ที่มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งสูงจะสามารถประมาณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมได้อย่างแม่นยำ การศึกษาไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอได้รับความนิยมอย่างสูงในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร การจำแนกสต็อก การตรวจสอบพ่อแม่พันธุ์ เมื่อเทียบกับเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดอื่น เนื่องจากมีความหลากหลายสูงทำให้ได้ข้อมูลที่ละเอียด อีกทั้งมีข้อได้เปรียบทางด้านเทคนิคที่ใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างในปริมาณน้อยจากเลือดหรือครีปลาในการศึกษา จึงไม่ต้องฆ่าปลาที่นำมาเป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์

ในสัตว์น้ำมีการศึกษาไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอจากปลาหลายชนิด เช่น แอดแลนติกแซลมอน (*Salmo salar*) (McConnell *et al.*, 1995); เรนโบว์ เทราท์ (*Oncorhynchus mykiss*) (Morris *et al.*, 1996); บราวน์ เทราท์ (*Salmo trutta*) (Estoup *et al.*, 1993); Northern pike (*Esox lucius*) (Miller and Kapuscinski, 1996); 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 carpio*) (Aliah *et al.*, 1999); ปลาคูกยักษ์ (*C. gariepinus*) (Galbusera *et al.*, 1996); channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Waldbieser and Bosworth, 1997); ปลาหมอสี (*Mystus nemurus*) (Usmani *et*

al., 2001); ปลาอุกอุย (*C. macrocephalus*) (Na-Nakorn *et al.*, 1999); ปลาดุกเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) (Kamonrat *et al.*, 2002) และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Tassanakajon *et al.*, 1998)

สำหรับการศึกษาในปลาดุกยักษ์ ในปี 1996 ได้มีการพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรมอร์ 7 คู่เพื่อใช้ในการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมในปลาดุกยักษ์โดย Gulbusera *et al.* (1996) และรายงานว่าปลาดุกยักษ์ในแหล่งธรรมชาติแถบแอฟริกาใต้ปัจจุบันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงกว่าในอดีต และยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาดุกยักษ์ในโรงเพาะฟักต่ำกว่าประชากรในแหล่งธรรมชาติ (Gulbusera *et al.*, 1996; Gulbusera, 1997; Teugels *et al.*, 1992)

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรค

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความสามารถในการต้านทานโรคของปลามีความสัมพันธ์กับสถานะหลากหลายรูปแบบของยีนที่ควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรค เช่น ยีน MHC class I และ class II (Grimholt *et al.*, 2003; Langefors *et al.*, 2001) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนชนิดนี้เปรียบเทียบกับลักษณะความต้านทานโรคโดยเลือกใช้ parameter ที่เป็นตัวแทนในการบอกถึงระดับความต้านทานโรคได้โดยจะกล่าวถึงในรายละเอียดต่อไป

โรคที่เกิดในปลาดุกมีสาเหตุมาจากหลายประการ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และปรสิต โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิด *Aeromonas hydrophila* ก่อให้เกิดความเสียหายแก่การเลี้ยงปลาดุกชนิดนี้อย่างมาก โดยปลาที่ติดเชื้อจะมีลักษณะอาการภายนอกคือ กกหุบววมแดง มีเลือดคั่งรอบทวาร มีแผลตามลำตัวและท้องบวมน้ำ (นนทวิทย์, 2535) นอกจากนี้ยังมีผลทำให้เกิดการตกเลือดและติดเชื้อภายใน ความรุนแรงของโรคขึ้นกับความสามารถในการสร้างสารพิษของแบคทีเรีย (Ainsworth and Dexiang, 1990; Angka *et al.*, 1995)

สำหรับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการกระตุ้นด้วยวัคซีนนั้น พบว่าเมื่อมีแอนติเจนชนิดเดียวกันมากระตุ้นซ้ำอีก (booster) การตอบสนองจะเกิดขึ้นได้รวดเร็วและรุนแรงกว่าการตอบสนองต่อการกระตุ้นในครั้งแรก (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537) และการให้วัคซีนโดยการฉีด (injection vaccination) จะให้ประสิทธิภาพมากที่สุด โดยใช้แอนติเจนทั้งเซลล์ (whole cell) ที่ไม่มีความรุนแรงหรือไม่สามารถทำให้ปลาเกิดโรคได้ใส่ในตำลึงที่เจือจางเป็นน้ำหรือน้ำเกลือ 0.85 % ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular) (Gutierrez and Miyazaki, 1994) หรือฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal) ซึ่งวิธีนี้จะให้ประสิทธิภาพสูงสุด (Dunn *et al.*, 1990) ในประเทศไทยมีการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนตอบสนองทางด้าน

ภูมิคุ้มกันและต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ *A. hydrophila* ในปลาคูอุย (*Clarias macrocephalus*) โดยการฉีดเข้าช่องท้อง แช่ และการผสมอาหาร พบว่าการให้วัคซีนโดยฉีดเข้าช่องท้องจะให้ผลในการสร้าง Antibody สูงสุด (นิลบล, 2534)

บุญกว้าง และนนทวิทย์ (2536) ได้ทำการศึกษาความต้านทานโรคและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *A. hydrophila* ของปลาคูอุยผสมพบว่า ปลาที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้องครั้งแรกในสัปดาห์ที่หนึ่งมีค่า Antibody titre เท่ากับ 78.93 และครั้งที่สองในสัปดาห์ที่สี่เท่ากับ 614.40 และพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอดถึง 97.78 เปอร์เซ็นต์

จิตต์เกษม และคณะ (2536) ได้ทำการศึกษาทางด้านการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของปลาช่อน (*Channa striata*) หลังการให้วัคซีน *A. hydrophila* ที่มาด้วยฟอร์มาลิน โดยการฉีดวัคซีนที่ผสมและไม่ผสม adjuvant เข้าช่องท้อง การแช่ และการฉีดน้ำเกลือ 0.85 % (กลุ่มควบคุม) พบว่าค่า Antibody titre หลังจากการให้วัคซีนครั้งแรกเท่ากับ 116.00 ± 63.90 , 130.00 ± 111.12 , 84.00 ± 77.87 และ 10.22 ± 17.69 ตามลำดับ หลังจากค่าไตเตอร์ลดลงทำการให้วัคซีนครั้งที่สอง ค่าไตเตอร์ในวันที่ 40 มีค่าเท่ากับ 80.00 ± 27.75 , 22.75 ± 81.30 , 32.50 ± 20.40 และ 5.78 ± 1.99 ตามลำดับ จึงทดลองให้วัคซีนครั้งที่สาม พบว่าค่า Antibody titre ลดลงโดยมีค่าต่ำกว่าก่อนให้วัคซีน ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเกิดภาวะยับยั้งการทำงานด้านภูมิคุ้มกันขึ้น

Sahoo *et al.* (2004) ได้รายงานการศึกษาการตอบสนองและความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลาช่อนเทศ แต่ละกลุ่ม full sib family ในอินเดียโดยใช้วิธีทดสอบด้วย haemagglutination (HA) titre against sheep red blood cell (SRBC) ซึ่งเป็น specific immune response และการทดสอบ nonspecific immune response (lysozyme activity และ natural haemolysin titre) ผลปรากฏว่า ปลาช่อนเทศมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *A. hydrophila* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อดูจากค่า HA titre ในซีรัมของปลาที่ได้รับวัคซีนของเชื้อชนิดนี้ แต่ไม่พบการตอบสนองต่อเชื้อในส่วนของ nonspecific immune response โดย Sahoo *et al.* (2004) ได้สรุปว่า ค่าความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของซีรัม (serum bactericidal activity) และ ค่า HA titre ในซีรัมของปลาที่ได้รับวัคซีน สามารถใช้เป็น parameter ในส่วนของความต้านทานโรคได้

นอกจากนี้ parameter อีกตัวหนึ่งที่น่าสนใจและนิยมศึกษาได้แก่ การศึกษา Phagocytosis ของ peripheral blood leukocytes (PBLs) ซึ่งเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity หรือเป็น nonspecific immune response โดยบอกถึงระดับความสามารถของเม็ดเลือดขาว PBLs ในการกลืนกินเชื้อ

โรค ซึ่งมีการศึกษาในปลากระดูกแข็งหลายชนิด เช่น ในปลา gilthead seabream (Cuesta *et al.*, 2006), ปลา golden perch และปลา silver perch (Hardford *et al.*, 2006) เป็นต้น

ดังนั้นในการศึกษารั้วนี้จึงเลือกใช้ การทดสอบค่า Antibody titer เป็นตัวแทน parameter ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง และเลือกใช้ การศึกษา Phagocytosis ของ peripheral blood leukocytes (PBLs) เป็นตัวแทน parameter ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าสภาวะหลากหลายรูปแบบของยีนที่ควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านทานโรคของปลา โดยจะทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน Major histocompatibility complex class I (MHC class I) ซึ่งเป็นยีนที่กำหนดชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายแบบ CMIR (Cell-mediated immune response) ยีนในกลุ่มนี้ควบคุมและกำหนดการสร้างโมเลกุล MHC class I antigen ซึ่งพบอยู่บนผิวเซลล์ที่มีนิวเคลียสทุกชนิดของร่างกาย บนโมเลกุล class I มีส่วนที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนและทำหน้าที่จดจำส่วนของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม โดยโครงสร้างของไวรัสหรือเซลล์เนื้องอก (Tumor) ชนิดต่าง ๆ คุณสมบัติของ MHC class I มีสภาวะหลากหลายรูปแบบ (polymorphism) ของยีน และมีความแปรผัน (variation) สูง และมีการแสดงออกของยีนแบบข่มร่วม (codominant) จึงเหมาะที่จะนำมาศึกษารูปแบบ Haplotype ของยีน MHC class I ในปลาคุ้ยักษ์แต่ละกลุ่ม เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปลาแต่ละกลุ่ม รวมถึงเปรียบเทียบกับระดับความสามารถต่อการต้านทานโรคของปลาแต่ละกลุ่มอีกด้วย

นอกจากนี้มีการศึกษาถึงลักษณะ รูปแบบ บทบาทหน้าที่ และการแสดงออกของ MHC class I ในปลาหลายชนิด เช่น ปลา zebrafish (*Brachydanio rerio*) (Takeuchi *et al.*, 1995), ปลา pink salmon (Katagiri *et al.*, 1996), ปลา guppy (Sato *et al.*, 1996), ปลา carp (Van Erp *et al.*, 1996), ปลาปักเป้า (*Fugu rubripes*) (Timon *et al.*, 1998), ปลา channel catfish (Antao *et al.*, 2001), ปลา Atlantic salmon (Grimholt *et al.*, 1993 ; Kjøglum *et al.*, 2006), ปลา Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) (Srisapoomee *et al.*, 2004) เป็นต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดุกยักษ์จากฟาร์มเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ 4 ฟาร์มในประเทศไทยโดยเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์

การเก็บตัวอย่าง

เนื่องจากเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาดุกยักษ์เพื่อเพาะพันธุ์มีจำนวนไม่มากนัก ในการศึกษาจึงคัดเลือกตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกยักษ์ที่นำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาดุกยักษ์ 4 ฟาร์มในประเทศไทย ได้แก่ ฟาร์มดาหม้อ จังหวัดสุพรรณบุรี, สี่ร้อยฟาร์ม จังหวัดอ่างทอง, ฟาร์มปิ่นพันธุ์ปลา จังหวัดนครปฐม และณรงค์ฟาร์ม จังหวัดนครสวรรค์ ซึ่งทั้ง 4 ฟาร์มมีประวัติการดำเนินงานมานานกว่า 10 ปี และจากการสอบถามไม่พบว่าการแลกเปลี่ยนพ่อแม่พันธุ์ระหว่างฟาร์มเหล่านี้ จึงมีความเป็นไปได้ที่ปลาทั้ง 4 ฟาร์มนี้จะมีพันธุกรรมต่างกัน รายละเอียดที่ดังฟาร์มและจำนวนตัวอย่างแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกยักษ์

ประชากร	แหล่งเก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
SP	ฟาร์มดาหม้อ อ. ศรีประจันต์ จ. สุพรรณบุรี	65
AT	สี่ร้อยฟาร์ม อ.วิเศษชัยชาญ จ.อ่างทอง	31
NP	ปิ่นพันธุ์ปลา อ.เมือง จ.นครปฐม	16
NS	ณรงค์ฟาร์ม อ.ชุมแสง จ.นครสวรรค์	33

เก็บตัวอย่างโดยตัดชิ้นส่วนครีบก้างขนาดประมาณ $1 \times 2 \text{ cm}^2$ เก็บรักษาในเอทานอล 95% ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml แยกเก็บตัวอย่างละ 1 หลอด

การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

นำตัวอย่างปลาคุยกัยแต่ละตัวมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีมาตรฐาน phenol-chloroform โดยดัดแปลงจากวิธีของ Taggart *et al.* (1992) ซึ่งเป็นการสกัด genomic DNA จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยละลายในสารละลาย TE buffer (10mM Tris-HCL pH 7.6, 1mM EDTA pH 8.0) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกระทั่งใช้

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

1. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์ไพรมอร์ปลาคุยกัย 6 คู่ ได้แก่ Cga 01, Cga 02, Cga 03, Cga 06, Cga 09, Cga 10 (Galbusera *et al.*, 1996) รายละเอียดของไพรมอร์แสดงดังตารางที่ 2 โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 10 µl ประกอบด้วย DNA template 10 ng, ไพรมอร์ Forward และ Reverse สายละ 0.25 pmol, 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs และ 0.2 unit Taq DNA polymerase (Fermentas) ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, INC.) โดยใช้รอบอุณหภูมิ 95 °C นาน 5 นาที 1 รอบ ตามด้วยวงจรปฏิกิริยาที่ 95 °C นาน 30 วินาที 56 °C นาน 30 วินาที และ 72 °C นาน 1 นาที รวมทั้งสิ้น 35 รอบ และ 72 °C นาน 5 นาที 1 รอบ จากนั้นทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยเทคนิค agarose gel electrophoresis ใช้ความเข้มข้น 1.5-2% agarose gel

2. นำผลผลิตพีซีอาร์ที่แสดงแถบชัดเจนบน agarose gel มาแยกด้วยเทคนิค electrophoresis บน 4.5-6% Denaturing polyacrylamide gel แล้วย้อมเจลด้วยวิธี silver staining จากนั้นอ่านผลแถบดีเอ็นเอและบันทึกข้อมูลจีโนไทป์

3. การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลจีโนไทป์

3.1 ทดสอบ Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)

ทดสอบความถี่ของจีโนไทป์แต่ละตำแหน่งของแต่ละประชากรว่ามีความสอดคล้องกับ HWE หรือไม่ โดยใช้โปรแกรม GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset, 1995) เนื่องจากพบว่าปลา 3 ประชากรไม่อยู่ใน HWE จึงทดสอบ null allele ซึ่งหมายถึงอัลลีลที่ไม่สร้างผลผลิต PCR โดยใช้โปรแกรม MICROCHECKER (Oosterhout, 2004) ซึ่งพบว่ามี null allele ที่ตำแหน่ง Cga01 และ Cga02 ในประชากรสุพรรณบุรี อ่างทองและนครปฐม จึงได้ปรับจีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลต์ ทั้ง 2 ตำแหน่ง ในประชากรทั้งสามตามที่โปรแกรมกำหนดให้ จากนั้นทำการคำนวณ ค่าต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

3.2 การทดสอบ Genotypic disequilibrium

ทดสอบว่าจีโนไทป์ที่ตำแหน่งหนึ่งเป็นอิสระจากจีโนไทป์ตำแหน่งอื่นหรือไม่โดยใช้โปรแกรม GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset, 1995) และทดสอบการเกิด bottleneck ด้วยโปรแกรม BOTTLENECK version 1.2.02 (Cornuet *et. al.*, 1996)

3.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

นำข้อมูลจีโนไทป์ของปลาแต่ละตัวในประชากรมาคำนวณค่าต่างๆ โดยใช้โปรแกรม GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset, 1995), Popgene version 1.31 (Yeh *et. al.*, 1999) และ FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 2001) ดังต่อไปนี้

3.3.1 ความถี่ของอัลลีล (Allele frequency) ของแต่ละตำแหน่ง คำนวณตามสูตร

$$X_i = (2H_A + H_B)/2N$$

เมื่อ	X_i	คือ	ความถี่ของอัลลีลที่ i
		H_A	คือ จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัส
		H_B	คือ จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส
		N	คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

3.3.2 จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (number of allele per locus) (A)

$$A = \frac{\text{จำนวนอัลลีลทั้งหมดทุกตำแหน่ง}}{\text{จำนวนตำแหน่งยีนทั้งหมดที่ศึกษา}}$$

3.3.3 ค่าเฉลี่ย Effective number of alleles per locus (A_e)

$$A_e = 1/\sum p_i^2$$

เมื่อ	p_i	คือ	ความถี่ของอัลลีลที่ i
-------	-------	-----	-----------------------

3.3.4. ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลที่เป็นอิสระต่อจำนวนตัวอย่างต่อตำแหน่ง (Mean of Allelic richness) (A_r)

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

3.3.5. ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตี (Mean of Heterozygosity) ทั้งค่าสังเกต (H_o) และค่าคาดหวัง (H_e)

$$H_o = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}}$$

$$H_e = \sum h_k / r$$

$$h_k = 2n(1 - \sum X_i^2) / 2n - 1$$

เมื่อ	h_k	คือ	ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ตำแหน่ง k
	X_i	คือ	ความถี่ของอัลลีล i ที่ตำแหน่ง k
	n	คือ	จำนวนอัลลีลที่ตำแหน่ง k
	r	คือ	จำนวนตำแหน่งที่ทำการศึกษา

3.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

นำข้อมูลจีโนไทป์ของปลาแต่ละตัวในประชากรแต่ละประชากรมาคำนวณค่าต่างๆ ด้วยโปรแกรม FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 2001), Arlequin version 3.01 (Excoffier *et. al.*, 2006), และ Phylip version 3.63 (Felsenstein, 1993) ดังต่อไปนี้

3.4.1. ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient) ทดสอบว่าประชากรที่ศึกษาแบ่งออกเป็นประชากรย่อยหรือไม่ โดยการคำนวณค่าประมาณ F , θ และ f ของ F_{IS} , F_{IT} และ F_{ST}

$$F_{IS} = (H_T - H_0) / H_T$$

$$F_{IT} = (H_S - H_0) / H_S$$

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

เมื่อ	H_0	คือ	ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตีในประชากร
	H_T	คือ	ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวังในประชากรทั้งหมด
โดย	H_T	=	$1 - \sum p_k^2$
	p_k	=	$\sum p_{ik} / n$
	H_S	คือ	ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวังในประชากรกลุ่มย่อย
โดย	H_S	=	H_{is} / n
	H_{is}	=	$1 - \sum p_{ik}^2$
เมื่อ	p_{ik}	คือ	ค่าความถี่อัลลีลในประชากร k
	N	คือ	จำนวนประชากรย่อย

3.4.2. การทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร (Population differentiation) โดยใช้โปรแกรม GENEPOP version 3.4

3.4.3. ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยใช้ Cavalli-Sforza and Edwards genetic distance และจัดความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic dendrogram) โดยวิธี UPGMA (Unweight pair-group method with arithmetic mean) (Sneath and Sokal, 1973)

ตารางที่ 2 รายละเอียดของไมโครแซเทลไลต์ไฟรเมอร์ GenBank Accession number, ลำดับเบสซ้ำ, ลำดับเบสไฟรเมอร์, annealing temperature และขนาดผลผลิตพีซีอาร์

Locus ID	GenBank Accession no.	primer sequence 5'-3'	Repeat unit	T _A (°C)	Product size range (bp)
Cga01	U30862	GGCTAAAAGAACCCTGTCTG TACAGCGTCGATAAGCCAGG	(GT) ₁₅	52	90-135
Cga02	U30863	GCTAGTGTGAACGCAAGGC ACCTCTGAGATAAAACACAGC	(GT) ₁₀ N ₂ (GT) ₈	54	100-120
Cga03	U30864	CACTTCTTACATTTGTGCCC ACCTGTATTGATTTCTTGCC	(GT) ₂₁	56	110-236
Cga06	U30867	CAGCTCGTGTTTAATTTGGC TTGTACGAGAACCGTGCCAGG	(GT) ₅ N ₂ (GT) ₉	54	134-180
Cga09	U30871	CGTCCACTTCCCCTAGAGCG CCAGCTGCATTACCATACATGG	(GA) ₃ N ₃ (GT) ₁₁ N (GT) ₆ N ₂ (GT) ₄	56	178-194
Cga10	U30870	GCTGTAGCAAAAATGCAGATGC TCTCCAGAGATCTAGGCTGTCC	(GT) ₂ N ₂ (GT) ₁₅	54	108-168

2. การศึกษาผลของการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ปลาอุกยักษ์ ที่มีพันธุกรรมแตกต่างกัน ต่อลักษณะการเจริญเติบโต อัตรารอด และลักษณะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

คู่ผสมและวิธีการผสมพันธุ์

ทำการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาอุกยักษ์ ที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันอย่างชัดเจนมา 2 ประชากร นำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผสมเทียมเพื่อศึกษาลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของลูกผสม จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่า ปลาอุกยักษ์ที่นำมาศึกษา แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน คือกลุ่ม นครปฐม (NP) - นครสวรรค์ (NS) และกลุ่มอ่างทอง (AT) – สุพรรณบุรี (SP) แม้ว่าค่า genetic distance ระหว่างคู่ NS และ SP จะมีค่าสูงที่สุด แต่เนื่องจากไม่สามารถขอซื้อพ่อแม่พันธุ์จากฟาร์มดังกล่าวได้ จึงใช้พ่อแม่พันธุ์จาก อ่างทอง (AT) และนครปฐม (NP) โดยซื้อพ่อแม่พันธุ์จากแหล่งดังกล่าวฟาร์มละ 9 คู่ ทำการฉีดฮอร์โมนผสมเทียม ใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ LHRHa (Suprefact) ฉีดพ่อแม่ปลาในอัตรา 30 µg/kg ร่วมกับ Domperidone (Motilium) ฉีดพ่อแม่ปลาในอัตรา 5mg/kg เมื่อเกิดการตกไข่ (ภายหลังการฉีดประมาณ 10-12 ชั่วโมง) ทำการผสมเทียมโดยผสมเป็นคู่ๆ ผสมภายในแต่ละประชากร (AT x AT, NP x NP) และผสมสลับระหว่างประชากร (AT x NP, NP x AT) นำไข่จากพ่อแม่แต่ละคู่ ไปฟักในอุปกรณ์ฟักไข่ที่มีน้ำไหลผ่านตลอดเวลา เมื่อไข่ฟักเป็นตัวแล้ว นำลูกปลาจำนวนเท่าๆกันโดยประมาณ จากแต่ละถึงฟัก ไปรวมกันตามกลุ่มการทดลอง

การอนุบาลและการเลี้ยงปลา

อนุบาลลูกปลาในถังไฟเบอร์กลาสเลี้ยงที่มีระบบน้ำไหลผ่านตลอด ให้กินไรแดงวันละ 2 ครั้ง เมื่ออนุบาลได้ 2 สัปดาห์ ย้ายลูกปลาไปทำการทดลองระยะที่ 1

การทดลองระยะที่ 1 โดยเลี้ยงลูกปลาทั้ง 4 กลุ่ม ในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 250 ลิตร (เส้นผ่าศูนย์กลาง 70 ซม. ความลึก 70 ซม.) เติมน้ำสูงประมาณ 35 ซม. โดยปล่อยปลาถึงละ 200 ตัว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทั้งนี้โดยการจัดวางหน่วยทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) ให้อาหารสำเร็จรูป โปรตีน 25% โดยให้กินจนอิ่ม ถ่ายน้ำ 30% วันละ 1 ครั้ง เมื่อปลามีอายุ 5 สัปดาห์ (เริ่มการทดลองได้ 3 สัปดาห์) ทำการชั่งน้ำหนัก วัดความยาวเหยียด และเก็บข้อมูลอัตรารอด

การทดลองระยะที่ 2 นำลูกปลาจากการทดลองระยะที่ 1 ไปทดลองระยะต่อไป โดยศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจของลูกผสม และสายพันธุ์พ่อแม่ ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด การทดลองทำในกระชังที่ตรึงในบ่อดิน ณ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ใช้กระชังทำด้วย polyethylene ขนาด

กระชัง 2 x 1.5 ตารางเมตร 1.5 เมตร ปลอยปลากระชังละ 120 ตัว ให้อาหารเม็ดลอยน้ำ โปรตีน 25% วันละ 2 ครั้ง โดยให้กินจนอิ่ม ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ ซึ่งวัดปลาเดือนละครั้ง ปรับอัตราปลอยในสัปดาห์ที่ 5 เป็น 80 ตัว/กระชัง เก็บข้อมูลน้ำหนักและความยาว รวมทั้งอัตราการรอดของปลาในแต่ละกลุ่ม

การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลาต่อเชื้อโรค

1. การศึกษา Antibody titre โดยวิธี Agglutination (นนทวิทย์, 2537)

1.1. การเตรียมวัคซีน เตรียมโดยแยกเชื้อ *Aeromonas hydrophila* บริสุทธิ์จากปลาอุกถูกผสมที่ป่วย ที่ภาควิชาวปะเลียงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นำมาทดสอบและแยกชนิดตามวิธีของ McFaddin (1980) เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth) เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วใช้ฟอร์มาลินเข้มข้นในการฆ่าเชื้อ โดยเติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% ของปริมาตร suspension แบคทีเรียทั้งหมด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบว่าเชื้อแบคทีเรียตายทั้งหมดแล้ว จากนั้นเก็บ Bacterin ในน้ำเกลือ 0.85% และฟอร์มาลินเข้มข้น 0.1% โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของแบคทีเรียประมาณ 10^9 CFU/ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อนำมาใช้ต่อไป

1.2. การฉีดวัคซีน ใช้ปลาทดลองอายุ 6 เดือน โดยหลังการชั่งวัดครั้งสุดท้าย นำปลาจากแต่ละซ้ำ มารวมกันภายในแต่ละกลุ่มการทดลอง จากนั้นสุ่มปลาจำนวน 60 ตัว/กลุ่มการทดลอง มาใช้ในการศึกษา Antibody titer ต่อไป นอกจากนี้สุ่มปลาจากแต่ละกลุ่มการทดลองจำนวน 15 ตัว/กลุ่มมาเลี้ยงรวมกันเพื่อใช้เป็นชุดควบคุมที่ไม่ฉีดวัคซีน ทำการฉีดวัคซีนในปลาทดลอง (กลุ่มการทดลองละ 60 ตัว) ในอัตรา 0.1 ml/kg ของปลาทดลอง และฉีดปลากลุ่มควบคุมด้วย 0.85% NaCl ในอัตราเดียวกันกับวัคซีน

1.3. ทำการเจาะเลือดปลากลุ่มที่ฉีดวัคซีนและชุดควบคุม กลุ่มละ 6 ตัว สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยวางยาสลบปลาด้วย Quinaldine Sulfate เจาะดูดเลือดปลาจาก Caudal vein แล้วใช้เข็มสอดเข้าข้าง ๆ ตัวเบา ๆ จนรู้สึกว่กระทบกับกระดูกสันหลัง ค่อย ๆ ดึงที่ดูดของเข็มฉีดยาขึ้น จะมีเลือดไหลตามขึ้นมาให้ได้เลือดประมาณ 1 ml จากนั้นแยกเอาซีรัมไว้ตรวจวัดปริมาณแอนติบอดี ปลาที่เจาะเลือดแล้วปลอยคืนบ่อเลี้ยงเพื่อรักษาความหนาแน่นให้เท่าเดิม แต่จะไม่นำมาเจาะเลือดซ้ำอีก โดยสังเกตจากรอยแผลจากการเจาะ

1.4. การเตรียมแอนติเจนสำหรับการวัดแอนติบอดีไคเตอร์ ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ผ่านการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 1.1 แต่ให้มีความเข้มข้นมากกว่าเล็กน้อย

1.5. การหาปริมาณ Antibody titer โดยวิธี agglutination test จะทำใน Micro titer plate 96 หลุมก้น หลุมแบบ U-shape ทำ Serial Two-Fold Dilution ของซีรัม โดยใช้ น้ำเกลือ 0.85% ในอัตรา 50 μ l ซีรัม + 50 μ l น้ำเกลือ 0.85% ทำ Dilution ไปจนได้ 1: 2048 จากนั้นใส่แอนติเจนในทุกๆ หลุมของซีรัมทุกๆ Dilution

ในอัตรา 50 µl ต่อหลุม เตรียม Negative control โดยใช้ แอนติเจนและน้ำเกลือปราศจากซีรัม หรือซีรัมจากปลาที่ไม่ได้รับวัคซีน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ หลังจากนั้นทำการอ่านผลและรายงานผล ค่าแอนติบอดีไคเตอร์ที่ได้จากการทดลองจะเป็นค่า Dilution สุดท้ายที่ให้ผลบวกเมื่อนับจากความเข้มข้นของซีรัมมากที่สุดไปหาน้อยที่สุด

2. การศึกษา Phagocytosis ของ peripheral blood leukocytes (PBLs) (ดัดแปลงจากวิธีของ Puangkaew *et al.*, 2004)

2.1. ทำการเจาะเลือดปลาโดยใช้ anticoagulant เก็บเลือด 1 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเม็ดเลือดขาว RPMI อยู่ 3 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเลือดปลา: อาหารเลี้ยงเม็ดเลือดขาวเป็น 1: 3) พลิกหลอดกลับไปมาเบา ๆ ให้อาหารและเลือดผสมจนเข้ากัน จากนั้นดูดมา 3 มิลลิลิตรใส่ลงไปในหลอดใหม่ที่มี Histopaque อยู่ 3 มิลลิลิตร โดยค่อย ๆ ปล่อยลงไปเบา ๆ ให้เลือดหยดลงไปบนผิวหน้าของ Histopaque แล้วนำไปปั่นแยกเม็ดเลือดขาว PBLs ด้วย swing rotor ที่ความเร็ว 400 x g อุณหภูมิ 25 °C

2.2. ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดเอาเฉพาะชั้นของ PBLs นับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer โดยให้มีเซลล์ PBLs ประมาณ 2×10^6 cell/ml ล้างเม็ดเลือดขาว PBLs ด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วเจือจางตะกอนเม็ดเลือดขาว PBLs ทั้งหมดด้วย 1 มิลลิลิตรของ PBS

2.3. จากนั้นหยด suspension ของ PBLs ลงบน cover slip 200 µl ปล่อยให้เซลล์เกาะกับผิวของ cover slip เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้าง PBLs ส่วนเกินออกด้วย RPMI

2.4. ทำการเติม yeast suspension 500 µl ลงไปบน cover slip ที่มี PBLs เกาะอยู่ แล้วปล่อยให้เกิดขบวนการ Phagocytosis เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้าง yeast ส่วนเกินออกด้วย RPMI เช่นกัน

2.5. ย้อมสีเม็ดเลือดขาว PBLs และ yeast ด้วย Diff-Quick staining dye ล้างสีส่วนเกินออก ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และประเมินค่า Phagocytic activity (PA) (สัดส่วนของจำนวนเม็ดเลือดขาวที่มีการกลืนกินเชื้อโรคต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด) และ Phagocytic index (PI) (สัดส่วนของจำนวนเม็ดเลือดขาวที่มีการกลืนกินเชื้อโรคมากกว่า 1 เซลล์ต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวที่มีการกลืนกินเชื้อโรคทั้งหมด) ตามสูตรดังนี้

$$\text{Phagocytic activity (PA)} = \frac{\text{Total number of phagocytizing cells}}{\text{Total number of counted cells}}$$

$$\text{Phagocytic index (PI)} = \frac{\text{Average number of beads per cells}}{\text{Total number of phagocytizing cells}}$$

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลน้ำหนักตัว ความยาวทั้งหมด อัตราอด ค่า Antibody titre เปอร์เซ็นต์ Phagocytic activity และเปอร์เซ็นต์ Phagocytic index มาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) แบบ one-way Anova โดยใช้โปรแกรม SPSS โดยแปลงข้อมูลที่เป็นเปอร์เซ็นต์ด้วยวิธี arcsin transformation ก่อนนำมาทดสอบ จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Bonferroni โดยใช้โปรแกรม SPSS

ศึกษาค่า heterosis ของลูกผสมโดยศึกษาในลักษณะที่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่าง พ่อแม่ กับลูกผสม ตามสูตร

$$\text{heterosis (\%)} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของลูกผสม} - \text{ค่าเฉลี่ยของพ่อแม่}}{\text{ค่าเฉลี่ยของพ่อแม่}} \times 100 \quad (\text{อุทัยรัตน์, 2543})$$

การศึกษาความหลากหลายของ Major histocompatibility complex class I

ทำการศึกษาตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. การออกแบบ degenerate primer ทำโดยนำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ sequences ของยีน MHC class I ของปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) 3 haplotype ได้แก่ GenBank accession numbers AF053547, AF053548, AF053549 จากนั้นทำการ align โดยใช้โปรแกรม GENETYX version 7 แล้วเลือกบริเวณ conserve region ของ MHC class I โดยออกแบบ forward primer จากบริเวณส่วนของ $\alpha 1$ และ reverse primer จากบริเวณส่วนของ $\alpha 3$ เพื่อให้ครอบคลุมในส่วนของ $\alpha 2$ ทั้งหมดเนื่องจากเป็นส่วนที่มี polymorphism สูงสุด (Srisapoome *et al.*, 2004)

2. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ degenerate primers ที่ได้จากขั้นตอนแรกเพื่อใช้ในการออกแบบ specific primer เริ่มจากเตรียมอาร์เอ็นเอของปลาคุยกัย โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากปลาคุยกัย ทดลองมาสกัด total RNA โดยใช้ TRIZOL reagent (Invitrogen) และตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) จากนั้นเตรียม First-Strand cDNA โดยใช้ SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA sequence ของยีน MHC class I ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ 25 μ l ซึ่งประกอบด้วย cDNA template 100 ng, degenerate primer F/R ความเข้มข้นสายละ 100 μ M, 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs และ 1 unit Taq DNA polymerase (Fermentas) ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, INC.) โดยใช้รอบ

อุณหภูมิ 95 °C นาน 5 นาที 1 รอบ ตามด้วยวงจรปฏิกิริยาที่ 95 °C นาน 30 วินาที 57 °C นาน 30 วินาที และ 72 °C นาน 1 นาที รวมทั้งสิ้น 35 รอบ และ 72 °C นาน 5 นาที 1 รอบ จากนั้นทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดย 2% agarose gel electrophoresis ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์และคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของยีน MHC class I (ประมาณ 550 bp) แยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย DNA Extraction Kit #K0513 (Fermentas) จากนั้นทำการโคลนโดยการนำชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega) ใน ligation reaction ซึ่งประกอบไปด้วย 1 µl pGEM-T Easy vector, 3 µl insert gene (purified PCR product), 5 µl 2X ligation buffer และ 1 µl เอนไซม์ T₄ ligase นำไปไว้ในอุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน หลังจากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia. coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธีการ heat-shock transformation ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 30-40 วินาที นำเชื้อไปเลี้ยงในอาหาร SOC medium (2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ and 20 mM glucose) เป็นเวลา 1.5-2 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มียาแอมพิซิลิน X-gal และ IPTG ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มี insert อยู่ได้แก่ โคโลนีสีขาวนำมาสกัดพลาสมิดลูกผสมที่คัดเลือกไว้ด้วย alkaline lysis (ดัดแปลงจาก Sambrook and Russell, 2001) และนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia)

3. การออกแบบ specific primer และทดสอบไพรเมอร์ โดยนำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วย BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เพื่อตรวจสอบและยืนยันว่าเป็นยีน MHC class I สำหรับ annealing temperature นั้นสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = [4 (G + C) + 2 (A + T)] - 5 \quad (\text{Kamonrat, 1996})$$

4. การศึกษา MHC genotyping ในประชากรปลาดุกยักษ์แต่ละกลุ่ม โดยศึกษา haplotype ของ MHC class I ของปลาแต่ละกลุ่ม ด้วยการใช้ specific primer ที่ออกแบบทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia) นำผลที่ได้มาวิเคราะห์รูปแบบของ haplotype วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากค่า No. of polymorphic sites, Average gene diversity over loci และ Mean no. of pairwise differences ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) และ Arlequin version 3.01 (Excoffier *et al.*, 2006)

ผลการทดลอง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

1. ความถี่อัลลีลของประชากรปลาอุกยักษ์

ความถี่อัลลีลในแต่ละตำแหน่งของประชากรปลาอุกยักษ์ทั้ง 4 ประชากร แสดงไว้ในตารางผนวกที่ 1 จากการตรวจสอบจำนวนและขนาดอัลลีลในปลาอุกยักษ์ทุกประชากรจำนวน 145 ตัว พบว่าที่ตำแหน่ง Cga01 มี 14 อัลลีล (ขนาด 90-135 bp) ตำแหน่ง Cga02 มี 8 อัลลีล (ขนาด 100-120 bp) ตำแหน่ง Cga03 มี 27 อัลลีล (ขนาด 110-236 bp) ตำแหน่ง Cga06 มี 20 อัลลีล (ขนาด 134-180 bp) Cga09 มี 10 อัลลีล (ขนาด 178-194 bp) Cga10 มี 15 อัลลีล (ขนาด 108-140 bp)

2. จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (A)

จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งในประชากร สุพรรณบุรี ($A = 9.33 \pm 5.32$) และอ่างทอง ($A = 12.17 \pm 6.50$) มีค่าสูงกว่าประชากรนครปฐม ($A = 4.67 \pm 1.51$) และ นครสวรรค์ ($A = 6.00 \pm 2.28$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยแต่ละคู่ประชากรดังกล่าวมีค่า A ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยทุกประชากรเท่ากับ 16.67 ± 7.25 (ตารางที่ 3)

3. Effective number of allele (A_e)

Effective number of allele ในประชากรปลาอุกยักษ์ ประชากรสุพรรณบุรี ($A_e = 4.26 \pm 1.52$) อ่างทอง ($A_e = 5.80 \pm 3.00$) มีค่าสูงกว่า นครสวรรค์ ($A_e = 3.15 \pm 0.97$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างจากนครปฐม ($A_e = 3.62 \pm 1.19$) ส่วนประชากรนครปฐมและนครสวรรค์มีค่า A_e ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยมีค่าเฉลี่ยทุกประชากรเท่ากับ 6.00 ± 1.67 (ตารางที่ 3)

4. Allelic richness (จำนวนอัลลีลที่เป็นอิสระต่อจำนวนตัวอย่างต่อตำแหน่ง)

ค่า Allelic richness ของประชากรอ่างทอง ($A_r = 9.66 \pm 4.56$) มีค่าสูงโดยไม่แตกต่างจากประชากรสุพรรณบุรี ($A_r = 6.92 \pm 2.98$) ($P > 0.05$) แต่มีค่าสูงกว่าประชากรนครปฐม ($A_r = 4.67 \pm 1.50$) และนครสวรรค์ ($A_r = 5.17 \pm 1.80$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนประชากรสุพรรณบุรี มีค่า A_r ไม่แตกต่างจากทั้งสองประชากรดังกล่าวโดยมีค่าเฉลี่ยทุกประชากรเท่ากับ 9.35 ± 2.61 (ตารางที่ 3)

5. ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี

ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) และค่าคาดหมาย (H_e) ของประชากรปลาอุกยักษ์ทั้ง 4 ประชากร (ตารางที่ 3) พบว่าค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตีของทุกประชากรมีค่าใกล้เคียงกัน และไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยค่าเฉลี่ย H_o จากทุกตำแหน่งมีค่าระหว่าง 0.50 – 0.69 ส่วนค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหมายมีความแตกต่างทางสถิติ โดยประชากรอ่างทอง สุพรรณบุรีและนครปฐมมีค่า H_e สูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ H_e ของประชากรอ่างทองมีค่าสูงกว่า นครสวรรค์ ($P < 0.05$) ส่วนประชากรสุพรรณบุรี นครปฐม และนครสวรรค์ มีค่า H_e ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่างเฉลี่ยในแต่ละประชากร, ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง, ค่าเฉลี่ย Effective number of alleles, ค่าเฉลี่ย Allelic richness, ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) และ ค่าคาดหมาย (H_e)

ประชากร	Mean no. of samples	Mean no. of alleles	Mean Effective no. of alleles	Mean Allelic richness	Mean heterozygosity	
					Observed	Expected
SP	64.0	9.33 ± 5.32	4.26 ± 1.52 ^a	6.92 ± 2.98 ^b	0.64 ± 0.48 ^a	0.75 ± 0.09 ^{ab}
AT	29.5	12.17 ± 6.50	5.80 ± 3.00 ^a	9.66 ± 4.56 ^{ab}	0.60 ± 0.47 ^a	0.80 ± 0.11 ^a
NP	16.0	4.67 ± 1.51	3.62 ± 1.19 ^{ab}	4.67 ± 1.50 ^b	0.50 ± 0.40 ^a	0.73 ± 0.09 ^{ac}
NS	33.0	6.0 ± 2.28	3.15 ± 0.97 ^b	5.17 ± 1.80 ^b	0.69 ± 0.10 ^a	0.67 ± 0.11 ^{bc}
Overall	142.5	16.67 ± 7.25	6.00 ± 1.67	9.35 ± 2.61	0.62 ± 0.34	0.84 ± 0.34

6. การทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium)

ผลการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (ภายหลังการปรับ null allele) (ตารางที่ 4) พบว่า ความถี่จีโนไทป์ของทุกประชากรยกเว้นนครสวรรค์ มีค่าเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก โดยมีโฮโมไซโกตมากกว่าค่าที่ควรเป็นตามทฤษฎีเมื่อดูจากค่า F_{IS} ซึ่งมีค่าเป็นบวกจึงได้ทดสอบการเกิด bottleneck ซึ่งหมายถึงการลดลงของจำนวนพ่อแม่พันธุ์ในชั่วอายุใดๆ ผลพบว่ามีเพียงประชากรจังหวัดนครสวรรค์ประชากรเดียว เท่านั้นที่ไม่เกิด bottleneck ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กข้างต้น

7. การทดสอบ Genotypic disequilibrium

จากการทดสอบ Genotypic disequilibrium พบว่าประชากรจังหวัดอ่างทองและนครสวรรค์ มีจีโนไทป์ที่ตำแหน่งหนึ่งเป็นอิสระจากจีโนไทป์ที่ตำแหน่งอื่นในไมโครแซทเทลไลต์ทุกตำแหน่งที่ทำการทดสอบ พบว่ามีไมโครแซทเทลไลต์บางตำแหน่งภายในประชากรจังหวัดสุพรรณบุรี (พบ Genotypic disequilibrium 4 คู่ตำแหน่ง) และนครปฐม (พบ Genotypic disequilibrium 7 คู่ตำแหน่ง) ที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 การทดสอบ Hardy-Weinberg Equilibrium ของประชากรปลาอุกยักษ์ทั้ง 4 ประชากร

ประชากร	Cga01		Cga02		Cga03		Cga06		Cga09		Cga10		F _{IS} ทุกตำแหน่ง
	F _{IS}	P-value	F _{IS}	P-value	F _{IS}	P-value	F _{IS}	P-value	F _{IS}	P-value	F _{IS}	P-value	
SP	0.954	0.0000*	1.000	0.0000*	-0.359	0.2294	-0.170	0.0100	-0.155	0.0000*	-0.155	0.0000*	0.147
AT	1.000	0.0000*	1.000	0.0000*	-0.105	0.5422	0.023	0.0046	-0.009	0.5520	-0.152	0.5847	0.259
NP	0.348	0.0000*	0.566	0.0000*	-0.075	0.0350	-0.239	0.0047	-0.037	0.0360	1.000	0.0000*	0.244
NS	0.125	0.0000*	-0.207	0.1945	-0.052	0.4484	0.009	0.1221	0.065	0.0173	-0.226	0.2537	-0.041

* $P < 0.0016$ (0.01/6) Bonferroni correction

ตารางที่ 5 การทดสอบ Genotypic disequilibrium ของประชากรปลาอุกยักษ์ทั้ง 4 ประชากร

ตำแหน่ง	<i>P</i> -value			
	SP	AT	NP	NS
Cga01 X Cga02	0.00000*	0.04329	0.00000*	0.42170
Cga01 X Cga03	0.46089	0.00894	0.18677	0.14500
Cga01 X Cga06	0.18205	0.59111	0.00000*	0.64609
Cga01 X Cga09	0.00000*	0.31648	0.00000*	0.00463
Cga01 X Cga10	0.64380	0.00679	0.00000*	0.04396
Cga02 X Cga03	0.74628	0.44259	0.03383	0.22397
Cga02 X Cga06	0.00000*	0.42569	0.00016	0.00748
Cga02 X Cga09	0.00000*	0.04461	0.00000*	0.59276
Cga02 X Cga10	0.06079	0.35988	0.00418	0.28570
Cga03 X Cga06	0.01018	0.02919	0.77923	0.09855
Cga03 X Cga09	0.51535	0.01898	0.16331	0.02921
Cga03 X Cga10	0.01509	0.46885	0.88852	0.11121
Cga06 X Cga09	0.72660	0.73830	0.00000*	0.02500
Cga06 X Cga10	0.16517	0.09272	0.00000*	0.15741
Cga09 X Cga10	0.85914	1.00000	0.00081	0.15048

* $P < 0.00067$ (0.01/15) Bonferroni correction

ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

1. ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F- coefficient)

ค่าความแตกต่างของอัลลีลระหว่างประชากร (F_{ST}) มีค่าเฉลี่ยของทุกตำแหน่งเท่ากับ 0.144 ± 0.26 ซึ่งมีค่าแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ทดสอบด้วยวิธี Bootstrapping ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %) ค่า F_{IS} และ F_{IT} มีค่าเท่ากับ 0.139 ± 0.162 ($P > 0.01$) และ 0.263 ± 0.139 ($P < 0.01$)

2. การทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากร

เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากรทั้ง 6 กลุ่มประชากรพบว่า ทุกกลุ่มประชากร มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรที่ไม่โครแซทเทลไลท์เกือบทุกตำแหน่ง (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 การทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรปลาอุกยักษ์ทั้ง 4 ประชากร

ประชากร	P- value						ทุกตำแหน่ง
	Cga01	Cga02	Cga03	Cga06	Cga09	Cga10	
SP-AT	0.00037 *	0.01272	0.00025 *	<0.00001 *	<0.00001 *	0.00254 *	<0.00001 *
SP-NP	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *
SP-NS	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	0.00004 *	<0.00001 *	<0.00001 *
AT-NP	0.00289 *	0.00117 *	<0.00001 *	<0.00001 *	0.01106	0.00252 *	<0.00001 *
AT-NS	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *
NP-NS	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *	<0.00001 *

* $P < 0.0083(0.05/6)$ Bonferroni correction

3. ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม

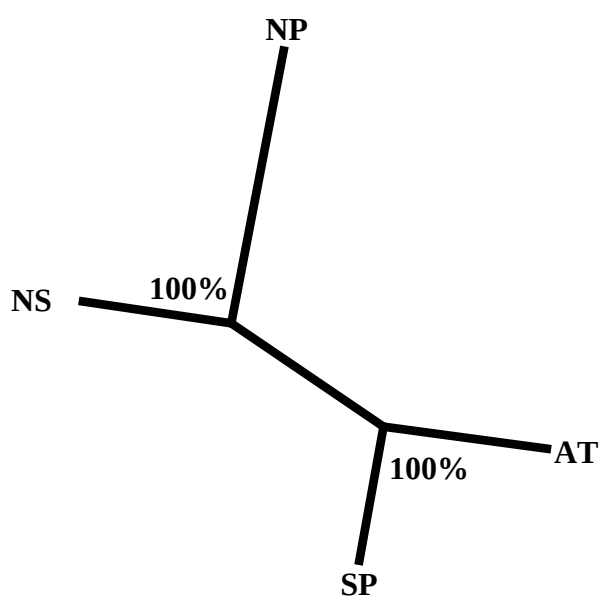
ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของปลาอุกยักษ์ทั้ง 4 ประชากร มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0356 – 0.1445 โดยประชากรที่มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ ประชากรจังหวัดอ่างทองกับจังหวัดสุพรรณบุรี ซึ่งมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.0356 ส่วนประชากรที่มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ ประชากรจังหวัดอ่างทองกับจังหวัดนครสวรรค์ ซึ่งมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.1445 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม ของปลาดุกยักษ์ทั้ง 4 ประชากร

ประชากร	SP	AT	NP	NS
SP	*			
AT	0.03565	*		
NP	0.12496	0.08276	*	
NS	0.14448	0.13850	0.10814	*

4. แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาดุกยักษ์

แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบ่งประชากรทั้งสี่ประชากร ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม สุพรรณบุรี-อ่างทอง และกลุ่ม นครปฐม-นครสวรรค์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การทำซ้ำสูงถึง 100% ในทุกจุดแยก (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA ของประชากรปลาดุกยักษ์

[เปอร์เซ็นต์ที่แสดง หมายถึง จำนวนร้อยละของซ้ำที่จุดแยก (node) นี้จะปรากฏเหมือนเดิมจากการสุ่ม 1,000 ครั้ง]

ผลของการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ปลาดุกยักษ์

จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดุกยักษ์ทั้ง 4 ประชากร จึงทำการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์จากประชากรที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มประชากร ได้แก่ ประชากรจังหวัดอ่างทอง และนครปฐม มาทำการผสมข้ามประชากร และนำมาศึกษาลักษณะที่สำคัญเปรียบเทียบกับประชากรพ่อแม่ ได้ผลดังต่อไปนี้

น้ำหนักตัว ความยาวทั้งหมด และอัตราการรอดของลูกปลาที่อายุ 5 สัปดาห์ จากการทดลองในถังไฟเบอร์ ปลาทุกชุดทดลองมีความยาวและน้ำหนัก ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีน้ำหนักเฉลี่ย 4.57-4.78 กรัม และความยาวเฉลี่ย 6.25-6.55 ซม. อัตราการรอดของปลาทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 60.2-66.8% (ตารางที่ 8)

น้ำหนักความยาวและอัตราการรอดของลูกปลาที่อายุ 10 และ 14 สัปดาห์ จากการทดลองในกระชัง เมื่อปลามีอายุ 10 สัปดาห์ ปลาที่เกิดจากการผสมภายในประชากรอ่างทอง (AT x AT) นครปฐม (NP x NP) และปลาลูกผสมระหว่างแม่ปลาอ่างทองกับพ่อปลานครปฐม (AT x NP) มีน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) (ตารางที่ 9) แต่มีน้ำหนักสูงกว่าลูกผสมกลับ (NP x AT) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามปลาลูกผสม NP x AT มีความยาวต่ำกว่า AT x AT เพียงชุดเดียว

เมื่อปลามีอายุ 14 สัปดาห์ ปลาทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ย ระหว่าง 123.22-133.32 กรัม และความยาวเฉลี่ย 24.85-25.66 เซนติเมตร ทั้งน้ำหนักและความยาวไม่แตกต่างกันระหว่างปลาแต่ละกลุ่ม อัตราการรอดของปลาทดลองไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก ความยาว และอัตราการรอด ของลูกปลาดุกยักษ์ทั้ง 4 กลุ่มที่อายุ 5 สัปดาห์จากการทดลองในถังไฟเบอร์

crosses	5 สัปดาห์		
	น้ำหนัก (g)	ความยาว (cm)	อัตราการรอด (%)
AT x AT	4.57 ± 1.38^a	6.55 ± 1.63^a	66.8 ± 6.4^a
NP x NP	4.76 ± 2.52^a	6.31 ± 1.41^a	66.4 ± 8.2^a
AT x NP	4.76 ± 1.16^a	6.44 ± 0.35^a	60.2 ± 11.1^a
NP x AT	4.78 ± 0.98^a	6.25 ± 0.78^a	63.4 ± 7.4^a

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก ความยาว และอัตราการรอด ของลูกปลาอุกยักษ์ทั้ง 4 กลุ่มที่อายุ 10-14 สัปดาห์ จากการทดลองในกระชัง

crosses	10 สัปดาห์		14 สัปดาห์		
	น้ำหนัก (g)	ความยาว (cm)	น้ำหนัก (g)	ความยาว(cm)	อัตราการรอด (%)
AT x AT	57.78 ± 28.28 ^a	16.96 ± 0.35 ^a	133.32 ± 46.52 ^a	25.66 ± 3.46 ^a	92.2 ± 7.5 ^a
NP x NP	47.54 ± 5.66 ^a	16.22 ± 1.06 ^{ab}	123.22 ± 46.94 ^a	25.19 ± 3.40 ^a	82.2 ± 6.9 ^a
AT x NP	50.13 ± 33.94 ^a	16.13 ± 4.24 ^{ab}	124.55 ± 40.87 ^a	25.39 ± 3.17 ^a	88.3 ± 11.7 ^a
NP x AT	31.68 ± 33.23 ^b	15.34 ± 6.08 ^b	126.87 ± 47.17 ^a	24.85 ± 3.53 ^a	96.0 ± 3.6 ^a

ค่า heterosis ของลูกผสม

ค่า heterosis ของน้ำหนักปลาอุกผสมที่อายุ 5 สัปดาห์ เท่ากับ 2.14 อายุ 10 สัปดาห์ เท่ากับ -22.31% และอายุ 14 สัปดาห์ เท่ากับ -2.00% ค่า heterosis ของความยาวปลาอุกผสมที่อายุ 5 สัปดาห์ เท่ากับ -1.24% อายุ 10 สัปดาห์ เท่ากับ -5.12% และอายุ 14 สัปดาห์ เท่ากับ -1.21% ค่า heterosis ของอัตราการรอดปลาอุกผสมที่อายุ 5 สัปดาห์ เท่ากับ -7.2 14% และที่อายุ 10 สัปดาห์ เท่ากับ 5.67%

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรค

1. การศึกษา Antibody titre โดยวิธี Agglutination

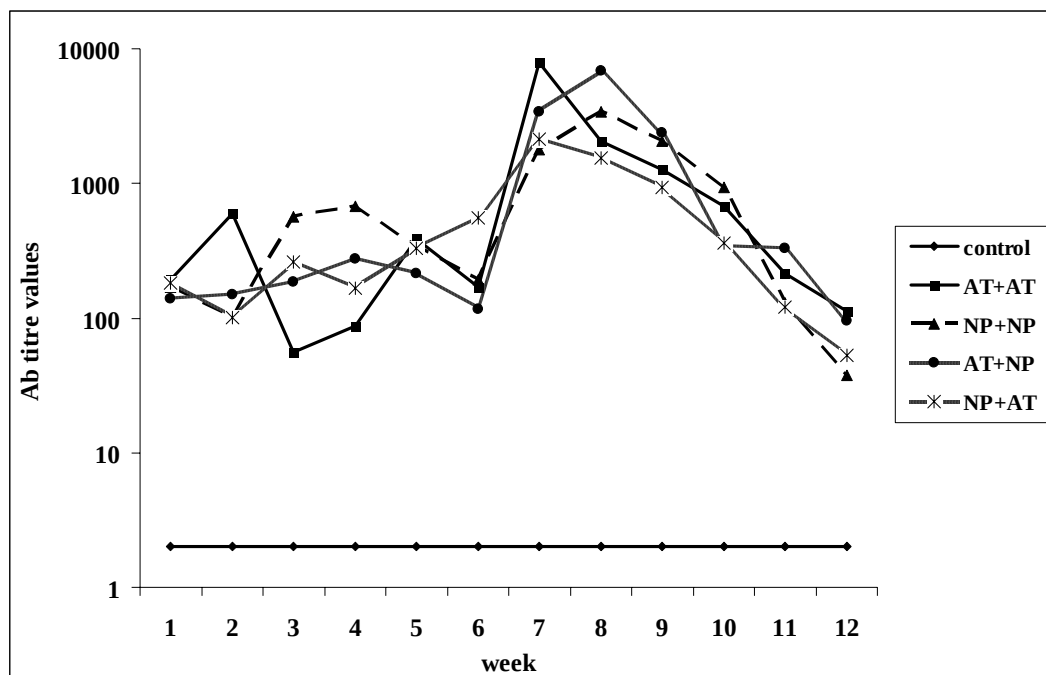
ผลการศึกษาค่า Antibody titre ของปลาทดลอง หลังการฉีดวัคซีนครั้งแรก(first vaccination) ปลาทดลองแต่ละกลุ่มมีการตอบสนองโดยแสดงค่า Antibody titre ไปในทิศทางที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 2) อย่างไรก็ตามระดับของ Antibody titre มีความแตกต่างทางสถิติในสัปดาห์ที่ 2 ของการกระตุ้นด้วยวัคซีนครั้งแรกเท่านั้น โดยพบว่ากลุ่ม AT x AT มีค่า Antibody titre สูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 597.33 ± 349.76 หลังการจากการกระตุ้นด้วยวัคซีนซ้ำอีกครั้ง (Booster) พบว่าปลาทุกกลุ่มมีการตอบสนองโดยมีค่า Antibody titre สูงขึ้นอย่างชัดเจนในสัปดาห์ที่ 7 และ 8 จากนั้นค่อยๆลดต่ำลงโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 10 เท่านั้น ซึ่งพบว่ากลุ่ม AT x AT และ NP x NP มีค่า Antibody titre สูงกว่าลูกผสมทั้ง 2 แบบ (AT x NP และ NP x AT)

ค่า heterosis ของ Antibody titre ในสัปดาห์ที่ 2 และสัปดาห์ที่ 10 มีค่าเท่ากับ -64.12% และ -56.58% ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ย Antibody titre และค่าเปอร์เซ็นต์ heterosis ของปลาอุกผสมภายในประชากรและระหว่างประชากรทั้ง 4 กลุ่มและกลุ่มควบคุม

week	control	AT x AT	NP x NP	AT x NP	NP x AT	%Heterosis
0	2	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	0
1	2	192.0 ± 171.73 ^a	170.67 ± 187.32 ^a	138.67 ± 62.92 ^a	181.33 ± 85.07 ^a	-11.77
2	2	597.33 ± 349.76 ^b	101.33 ± 82.00 ^a	149.33 ± 52.26 ^a	101.33 ± 82.00 ^a	-64.12
3	2	56.0 ± 40.16 ^a	560.6 ± 823.03 ^a	186.67 ± 176.92 ^a	261.33 ± 384.22 ^a	-27.34
4	2	88.0 ± 91.46 ^a	682.67 ± 753.64 ^a	277.33 ± 125.85 ^a	165.33 ± 192.18 ^a	-42.56
5*	2	389.33 ± 382.08 ^a	341.33 ± 192.71 ^a	216.00 ± 232.03 ^a	330.67 ± 208.04 ^a	-25.18
6	2	170.67 ± 170.13 ^a	192.00 ± 70.11 ^a	117.33 ± 26.13 ^a	554.67 ± 731.58 ^a	85.29
7	2	7850.67 ± 7025.17 ^a	1792.00 ± 627.07 ^a	3413.33 ± 1057.58 ^a	2133.33 ± 1600.09 ^a	-42.48
8	2	2048.00 ± 1121.74 ^a	3413.33 ± 1057.58 ^a	6826.67 ± 7408.08 ^a	1541.33 ± 845.29 ^a	53.22
9	2	1280.00 ± 627.07 ^a	2048.00 ± 1121.74 ^a	2389.33 ± 1399.05 ^a	938.67 ± 598.55 ^a	0
10	2	682.67 ± 264.40 ^a	938.67 ± 209.02 ^a	341.33 ± 132.20 ^b	362.67 ± 170.13 ^b	-56.58
11	2	213.33 ± 155.02 ^a	129.33 ± 78.45 ^a	330.67 ± 208.04 ^a	120.67 ± 113.54 ^a	31.72
12	2	112.00 ± 80.32 ^a	37.33 ± 21.86 ^a	96.00 ± 35.05 ^a	53.33 ± 42.53 ^a	0

*booster สัปดาห์ที่ 5



ภาพที่ 2 กราฟแสดงค่าเฉลี่ย Antibody titre ของปลาลูกผสมภายในประชากรและระหว่างประชากร ทั้ง 4 กลุ่ม และกลุ่มควบคุม

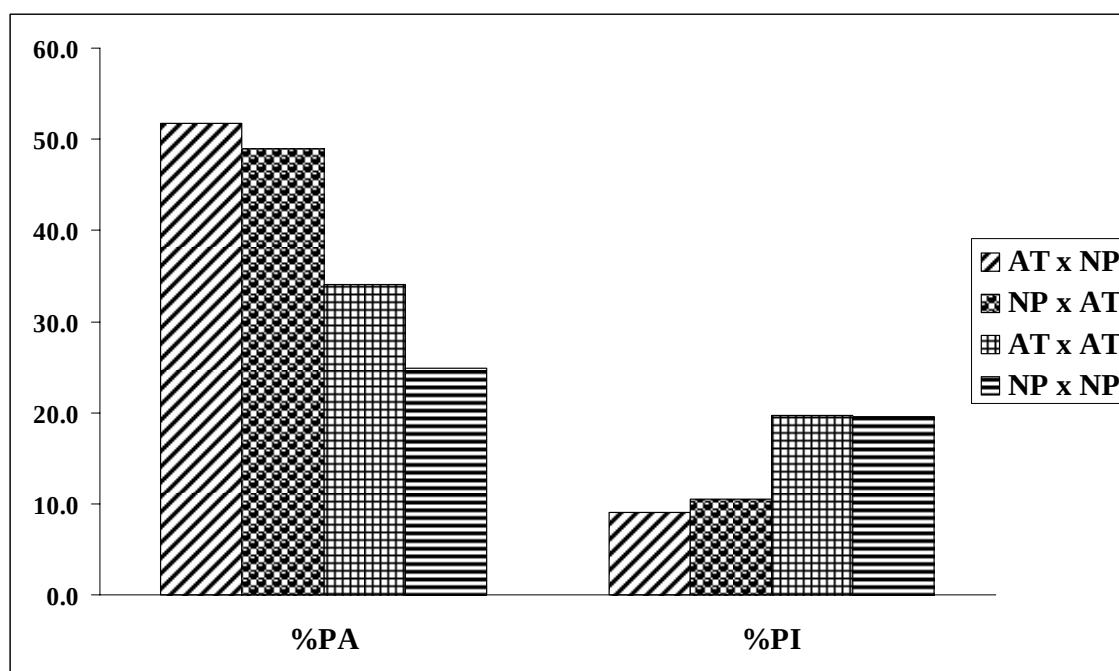
2. การศึกษา Phagocytosis ของ peripheral blood leukocytes (PBLs)

ปลาลูกผสม AT x NP มีค่า เปอร์เซ็นต์ Phagocytosis activity ($PA=51.8 \pm 3.6\%$) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มประชากรพ่อแม่ (AT x AT และ NP x NP) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนปลาลูกผสมสลับ NP x AT แม้มีค่า PA สูง ($48.9 \pm 2.3\%$) และไม่แตกต่างจาก ลูกผสม AT x NP แต่ก็ไม่ได้แตกต่างจากกลุ่ม AT x AT ($PA=34.0 \pm 8.8\%$) เช่นเดียวกัน แต่มีค่าสูงกว่าประชากรพ่อแม่ NP x NP ($P<0.05$) ซึ่งมีค่า PA เท่ากับ $24.9 \pm 3.1\%$ ส่วนค่า heterosis ของค่า Phagocytic activity มีค่าเท่ากับ 70.97%

เปอร์เซ็นต์ Phagocytic index ของลูกผสมทั้ง 4 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยกลุ่ม AT x AT มีค่าเท่ากับ $19.7 \pm 11.9\%$ กลุ่ม NP x NP ลูกผสม NP x AT และ AT x NP มีค่าเท่ากับ $19.6 \pm 4.7\%$, $10.5 \pm 3.7\%$ และ $9.0 \pm 0.4\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 11 และ ภาพที่ 3) ค่า heterosis Phagocytic index = -50.38% (ลักษณะการกลืนกินเชื้อโรคของ peripheral blood leukocytes (PBLs) ในแง่ของ Phagocytosis activity และ Phagocytic index แสดงในภาพผนวก ก 2)

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์ Phagocytosis activity และ เปอร์เซ็นต์ Phagocytic index ของลูกผสม
ทั้ง 4 กลุ่ม

กลุ่มลูกผสม	%PA	%PI
AT x AT	34.0 ± 8.8^{ac}	19.7 ± 11.9^a
NP x NP	24.9 ± 3.1^a	19.6 ± 4.7^a
AT x NP	51.8 ± 3.6^b	9.0 ± 0.4^a
NP x AT	48.9 ± 2.3^{bc}	10.5 ± 3.7^a



ภาพที่ 3 แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์ Phagocytosis activity และ เปอร์เซ็นต์
Phagocytic index ของลูกผสมทั้ง 4 กลุ่มเปรียบเทียบกัน

ความหลากหลายของยีน Major histocompatibility complex class I

1. specific primer ของยีน MHC class I ในปลาอุกยักษ์ มีลำดับเบสดังนี้

Forward 5' GGGTCAGGTGGATGGACAGCAG 3' (22 nt)

Reverse 5' GGGAAGAAACCTGTAGCGTGAC 3' (22 nt)

2. จากการศึกษาลำดับ haplotypes ของยีน MHC class I ทั้งสิ้น 20 haplotypes ผลการทำ sequences alignment เปรียบเทียบความแปรผันของทุก haplotypes (ภาพที่ 4) จะเห็นว่าบริเวณช่วงรอยต่อระหว่างส่วนปลายของ $\alpha 1$ กับ $\alpha 2$ domain และส่วนของ $\alpha 2$ domain ทั้งหมด ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการจับกับเชื้อโรคอย่างจำเพาะเจาะจงมีความแปรผันสูงสุด (partial sequences ของยีน MHC class I ทั้ง 20 haplotypes แสดงในภาคผนวก ข) โดยพบมากที่สุดในการประชากร AT x AT (8 haplotypes) รองลงมาคือลูกผสม AT x NP (7 haplotypes) NP x NP (6 haplotypes) และ NP x AT (5 haplotypes) จำนวน polymorphic sites มีค่าสูงในลูกผสมทั้งสองแบบ โดยมีค่า 219 และ 215 ในลูกผสม AT x NP และ NP x AT ตามลำดับ ประชากรพ่อแม่พันธุ์มีจำนวน polymorphic sites เท่ากับ 214 และ 167 ในประชากร AT x AT และ NP x NP ตามลำดับ

ค่า Average gene diversity over loci และค่า Mean no. of pairwise differences ของลูกผสมมีค่าค่อนข้างสูง โดย NP x AT มีค่าสูงกว่า NP x NP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่มีค่าไม่แตกต่างจาก AT x AT ($P > 0.05$) ส่วน AT x NP มีค่าไม่แตกต่างทางสถิติจากประชากรพ่อแม่พันธุ์ทั้ง 2 ประชากร (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 แสดงค่า No. of haplotype, No. of polymorphic sites, Average gene diversity over loci และ Mean no. of pairwise differences ของแต่ละประชากร

กลุ่มลูกผสม	AT x AT	NP x NP	AT x NP	NP x AT
No. of haplotype	8	6	7	5
No. of polymorphic sites	214	167	219	215
Average gene diversity over loci	0.18 ± 0.10^a	0.13 ± 0.07^b	0.17 ± 0.09^{ab}	0.18 ± 0.10^a
Mean no. of pairwise differences	101.46 ± 48.44^a	70.75 ± 33.88^b	95.43 ± 45.58^{ab}	98.25 ± 46.92^a

Hap07 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGATTGACTACTATGACAGTAAGATCAGGAAAATGATCCCGAAGACGGAGTGGATACAGAAGCATGAGGGAGAC----- 94
Hap08 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGGAAGACGATCCCAAAGACGGAGTGGATACAGAAGCATGAGGGAGAC----- 94
Hap03 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGATGATCCCAAAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGAC----- 94
Hap04 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGATGATCCCAAAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGAC----- 94
Hap05 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGATGATCCCAAAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGAC----- 94
Hap02 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGATGATCCCAAAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGAC----- 94
Hap06 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGATGATCCCAAAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGAC----- 94
Hap01 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGATGATCCCAAAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGAC----- 94
Hap15 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGGAGAATGATCCCAAAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGACGAT--- 97
Hap16 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTACGTTCTATGACAGTAAGATCAGGAAGTCGATCCCAAAGACGGAGTGGATAAAGAAGAATGAGGGAGACGAT--- 97
Hap17 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGGAGAATAATCCCGAAGACGGAGTGGATAAAGAAGAATGATGCTGAAGATCCA 100
Hap10 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTACGTTCTACGACAGTAACAAAAGGAGCTACATTCCCAAAGACTGACTGGATAAAGAAGAATGAGGGAGA-----A 94
Hap11 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTACGTTCTACGACAGTAACAAAAGGAGCTACATTCCCAAAGACTGACTGGATAAAGAAGAATGAGGGGAGA-----A 94
Hap09 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGCTTACTATGACAGTAAGATCAGGAAGTACATCCCAAAGACGGAGTGGCTACAGAAGGTTGATGCTGATGATCCA 100
Hap14 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGATTGACTACTATGACAGTAAGATCAGGGAATGATCCCGAAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGA-----C 94
Hap12 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGAAGATCCCAAAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGAC----- 94
Hap13 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGGAGAATGATCCCAAAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGAC----- 94
Hap18 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGTGTACTATGACAGTAAGATCAGGAGTTACATCCCGAAGACGGAGTGGATACGGAAGATCGATGCTGATGAACCA 100
Hap19 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGTGTACTATGACAGTAAATCAGGAGTTACATCCCGAAGACGGAGTGGATACGGAAGATCGATGCTGATGAACCA 100
Hap20 GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGTGTACTATGACAGTAAATCAGGAGTTACATCCCGAAGACGGAGTGGATACGGAAGATCGATGCTGATGAACCA 100
***** ** * ** *

$\alpha 1$

Hap07 GATTATTGGAGCAGAAACACACAGAATATGCAGAGTACTCAGGAGACCTACAAAGTCCATGTGGCCATAGCAATGCAGCGTTTTAATCAGACTAAA 190
Hap08 GATTACTGGAGCAGAAACACACAGAATATGCAGGGTCAGGAGGAGACCTACAAAGTCCATGTGGCCATAGCAATGCAGCGTTTTAATCAGACTAAA 190
Hap03 GATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATCAGTCAGGGTAATGAGGAGACCTACAAAGTCAATGTGGGTAATCTGATGGGTCGTTTTAACCAGACTAAA 190
Hap04 GATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATCAGTCAGGGTAATGAGGAGACCTACAAAGTCAATGTGGGTAATCTGATGGGTCGTTTTAACCAGACTAAA 190
Hap05 GATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATCAGTCAGGGTAATGAGGAGACCTACAAAGTCAATGTGGGTAATCTGATGGGTCGTTTTAACCAGACTAAA 190
Hap02 GATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATCAGTCAGGGTAATGAGGAGACCTACAAAGTCAATGTGGGTAATCTGATGGGTCGTTTTAACCAGACTAAA 190
Hap06 GATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATCAGTCAGGTAATGAGGAGACCTACAAAGTCAATGTGGGTAATCTGATGGGTCGTTTTAACCAGACTAAA 190
Hap01 GATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATCAGTCAGGGTAATGAGGAGACCTACAAAGTCAATGTGGGTAATCTGATGGGTCGTTTTAACCAGACTAAA 190
Hap15 ---TATTGGAGCAGAGAGACACAGATTCTGCAGGGTACTCAGGAGAGCTTCAAAGCCAGTGTGGGTATAGTGATGGAGCGTTTTAACCAGACTAAT 190
Hap16 ---TATTGGAGCGGAGAGACACAGAAAATGCAGGGTACTGAGGAGAGCTTCAAAGCCAGTGTGGGTATCTGATGCAGCGTTTTAACCAGACTAAA 190
Hap17 GAGTACTGGAACAGAAACACACAGACTGCACAGGGTACTGAGGAGACCTTCAAAGTCGGTGTGGGTATAGTGATGGGTCGTTTTAACCAGACTAAA 196
Hap10 GATTATTGGAGCAGAGAGACACAGCGCTGTCAATGATCAGGACTTATTCAAAGTCAATATGGGTACACTGATGGGTCGTTTTAACCAGGCTAAA 190
Hap11 GATTATTGGAGCAGAGAGACACAGCGCTGTCAATGATCAGGACTTATTCAAAGTCAATATGGGTACACTGATGGGTCGTTTTAACCAGACTAAA 190
Hap09 AATTACTGGACCAGAAACACAAACATCTGCAGGGTCTCAGGAGACCTTTAAAGTCGATATGGGTACACTGATGAGCCGCTTTAACCAGACTAAA 196
Hap14 GATTATTGGAGCAGAGAGACACAGAAACAGCAGGGTACTGAGGAGACCTTCGAAGCCGGTGTGGGTGCACTGATGGGTCGTTTTAACCAGACTAAA 190
Hap12 GATTACTGGAGCAGGGGCACACAGATCAGGCAGGGTAATCAGGAGTGGTTCAAAGCCAATATACCTATAGCAATGCAGCGCTTTAATCACACTAAA 190
Hap13 GATTATTGGAGCAGAGACACAGATTCTGCAGGGTACTCAGGAGACTGTCAAAGCCAGTGTGGGTATAGTGATGGAGCGTTTTAACCAGACTAAT 190
Hap18 CATTGCTGGGACAGTGAGACCCGGATTGCACGGGTTGAAGAACAGAGCTTCAAAGCCAGTGTAGCTAAAGTGATGCAGCGCTTTAATCAAACCTCAA 196
Hap19 CATTACTGGGACAGTGAGACCCGGATTGCACGGGTTGAAGAACAGAGCTTCAAAGCCAGTGTAGCTAAAGTGATGCAGCGCTTTAATCAAACCTCAA 196
Hap20 CATTACTGGGACAGTGAGACCCGGATTGCACGGGTTGAAGAACAGAGCTTCAAAGCCAGTGTAGCTAAAGTGATGCAGCGCTTTAATCAAACCTCAA 196
* ** * * * * * * * * * * * * * * *

$\alpha 1$

ภาพที่ 4 ผลการทำ sequences alignment เปรียบเทียบความผันแปรของ MHC class I ของปลาอุกยักษ์ทั้ง 20 haplotypes

Hap07 GGAGTTACACAGTGCAGTACATGTGTGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CGGCACCACTAGAGGATACAGACGGTACGGTTACGATGGAGAGGA 282
Hap08 GGTGTTACACAGTGCAGTACATGTGTGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CGGCACCACTAGAGGATACAGACAGTACGGTTACGATGGAGAGGA 282
Hap03 GGAGTTACACATGGCAGAGGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CAACACCGTTAGAGGATACAGCCAGTGGGGTTATGATGGAGAAGA 282
Hap04 GGAGTTACACATGGCAGAGGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CAACACCGTTAGAGGATACAGCCAGTGGGGTTATGATGGAGAAGA 282
Hap05 GGAGTTACACATGGCAGAGGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CAACACCGTTAGAGGATACAGCCAGTGGGGTTATGATGGAGAAGA 282
Hap02 GGAGTTACACATGGCAGAGGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CAACACCGTTAGAGGATACAGCCAGTGGGGTTATGATGGAGAAGA 282
Hap06 GGAGTTACACATGGCAGAGGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CAACACCGTTAGAGGATACAGCCAGTGGGGTTATGATGGAGAAGA 282
Hap01 GGAGTTACACATGGCAGAGGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CAACACCGTTAGAGGATACAGCCAGTGGGGTTATGATGGAGAAGA 282
Hap15 GGAGTTACACAGTGCAGCTGATGTACGGCTGTGAGCTGAATGATGA --- CGGCACCACTAGAGGATACTACCACTTCGGTTATGATGGAGAAGA 282
Hap16 GGAGTTACACATGGCAGATGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CGGCACCACTAGAGGATACTACCACTTCGGTTATGATGGAGAAGA 282
Hap17 GGAGTTACACAGTGGCAGCAGATGTACGGCTGTGAGCTGAATGATGATGACGGCACCCTAGAGGATACATGCAGTTCGGTTATGATGGAGAGGA 291
Hap10 GGAGTTACACATGGCAGAACATGTACGGCTGTGAGTTGGATGATGA --- CGGCACCACTAGAGGATATGATCAGTACGGTTATGATGGAGAAGA 282
Hap11 GGAGTTACACATGGCAGAACATGTACGGCTGTGAGTTGGATGATGA --- CGGCACCACTAGAGGATATGATCAGTACGGTTATGATGGAGAAGA 282
Hap09 GGAGTTACACAATACAGGAGATGTACGGCTGTGAGTTGGATGATGA --- CGGCACCACTAGAGGATACTATCAGGACAGTTATGATGGAGAAGA 288
Hap14 GGAGTTACACAGTACAGATGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CGGCACCACTAGAGGATACGAACAGTGGGGGTATGATGGAGAAGA 282
Hap12 GGAGTTACACAGTACAGGTGATGTTGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CGGCACCACTAGAGGATACGATCAGTACGGTTATGATGGAGAAGA 288
Hap13 GGAGTTACACAGTGCAGCTGATGTACGGCTGTGAGCTGAATGATG --- GCTCAAATACAGGATATTTCCAGTACGGTTATGATGGAGAGGA 279
Hap18 GGAGTTACACAGTGCAGGAGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CGGCACCACTAGAGGATACAGACAGTACGGATATGATGGAGAAGA 288
Hap19 GGAGTTACACAGTGCAGGAGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CGGCACCACTAGAGGATACAGACAGTACGGATATGATGGAGAAGA 288
Hap20 GGAGTTACACAGTGCAGGAGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGA --- CGGCACCACTAGAGGATACAGACAGTACGGATATGATGGAGAAGA 288
*** **

α_2

Hap07 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap08 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap03 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap04 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap05 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap02 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap06 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap01 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap15 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap16 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap17 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap10 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap11 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap09 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap14 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap12 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap13 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap18 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap19 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
Hap20 TTTCTCATATATGATCTGAAAACCTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGATGCTGCTGATA 377
*** **

α_2

ภาพที่ 4 (ต่อ)

Hap07 TGAATTATCGAAAGAACTACCTGGAGAAAAGAGTGTATCGAGTGGTTAAAGAAGTATCTGTCTTATGGCAGAGAGACTCTG 457
Hap08 TGAATTATCGAAAGAACTACCTGGAGAAAAGAGTGTATCGAGTGGTTAAAGAAGTATCTGTCTTATGGCAGAGAGACTCTG 457
Hap03 CTGTGGGCAGGAAGAAGAACTACCTGGAGAAAACCTGTATTGAGTGGTTAAAGAAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACTCTG 457
Hap04 CTGTGGGCAGGAAGAAGAACTACCTGGAGAAAACCTGTATTGAGTGGTTAAAGAAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACTCTG 457
Hap05 CTGTGGGCAGGAAGAAGAACTACCTGGAGAAAACCTGTATTGAGTGGTTAAAGAAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACTCTG 457
Hap02 CTGTGGGCAGGAAGAAGAACTACCTGGAGAAAACCTGTATTGAGTGGTTAAAGAAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACTCTG 457
Hap06 CTGTGGGCAGGAAGAAGCTACCTGGAGAAAACCTGTATTGAGTGGTTAAAGAAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACTCTG 457
Hap01 CTGTGGGCAGGAAGAAGAACTACCTGGAGAAAACCTGTATTGAGTGGTTAAAGAAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACTCTG 457
Hap15 ATAAGCGCAGGGAGGACTACCTGAAGAACATCTGTATCGACTGGTTAAAGAAGTACATGAATTACGGCAGACAGACTCTG 457
Hap16 ATAAGCGCAGGGAGGACTACCTGAAGAACATCTGTATCGACTGGTTAAAGAAGTACATGAATTACGGCAGACAGACTCTG 457
Hap17 ATAAGGGAACAGAGGACTACCTGAAGAACGAGTGTATCGAGTGGTTAAATAAGTACGTGTCATACGGCAGAGAGACTCTG 466
Hap10 ATAATTACCTGAAGAAGTATTATGAGAACACCTGTATCGAGTGGTTAAAGAAGTACCTGACTTACGGCAAAGAGACTCTG 457
Hap11 ATAATTACCTGAAGAAGTATTATGAGAACACCTGTATCGAGTGGTTAAAGAAGTACCTGACTTACGGCAAAGAGACTCTG 457
Hap09 ATAATAACTGGAAGAAGTACCTGGAGAAAGGAGTGTATCGACTGGTTAAAGAAGTACGTGTCATACGGCAGAGAGACTCTG 463
Hap14 ATGATTACCTGAAGGGTACTATGAGAAAGAGTGTATCGAGTGGATAAAGAAGTACGTGTCCTTATGGCAGAGAGACTCTG 457
Hap12 AGAATAACTGGAAGAAGTACCTGGAGAACGAGTGTATTGAGTGGTTAAAGAAGTACGTGTCATACGGCAGAGAGACTCTG 463
Hap13 CTGATTACTGGAAGGGTACGCGGAGAACACCTGTATCGAGTGGTTAAATAAATACGTGTCATACGGCAGAGAGACTCTG 454
Hap18 CAGATTACTGGAAGAAGTACCTGGAGAACACCTGCATCGACTGGTTAAAGAAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACGCTG 463
Hap19 CAGATTACTGGAAGAAGTACCTGGAGAACACCTGCATCGACTGGTTAAAGAAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACGCTG 463
Hap20 CAGATTACTGGAAGAAGTACCTGGAGAACACCTGCATCGACTGGTTAAAGAAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACGCTG 463

* * * * *

α_2

Hap07 GAGAGAAAAGTTCGTCTGAGGTGTTAGTGTTCGAAGAAGAAGCCACTTCTCCAGAGGTGGTGTGCACGCTACAGGCTTTTACCC 543
Hap08 GAGAGGAAAGTTCGTCTGAGGTGTTAGTGTTCGAAGAAGAAGCCACTTCTCCAGAGGTGGTGTGCACGCTACAGGCTTTTACCC 543
Hap03 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGATGTCACTCTTTTCAGGAAGATGCCACTTATCCAGAGGTGGTGTGCCACGCTACAGGCTTCTTCCC 543
Hap04 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGATGTCACTCTTTTCAGGAAGATGCCACTTATCCAGAGGTGGTGTGCCACGCTACAGGCTTCTTCCC 542
Hap05 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGATGTCACTCTTTTCAGGAAGATGCCACTTATCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTCTTCCC 543
Hap02 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGATGTCACTCTTTTCAGGAAGATGCCACTTATCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTCTTCCC 543
Hap06 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGATGTCACTCTTTTCAGGAAGATGCCACTTATCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTCTTCCC 543
Hap01 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGATGTCACTCTTTTCAGGAAGATGCCACTTATCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTTTACCC 543
Hap15 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGTTCAGGAAGAGTCT --- TCTCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTCTTCCC 540
Hap16 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGTTCAGGAAGAGTCT --- TCTCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTTTACCC 540
Hap17 GAGAGGAAAGTTCGTCTGAGGCGTTAGTGTTCAGGAAGAGTCT --- TCTCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTTTACCC 549
Hap10 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGTTCAGGAAGAGTCT --- TCTCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTTTACCC 540
Hap11 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGTTCAGGAAGAGTCT --- TCTCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTCTTCCC 540
Hap09 GAGAGGAAAGAGCATCCCAAGGCGTCAGTGTTCGAGAAACAGTCTCCTTCTCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTCTTCCC 549
Hap14 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGTTCAGGAAGAGTCT --- TCTCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTCTTCCC 540
Hap12 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGTTCAGGAAGAGTCT --- TCTCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTCTTCCC 540
Hap13 GAGAGGAAAGTTCGTCTGAGGCGTTAGTGTTCAGGAAGAGTCT --- TCTCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTTTACCC 537
Hap18 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGTTCAGGAAGAGTCT --- TCTCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTCTTCCC 546
Hap19 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGTTCAGGAAGAGTCT --- TCTCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTCTTCCC 546
Hap20 GAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGTTCAGGAAGAGTCT --- TCTCCAGAGGTGGTGTGTGCACGCTACAGGCTTTTACCC 546

* * * * *

α_3

ภาพที่ 4 (ต่อ)

วิจารณ์ผลการทดลอง

ค่า F_{ST} ซึ่งเป็นค่าที่แสดงระดับความแตกต่างของความถี่ของยีนระหว่างประชากรย่อย มีค่าสูงและแตกต่างจาก 0 แสดงว่าประชากรปลาอุกยักษ์ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจริง โดยค่าเฉลี่ย F_{ST} เท่ากับ 0.1444 จัดเป็นค่าระดับปานกลาง (Wright, 1978) แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบ่งประชากรออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกได้แก่ จังหวัดอ่างทองและสุพรรณบุรี กลุ่มที่ 2 ได้แก่ จังหวัดนครปฐมและนครสวรรค์ การที่ประชากรแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มที่มีพันธุกรรมต่างกัน อาจมีสาเหตุจากการที่แต่ละกลุ่มมีประชากรเริ่มต้น (founder) ต่างกัน หรืออาจเกิดจากประชากรเดียวกันแต่เกิดการขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) ประกอบกับในระยะต่อมา มีการถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างกันน้อย (Falconer and Mackay, 1996; Allendorf and Luikart, 2007) แม้จะไม่มีหลักฐานอื่นๆยืนยัน แต่มีความเป็นไปได้มากกว่า สองกลุ่มประชากรนี้อาจมีบรรพบุรุษจากประชากรปลาอุกยักษ์ 2 ประชากรที่มีถิ่นกำเนิดใน Central African Republic และ ประเทศอียิปต์ เช่นที่ Li *et al.* (2000) ได้รายงานไว้

เมื่อพิจารณาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร พบว่า ประชากรจังหวัดอ่างทอง มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด ซึ่งแสดงว่าโรงเพาะฟักแห่งนี้ ใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนค่อนข้างมาก ส่วนประชากรจังหวัดนครปฐมมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำที่สุด ในขณะที่พบว่า ประชากรนี้ไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก โดยมีไฮโมไซโกตสูงกว่าที่ควรจะเป็น และยังพบ genetic disequilibrium ซึ่งแสดงว่ามีการนำพ่อแม่พันธุ์จากแหล่งอื่นเข้ามาผสม แต่ประชากรใหม่ที่น่าเข้ามานั้น อาจมีจำนวนน้อย หรือมีพันธุกรรมที่ไม่แตกต่างจากประชากรเดิมมากนัก ประกอบกับอาจมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำด้วย จึงไม่มีผลในการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรจังหวัดนครปฐม

ในภาพรวมประชากรปลาอุกยักษ์ ในโรงเพาะฟักของไทย มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยในปลาน้ำจืดทั่วไป แต่มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งค่อนข้างต่ำ (ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาน้ำจืด: $A=9.1$; $H_o=0.54$; De Woody and Avise, 2000) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับความหลากหลายของปลาอุกยู่ ที่ศึกษาด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เนื่องจากไม่มีข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์ในปลาอุกยักษ์เพื่อมาเปรียบเทียบ พบว่า ปลาอุกยักษ์จากโรงเพาะฟักนี้มีความหลากหลายไม่แตกต่างจากปลาอุกยู่ธรรมชาติ ($A_e=3.6-6.0$; $H_o=0.62-0.72$; Na-Nakorn *et al.*, 1999; $A_e=8.4-13.6$; $H_o=0.64-0.76$; ศรีจรรยา, 2546) ซึ่งปลาอุกยู่มีแนวโน้มจะมีความหลากหลายต่ำกว่าปลาอุกยักษ์เนื่องจากปลาอุกยู่อาศัยอยู่ตามหนองน้ำซึ่งส่วนใหญ่มี

ขนาดเล็กทำให้มีประชากรขนาดเล็ก ในขณะที่ปลาดุกยักษ์อาศัยอยู่ในแม่น้ำ จึงมีประชากรขนาดใหญ่กว่า (Na-Nakorn *et al.*, 2004)

การที่มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งต่ำ แสดงว่าประชากรเหล่านี้เคยผ่านปรากฏการณ์ bottleneck ในอดีต แต่ในระยะต่อมาอาจมี effective population size เพิ่มขึ้น จึงทำให้ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีไม่ลดต่ำลงมาก (Allendorf, 1986) โดยทั่วไปประชากรโรงเพาะฟักมักมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าประชากรธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ การใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อยในประชากรเริ่มต้น มีผลให้จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งลดลง (Allendorf and Phelps, 1980) นอกจากนั้นเมื่อทำการผสมโดยใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อยในชั่วอายุต่อมา ก็จะทำให้เกิดการผสมเลือดชิด ความหลากหลายทางพันธุกรรมก็ยิ่งต่ำลง จากการติดตามประวัติการนำปลาดุกยักษ์มาเลี้ยงในประเทศไทยเชื่อว่าพ่อแม่พันธุ์ซึ่งนำมาจากประเทศ ลาวคงมาจากพ่อแม่พันธุ์ไม่กี่คู่ การที่พบว่าความหลากหลายไม่ลดลงอาจเนื่องมาจากการนำปลาจากแหล่งอื่นๆ เข้ามาผสม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Li *et al.* (2000) ซึ่งศึกษาไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอและพบว่าปลาดุกยักษ์ในประเทศไทย น่าจะมาจากปลาอย่างน้อย 2 แหล่ง นอกจากนั้นเกษตรกรคงจะมีการจัดการพ่อแม่พันธุ์ที่ระดับหนึ่ง เช่นอาจใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนมาก ทำให้สามารถรักษาความหลากหลายไว้ได้ระดับหนึ่ง เช่นเดียวกับที่พบในปลากัดในจังหวัดนครปฐม (Meejui *et al.*, 2005)

ปลาดุกจากโรงเพาะฟักต่างๆมีพันธุกรรมแตกต่างกัน นับเป็นสิ่งที่ดี เพราะนักปรับปรุงพันธุ์จะสามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มความหลากหลายภายในประชากร โดยการผสมข้ามประชากร (Falconer and Mackay, 1996) การที่ปลาบางประชากร (อ่างทอง) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง โดยเฉพาะการมีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งสูงจะเป็นประโยชน์ในการปรับตัวกับสภาพแวดล้อม (Allendorf, 1986)

จากผลการทดสอบฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กพบว่าประชากรที่ออกนอกสมมูลมีค่า F_{IS} บางตำแหน่งเป็นลบ และบางตำแหน่งมีค่าเป็นบวก แต่เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ย F_{IS} รวมทุกตำแหน่งแล้วให้ผลเป็นค่าบวกแสดงให้เห็นถึง homozygote excess ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการผสมเลือดชิด ซึ่งผลทดสอบการเกิด bottleneck พบการเกิด bottleneck ในประชากรจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม และนครสวรรค์ การลดลงของจำนวนพ่อแม่พันธุ์อันเนื่องมาจากปรากฏการณ์ bottleneck นี้ อาจนำไปสู่การผสมเลือดชิดได้ในที่สุด อย่างไรก็ตามการพบ Genotypic disequilibrium ในประชากรสุพรรณบุรี และนครปฐม ซึ่งมี homozygote excess แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างนี้ประกอบด้วยปลามากกว่าหนึ่งประชากรรวมอยู่ในตัวอย่างจากโรงเพาะฟักหนึ่งๆ (Wahlund effect) (Allendorf and Luikart, 2007)

ผลการศึกษานี้สามารถนำมาใช้พิจารณาคัดเลือกประชากร 2 ประชากรเพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ สำหรับการผสมข้าม คือ ประชากรจังหวัดอ่างทอง และประชากรจังหวัดนครปฐม ซึ่งเป็นประชากรที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน นอกจากนั้นประชากรจังหวัดอ่างทองยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรค่อนข้างสูง

การผสมข้ามระหว่างปลา 2 ประชากรที่มีพันธุกรรมแตกต่างกัน คาดว่าจะทำให้ลูกผสมมีลักษณะดีขึ้นกว่าเดิมด้วยผลของ heterosis (Falconer and Mackay, 1996) จากการศึกษาพบ การเกิด heterosis ในลักษณะ Phagocytic activity แต่ลูกผสมมีลักษณะการเจริญเติบโต อัตรารอด การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Antibody titre) และ Phagocytic index ไม่แตกต่างจากพ่อแม่ ซึ่งในการศึกษาในปลาชนิดอื่นๆ ก็ให้ผลคล้ายคลึง เช่นมีรายงานในปลา Rainbow trout ว่าการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ ไม่ทำให้ปลา ลูกผสมเจริญเติบโตดีขึ้น (Horstgen-Schwark *et al.*, 1986) ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในปลาคูอุย (อุทัยรัตน์, 2543) นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาในปลา Chinook salmon (Bryden *et al.*, 2004) ที่ผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์จากแหล่งธรรมชาติกับสายพันธุ์จากโรงเพาะฟักโดยศึกษาลักษณะ 5 ลักษณะ ได้แก่ อัตรารอด การเจริญเติบโตในน้ำเค็ม การทนเค็ม การตอบสนองต่อความเครียดและการฟื้นตัว พบว่าลักษณะต่าง ๆ ในลูกผสมไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับค่าที่ได้จากสายพันธุ์พ่อแม่ และค่า heterosis ของแต่ละลักษณะมีค่าต่ำ จากการศึกษาของ Shigano and Taniguchi (2002) พบว่า การเกิด heterosis ของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับ fitness โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการทนทานต่อความเค็มกับระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์พ่อแม่ (วัดจากเครื่องหมายพันธุกรรมที่เป็น neutral marker) โดยพบว่าคู่ประชากรที่มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม สูงกว่า 0.1 จะให้ลูกผสมแสดงผล heterosis สูงทุกคู่ ส่วนคู่ประชากรที่มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม ต่ำกว่า 0.1 จะให้ค่า heterosis สูงบ้างต่ำบ้างคละกันไป สำหรับประชากรพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.0827 ซึ่งอาจจะแตกต่างกันไม่มากพอ

จากการศึกษานี้ พบว่าลูกผสมมีลักษณะความสามารถในการกลืนกินเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity) สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งแสดงว่ามีความต้านทานต่อเชื้อโรคทั่วไปได้ดี สำหรับความต้านทานเฉพาะต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* แม้จะพบว่ามีค่า Antibody titre ต่ำกว่าพ่อแม่ในสัปดาห์ที่ 2 และ 10 แต่พบว่ามีค่าในสัปดาห์ที่ 7 และ 8 ซึ่งเป็นช่วงที่ Antibody titre ขึ้นสูงสุดนั้น ลูกผสมและประชากรพ่อแม่มีค่าไม่แตกต่างกัน แสดงว่ามีความต้านทานต่อ เชื้อนี้ไม่แตกต่างกัน อนึ่งค่า Antibody titre จากการศึกษานี้มีค่าสูงกว่าที่เคยมีรายงานในปลาชนิดอื่นๆ หลายชนิด เช่น ปลาคูอุย ปลาคูก ลูกผสมบิกอุย และปลาช่อน (นิลบล, 2534; บุญกว้าง และนนทวิทย์, 2536; จิตต์เกษม และคณะ, 2536) เป็นต้น ซึ่งศึกษาโดยใช้เชื้อ *A. hydrophila* เช่นเดียวกัน

ค่าความหลากหลายของ MHC class I ของลูกผสมทั้งสองแบบมีค่าสูง กว่าค่าเฉลี่ยของประชากรพ่อแม่เล็กน้อย โดยทางทฤษฎีการที่มีความหลากหลายของ MHC class I สูง น่าจะทำให้ปลามีความสามารถในการแยกแยะเชื้อโรคไวรัส และสิ่งแปลกปลอมได้ดีกว่า จึงน่าจะต้านทานโรคได้ดีกว่า เป็นที่น่าสังเกตว่าความหลากหลายของ MHC class I ของประชากรพ่อแม่มีค่าสอดคล้องกับระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

ผลการผสมข้ามครั้งนี้ แม้จะไม่ได้ลูกผสมที่เจริญเติบโต และอัตราการรอดดีกว่าพ่อแม่ แต่น่าจะมีความต้านทานต่อโรคทั่ว ๆ ไปดีขึ้น

สรุปผล

สรุป

1. ประชากรปลาคุยกัยในประเทศไทยมีความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มอย่างน้อย 2 กลุ่ม
2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปลาคุยกัยในประเทศไทย มีค่าปานกลาง และ พบการเกิด bottleneck ในประชากรส่วนใหญ่
3. การผสมข้ามระหว่างประชากรจังหวัดอ่างทอง กับ ประชากรจังหวัดนครปฐม ได้ลูกผสมที่มีแนวโน้มต้านทานโรคได้ดีขึ้น แต่มีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดไม่แตกต่างจากพ่อแม่ ลูกผสมที่ได้มีความหลากหลายของ MHC class I สูงกว่าเฉลี่ยของพ่อแม่

ข้อเสนอแนะ

1. ประชากรที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉพาะจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งค่อนข้างต่ำ ซึ่งอาจทำให้ไม่สามารถปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ดีนัก ดังนั้น จึงควรเพิ่มความหลากหลายของอัลลีล โดยอาจนำปลาจากแหล่งที่มีพันธุกรรมต่างกันมาผสม ส่วนประชากรอ่างทองมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงอยู่แล้วจึงควรจัดการไปในทิศทางที่จะรักษาระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ไว้ เช่น การใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนมาก หลีกเลี่ยงการผสมภายในเครือญาติ เป็นต้น
2. แม้ว่าลักษณะส่วนใหญ่ของลูกผสมข้ามสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่ (อัตราการเจริญเติบโต, อัตราการรอด, Antibody titre และ Phagocytic index) แต่พบว่ามี Phagocytic activity ดีกว่าพ่อแม่ ดังนั้นลูกผสมข้าม จึงมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป อย่างไรก็ตามหากจะนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตลูกผสมบิกอูย จำเป็นจะต้องทดลองผสมและศึกษาลักษณะของลูกผสมก่อน ทั้งนี้เพราะผลของการผสมข้ามไม่สามารถคาดการณ์ได้จากลักษณะของพ่อแม่
3. ควรจะมีการศึกษาลักษณะที่เกี่ยวข้องกับ fitness เพิ่มเติมเมื่อปลาเจริญพันธุ์แล้ว เช่น ความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อ ความดกของไข่ เป็นต้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จิตต์เกษม จันทรผ่อง, สุปราณี ชินบุตร และวราเทพ ศุภเมธากร. 2536. การศึกษาทางด้านการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของปลาช่อน (*Channa striata*) หลังการให้วัคซีน, น. 313-315. ใน รายงานสัมมนาวิชาการประจำปี 2536. กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- นนทวิทย์ อารีชัยชน. 2535. สถานการณ์โรคสัตว์น้ำ 2534 และการคาดการณ์สำหรับปี 2535. *อะควาฟาร์มมิ่ง*. 1: 10-17.
- นนทวิทย์ อารีชัยชน. 2537. การวินิจฉัยและการควบคุมโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. เอกสารประกอบการเรียนวิชาเพาะทางเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- นิลุบล กิจอันเจริญ. 2534. การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนต่อการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันและกาด้านทานโรคในปลาดุกอุย. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บุญกว้าง การุณ และนนทวิทย์ อารีชัยชน. 2536. การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ของปลาดุกอุยผสมโดยการทดลอง, น. 181. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32. (สาขาสัตวแพทย์และประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุจินต์ หนูขวัญ, กำชัย ลาวัณยวุฒิ, มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, และปรัชชัย วีรสิทธิ์. 2533. การเพาะพันธุ์ปลาดุกอุยผสมกับปลาดุกอุยและปลาดุกเทศ, น. 529-567, ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 28. (สาขาสัตวแพทย์และประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธ์, นภาพร บานชื่น, ทศนีย์ สุโกศล, ธารารักษ์ ธารากุล, ศันสนีย์ เสนาะวงษ์ และ ศิริฤกษ์ ทรงวิไล. 2537. *อิมมูโนวิทยา*. มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 35 น.

ศรีจรรยา สุขมนอนมณต์. 2546. การพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์สำหรับปลาดุกอุยและการประยุกต์เพื่อการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2543. พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Anderson, L. 2001. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. **Nat. Rev.-Genet.** 2: 130-137.

Ainsworth, A.J. and C. Dexiang. 1990. Differences in the phagocytosis of four bacteria by channel catfish neutrophils. **Dev. Com. Imm.** 14: 201-209.

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*. **Fish. Sci.** 65(2): 235-239

Allendorf, F.W. and S.R. Phelps. 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. **Trans. Am. Fish. Soc.** 109: 537-543.

Allendorf, F.W. 1986. Genetic drift and loss of alleles versus heterozygosity. **Zoo Biol.** 5: 181-190.

Allendorf, F.W. and G. Luikart. 2007. **Conservation and the Genetics of Populations.** 1st ed. Blackwell Publishing, Malden.

Angka, S.L., T.J. Lam and Y.M. Sin. 1995. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture** 130: 102-112.

Antao, A.B., M. Wilson, J. Wang, E. Bengten, N.W. Miller, L.W. Clem and V.G. Chinchar. 2001. Genomic organization and differential expression of channel catfish MHC class I genes. **Dev. Comp. Immunol.** 25(7): 579-595.

- Appleyard, S.A. and R.D. Ward. 2006. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster. **Aquaculture** 254: 148-159.
- Arndt, A.D., W.V. Neer, B. Hellemans, J. Robben, F. Volckaert and M. Waelkens. 2003. Roman trade relationships at Sagalassos (Turkey) elucidated by ancient DNA of fish remains. **J. Archaeol. Sci.** 30: 1095-1105.
- Bierne, N., I. Beuzart, V. Vonau, F. Bonhomme, E. Bédier. and AQUACOP. 2000. Microsatellite-associated heterosis in hatchery propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Aquaculture** 184: 203–219.
- Borrell Y.J., H. Pineda, I. McCarthy, E. Vázquez, J.A. Sánchez and G.B. Lizana. 2004. Correlations between fitness and heterozygosity at allozyme and microsatellite loci in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Heredity** 92: 585-593.
- Brooker, A.L., D. Cook, P. Bentzen, J.M. Wright and R.W. Doyle. 1994. Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. **Can. J. Fish Aquat. Sci.** 51: 1959-1965.
- Britten, H.B. 1996. Meta-analyses of the association between multi-locus heterozygosity and fitness. **Evolution** 50: 2158-2164.
- Bryden, C.A., J.W. Heath and D.D. Heath. 2004. Performance and heterosis in farmed and wild Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) hybrid and purebred crosses. **Aquaculture** 235: 249-261.
- Cavalli-Sforza, L.L. and A.W.F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: model and estimate Procedures. **Evolution** 21: 550-570.

- Coltman, D.W., W.D. Bowen and J.M. Wright. 1998. Birth weight and neonatal survival of harbour seal pups are positively correlated with genetic variation measured by microsatellites. **Proc. R. Soc. Lond.** 265: 803-809.
- Cornuet, J.M. and G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics** 144: 2001-2014.
- Cuesta, A., A. Rodriguez, I. Salinas, J. Meseguer and M.A. Esteban. 2006. Early local and systemic innate immune responses in the teleost gilthead seabream after intraperitoneal injection of whole yeast cells. **Fish Shellfish Immunol.** 22: 242-251.
- David, P. 1998. Heterozygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems. **Heredity** 80: 531-537.
- DeWoody, J.A. and J.C. Avise. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. **J. Fish Biol.** 56: 461-473.
- Doyle, R.W. and C. Herlinger. 1995. Use of DNA microsatellite polymorphism to analyze genetic correlations between hatchery and natural fitness. **Am. Fish. Soc. Symp.** 15: 205-211.
- Dunn, J., A. Polk, J. Scarlett, G. Olivier, S. Lall and F.A. Goosen. 1990. Vaccine in aquaculture: the search for efficient delivery system. **Aquaculture Eng.** 9: 23-32.
- Estoup, A.P., Persa, F. Krieg, D. Vaiman and R. Guyomard. 1993. $(CT)_n$ and $(GT)_n$ microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). **Heredity** 71: 488-496.
- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evol. Bioinform. Online** 1: 47–50.

Falconer, D.S. and T.F.C. Mackay. 1996. **Introduction to Quantitative Genetics**. Longman, Essex.

FAO. 2006. **Fishstat Plus Version 2.30**. Available source

<http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>, April 1, 2008.

Felsenstein, J. 1993. **PHYLIP (Phylogeny Interference Package) version 3.5c**. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.

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). **Mol. Ecol.** 5: 703-705.

Galbusera, P. 1997. **The genetic variability of wild and inbred populations of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)**. Ph. D. Thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium, 151 pp.

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). **Mol. Marine Biol. Biotechnol.** 4(1): 62-68.

Goudet, J. 2001. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)**. 2003. Available at <http://www2.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

Grimholt, U., I. Hordvik, V.M. Fosse, I. Olsaker, C. Endresen and O. Lie. 1993. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Immunogenetics** 37: 469-473.

Grimholt, U., S. Larsen, R. Nordmo, P. Midtlyng, S. Kjoeglum, A. Storset, S. Saebø and R.J.M. Stet. 2003. MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. **Immunogenetics** 55: 210-219.

- Gutierrez, M.A. and T. Miyazaki. 1994. Response of Japanese eel to oral challenge with *Edwardsiella tarda* after vaccination with formalin-killed cell or lipopoly-saccharide of the bacterium. **J. Aquat. Anim. Health** 6: 110-117.
- Hardford, A.J., K. O'Halloran and P.F.A. Wright. 2006. Flow cytometric analysis and optimisation for measuring phagocytosis in three Australian freshwater fish. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 562-573.
- Hansson, B. and L. Westerberg. 2002. On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. **Mol. Ecol.** 11: 2467-2474.
- Hedrick, P.W. 1985. **Genetics of Populations.** Jones and Bartlett Publ. Inc., Boston. 629p.
- Hedrick, P.W. and P.S. Miller. 1992. Conservation genetics: techniques and fundamentals. **Ecol. Appl.** 2: 30-46.
- Horstgen-Schwark, G., H. Fricke and H.J. Langholz. 1986. The effect of strain crossing on the production performance in rainbow trout. **Aquaculture** 57: 141-152.
- Kalinowski, S.T. 2002. How many allele per locus should be used to estimate genetic distance?. **Heredity** 88: 62-65
- Kamonrat, W. 1996. **Special Genetic Structure of Thai Silver Barb *Puntinus gonionotus* (Bleeker) Populations in Thailand.** Ph.D. Thesis, Dalhousie University.
- Kamonrat, W., S.K.J. McConnell and D.I. Cook. 2002. Polymorphic microsatellite loci from the Southeast Asia cyprinid, *Barbodes gonionotus* (Bleeker). **Mol. Ecol. Notes** 2: 89-90

- Katagiri, T., I. Hirono, T. Aoki, A. Takashi and M. Sakai. 1996. Isolation of major histocompatibility complex class I cDNA from pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). **Dev. Comp. Immunol.** 20: 217-228.
- Kimura, M. and J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics** 49: 725-738.
- Kjøglum, S., S. Larsen, H.G. Bakke and U. Grimholt. 2006. How specific MHC class I and II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon. (*Salmo salar*). **Fish Shellfish Immunol.** 21: 431-441.
- Langefors, A., J. Lohm, M. Grahn, Ø. Andersen and T. von Schantz. 2001. Association between major histocompatibility class IIB alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon. **Proc. R. Soc. Lond. B** 268: 479-485.
- Lal, K.K., R.K. Singh, V. Mohindra, B. Singh and A.G. Ponniah. 2003. Genetic make up of exotic catfish *Clarias gariepinus* in India. **Asian Fish Sci.** 16: 229-234.
- Leberg, P.L. 2002. Estimating allelic richness: effects of samples and bottlenecks. **Mol. Ecol.** 11: 2445-2449.
- Lee, W.J. and T.D. Kocher. 1996. Microsatellite DNA marker for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. **J. Fish. Biol.** 49: 169-171.
- Li, Y., B. Helleman, L. Pouyaud and F.A.M. Volkaert. 2000. **Origin and genetic diversity of aquacultured catfish (*Clarias gariepinus*) in SE Asia.** A poster presented at “the Catfish Asia Workshop”. 9-20 June, 2000, Bogor.
- McConnell, S.K., P. O'Reilly, L. Hamilton, J.M. Wright and P. Bentzen. 1995. Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiation of North American and European populations. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 52: 1863-1872.

- McFaddin, J.F. 1980. **Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria**. 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore. 572 pp.
- Meejui, O., S. Sukmanomon and U. Na-Nakorn. 2005. Allozyme revealed substantial genetic diversity between hatchery stocks of Siamese fighting fish, *Betta splendens*, in the province of Nakornpathom, Thailand. **Aquaculture** 250: 110-119.
- Miller, L.M. and A.R. Kapuscinski. 1996. Microsatellite DNA markers reveal new levels of genetic variation in Northern Pike. **Trans. Am. Fish. Soc.** 125: 971-977.
- Morris, D.B., K.R. Richard and J.M. Wright. 1996. Microsatellite from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 53: 120-126.
- Na-Nakorn, U., N. Taniguchi, E. Nugroho, S. Seki and W. Kamonrat. 1999. Isolation and characterization of microsatellite loci of *Clarias macrocephalus* and their application to genetic diversity study. **Fish. Sci.** 65(4): 520-526.
- Na-Nakorn, U., W. Kamonrat and T. Ngamsiri. 2004. Genetic diversity of walking catfish, *Clarias macrocephalus* in Thailand and evidence of genetic introgression from introduced farm *C. gariepinus*. **Aquaculture** 240: 145-163.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 89: 583-590.
- Oosterhout, C.V., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills and P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Mol. Ecol. Notes** 4: 535-538.

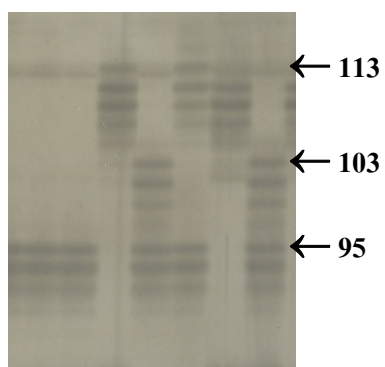
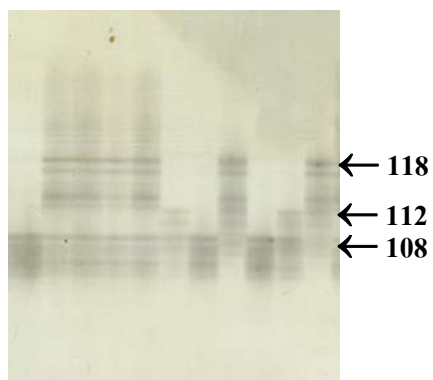
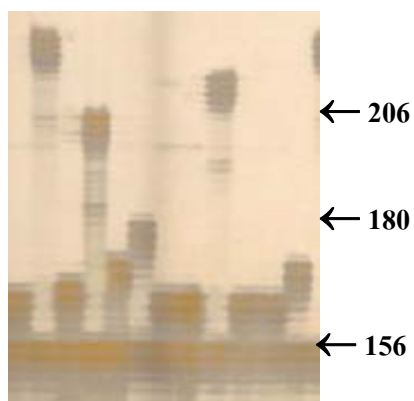
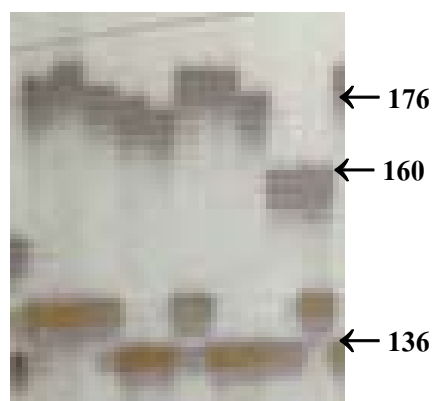
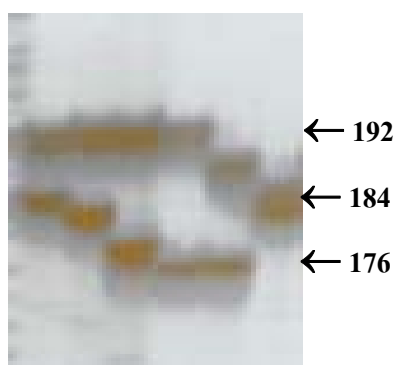
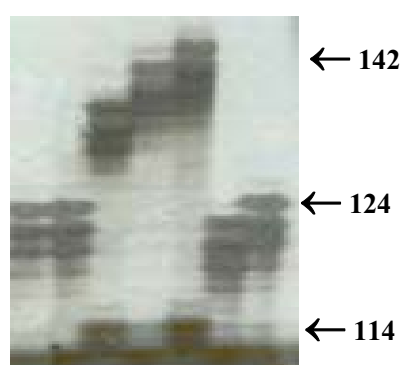
- Overturf, K., M.T. Casten, S.L. LaPatra, C. Rexroad III and R.W. Hardy. 2003. Comparison of growth performance, immunological response and genetic diversity of five strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 217: 93-106.
- Pongson, G.H. and E. Zouros. 1994. Allozyme and RFLP heterozygosities as correlates of growth rate in the scallop *Placopecten magellanicus* : a test of the associative overdominance hypothesis. **Genetics** 137: 221-231.
- Pongson G.H. and S.E. Fevolden. 1998. DNA heterozygosity and growth rate in the Atlantic cod *Gadus morhua* (L). **Evolution** 52: 915-920.
- Puangkaew, J., V. Kiron, T. Somamoto, N. Okamoto, S. Satoh, T. Takeuchi and T. Watanabe. 2004. Non specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. **Fish Shellfish Immunol.** 16: 25-39.
- Raymond, M. and F. Rousset.. 1995. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Hered.** 86: 248 –249.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995b. An exact test for population differentiation. **Evolution** 49: 1280-1283.
- Sahoo, P.K., P.K. Meher, K.D. Manhapatra, J.N. Saha, R.K. Jana and P. V.G.K. Reddy. 2004. Immune responses in different fullsib families of Indian major carp, *Labeo rohita*, exhibiting differential resistance to *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture** 238: 115-125.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Sato, A., F. Figueroa, C. O'hUigin, D.N.Reznick and J. Klein. 1996. Identification of major histocompatibility complex genes in the guppy, *Poecilia reticulata*. **Immunogenetics** 43: 38-49.
- Shikano, T. and N. Taniguchi. 2002. Relationships between genetic variation measured by microsatellite DNA marker and fitness – related trait in the guppy (*Poecilia reticulata*). **Aquaculture** 209: 77-90.
- Smouse, P.E. 1986. The fitness consequences of multi-locus heterozygosity under the multiplicative overdominant and inbreeding models. **Evolution** 40: 946-957.
- Sneath, P.H.A. and R.R. sokal. 1973. **Numerical Taxonomy**. Freeman San Francisco.
- Srisapoome, P., T. Ohira, I. Hirono and T. Aoki. 2004. Cloning, characterization and expression of cDNA containing major histocompatibility complex class I, II α and II β genes of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fish. Sci.** 70: 264-276.
- Taggart, J.B., R.A. Hynes, P.A. Prodöhl and A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. **J. Fish. Biol.** 40: 963-965.
- Takeuchi H., F. Figueroa, C. O'hUigin and J. Klein. 1995. Cloning and characterization of class I MHC genes of the zebrafish *Brachydanio rerio*. **Immunogenetics** 42:77-84.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.** 24: 1596-1599.
- Tassanakajon, A., A. Tiptawonnukul, P. Supungul and V. Rimphanitchayakit. 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Mol. Marine Biol. Biotechnol.** 7(1): 55-61.

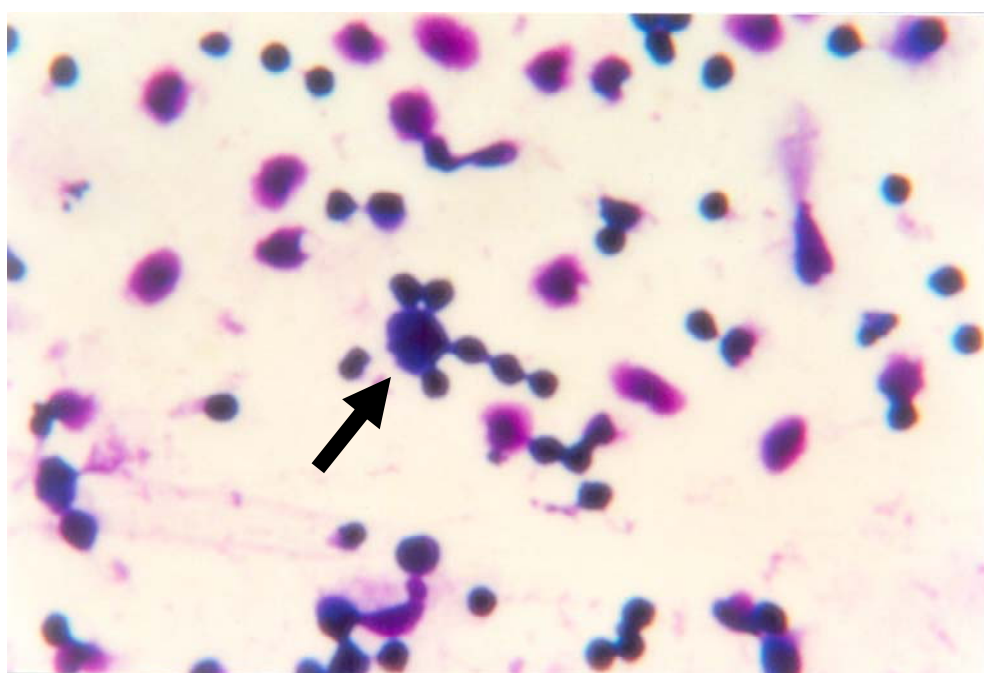
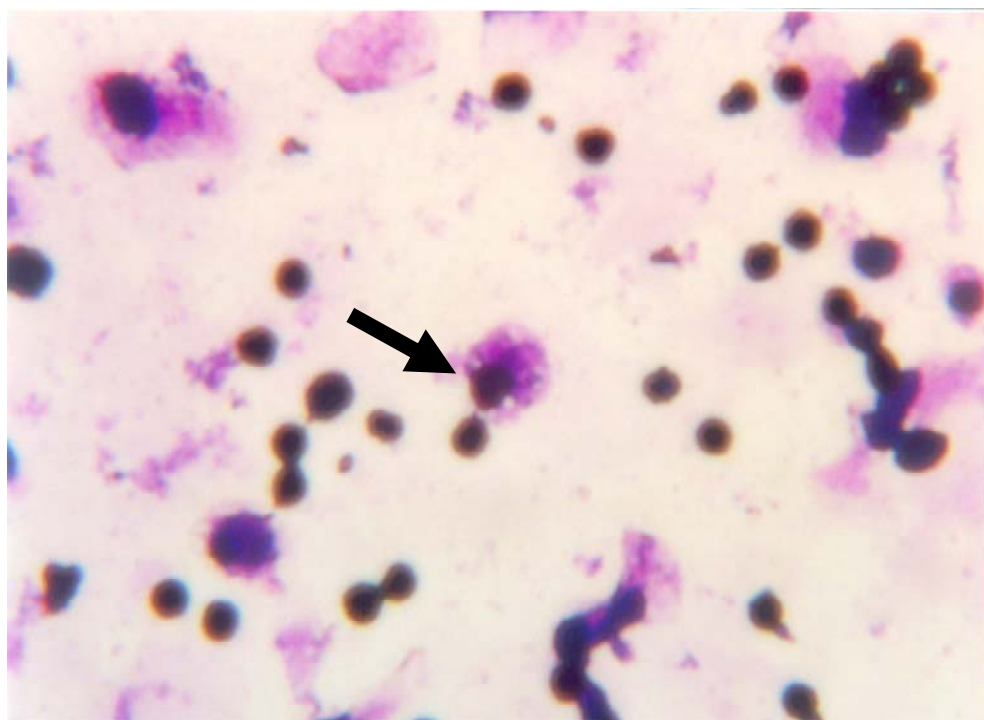
- Timon, M., G. Elgar, S.Habu, K. Okumura and P.C.L. Beverly. 1998. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from the pufferfish *Fugu rubripes*. **Immunogenetics** 47:170-173.
- Teugels, G.G., R. Guyomard and M. Legendre. 1992. Enzymatic variation in African clariid catfishes. **J. Fish Biol.** 40: 87–96.
- Usmani, S., S.G. Tan, S.S. Sriraj and K. Yusoff. 2001. Isolation and characterization of microsatellite markers in the Southeast Asian river catfish *Mystus nemurus*. **Mol. Ecol. Notes** 1: 264-266.
- Van Erp, S.H.M., B. Dixon, F. Figueroa, E. Egberts and R.J.M. Stet. 1996. Identification and characterization of a new major histocompatibility complex class I gene in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Immunogenetics** 44: 49-61.
- Waldbieser, G.C. and B.G. Bosworth. 1997. Cloning and characterization of microsatellite loci in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Animal Genetics** 28: 295-298.
- Weir, B.S. and C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** 38(6): 1358-1370.
- Wright, S. 1978. **Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations.** University of Chicago Press, Chicago.
- Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle. 1999. **POPGENE version 1.31. Microsoft window-based software for population genetics analysis**, University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ภาพตัวอย่างจากการทดลอง

**Cga01****Cga02****Cga03****Cga06****Cga09****Cga10**

ภาพผนวกที่ ก1 จีโนไทป์ของไมโครแซเทลไลต์ในปลาอุกยักษ์ทั้ง 6 ตำแหน่ง



ภาพผนวกที่ ก2 ลักษณะการกลืนกินเชื้อโรคของ peripheral blood leukocytes (PBLs) ในแง่ของ
Phagocytosis activity (ภาพบน) และ Phagocytic index (ภาพล่าง)

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี ตารางผนวก และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MHC class I

Agarose gel electrophoresis

สารละลาย

1. 10X TBE Buffer (1,000ml)

Tris base	108	g
Boric acid	55	g
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40	ml

มาเชื่อมด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที และเก็บสารละลายที่

อุณหภูมิห้อง

2. เอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 µg/ml

เอธิเดียมโบรไมด์	250	µg
dH ₂ O	500	ml

เก็บในขวดสีน้ำตาล

วิธีการ

1. ประกอบถาดหล่อเจลเข้ากับซี่หัว (comb) เพื่อให้เจลที่แข็งตัวมีช่อง (wells) ซึ่งใช้สำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ

2. ชั่งอะกาโรส (USB, Spain) 0.6 g ใส่ลงในพลาสติก และเติมบัฟเฟอร์ 1X TBE ปริมาตร 40 ml จะได้อะกาโรสความเข้มข้น 1.5%

3. ละลายอะกาโรสโดยนำเข้าไมโครเวฟนานประมาณ 1 นาที เมื่อเดือดให้นำออกมาเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำเข้าไมโครเวฟอีกครั้ง ทำซ้ำดังกล่าวอีก 2-3 ครั้ง จนกระทั่งอะกาโรสละลายจนเป็นสารละลายใส

4. ปลอ่ยสารละลายเจลกึ่งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุ่น นำไปเทลงบนถาดหล่อเจลโดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น ทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัวและเย็น

5. ดึงซี่หัวออกจากเจล ค่อย ๆ ดึงแผ่นเจลกั้น นำไปวางใน eletrophoresis chamber โดยหันด้านช่องหยอดตัวอย่างไปทางขั้วลบ

6. เติมน้ำบัฟเฟอร์ 1 X TBE เติมลง eletrophoresis chamber จนท่วมผิวหน้าเจลกั้นมาประมาณ 2 mm

7. ผสม loading dye กับตัวอย่างดีเอ็นเอ หรือดีเอ็นเอมาตรฐาน อัตราส่วน 2.0: 10 µl บนแผ่นพาราฟิน ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างขึ้นลง 3 – 4 ครั้ง แล้วนำไปหยอดลงในช่องหยอดตัวอย่าง

8. ปิดฝา eletrophoresis chamber ต่อขั้วไฟฟ้า แล้วเปิดสวิตช์ปล่อยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100V โดยให้กระแสไฟฟ้าไหลจากขั้วลบไปหาขั้วบวกตามความยาวของแผ่นเจล

9. สังเกตสีของ loading dye เมื่อสีเคลื่อนที่ไปจนถึงด้านปลายของแผ่นเจลให้หยุดปล่อยกระแสไฟฟ้า

10. นำแผ่นเจลออกไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่านาน 15 นาที (ระวังไม่ให้เอธิเดียมโบรไมด์โดนร่างกาย)

11. นำแผ่นเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต และถ่ายรูปแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยใช้ Gel document (Gene Genius)

Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis สำหรับการหาขนาดไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

สารละลาย

1. 40% acrylamide gel (19: 1) (1,000 ml)

Acrylamide	380	g
Bis-acrylamide	20	g

2. 4.5% acrylamide gel (1,000 ml)

40% acrylamide gel (19:1)	112.5	ml
5 X TBE	200	ml
Urea	450	g

3. 4.5% denaturing polyacrylamide gel

4.5% acrylamide gel	50	ml
10% APS	350	μl
TEMED	70	μl

การเตรียมกระจก

1. ทำความสะอาดแผ่นกระจกและ chamber โดยเช็ดทำความสะอาดกระจกด้านในด้วยเอทานอล 95% จำนวน 3 ครั้ง ด้วยกระดาษ Kimwiped[®] จนกระทั่งกระจกแห้ง จากนั้นเช็ดด้วยglass bond เพื่อช่วยให้เจลติดแผ่นกระจก และเช็ดกระจกด้วยเอทานอล 95% อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นเช็ดทำความสะอาด chamber ด้วยเอทานอล 95% 1 ครั้ง และเช็ดด้วยน้ำยาเช็ดกระจก (clear view)

1 ครั้ง เพื่อป้องกันไม่ให้เจลติด chamber

2. ประกอบแผ่นกระจกเข้ากับตัวยึด (clamp) โดยกั้นด้วย spacer ซึ่งทำให้เกิดช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกและ chamber

3. เทสารละลายเจลลงในแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศเกิดขึ้น แล้วสอด Shark's tooth plate ทางด้านเรียบลงในสารละลายที่อยู่ระหว่างกระจกให้มีความลึกประมาณ 0.5 mm

4. ทิ้งเจลไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิด polymerization ไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง

การแยกขนาดแถบดีเอ็นเอ

1. ดึงซี่หวีออก และประกอบกระจกเข้ากับเครื่อง แล้วสอด Shark's tooth plate ด้านปลายแหลมเข้าไปด้านบนของเจลให้ปลายของแหลมของซี่หวีแตะที่ผิวเรียบของเจลพอดี
2. ผ่านกระแสไฟฟ้า 100 W ในเจล นานประมาณ 15 – 20 นาที
3. ทำให้ผลผลิตพีซีอาร์เสียสภาพโดยให้ความร้อนที่ 95 °C นาน 3 นาที และแช่บนน้ำแข็งทันที
4. ทำความสะอาดช่องหยอดตัวอย่าง 1 X TBE ก่อนหยอดตัวอย่าง จากนั้นหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 3.5 μ l ลงในช่องหยอดตัวอย่าง
5. ผ่านกระแสไฟฟ้า 60 W ในเจล นานประมาณ 1 – 2 ชั่วโมง
6. ตรวจสอบผลการแยกแถบดีเอ็นเอด้วย silver staining ต่อไป

การย้อมเจดด้วยวิธี Silverstaining

สารเคมี

1. staining solution (1,000 ml)

Silver nitrate	1	g
37% formaldehyde	1.5	ml

2. developing solution (1,000 ml)

Anhydrous Na_2CO_3	30	g
37% formaldehyde	1.5	ml
10 mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	200	μl

วิธีการ

1. นำแผ่นกระจกวางลงในถาดสำหรับการย้อม โดยให้ด้านหน้าเจดหงายขึ้น
2. ตรึงชิ้นดีเอ็นเอบนแผ่นเจดด้วย 10% glacial acetic acid นาน 20 นาที โดยเขย่าถาดย้อม

ตลอดเวลา

3. ล้างด้วยน้ำเปล่า 3 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที โดยเขย่าถาดย้อมตลอดเวลา
4. ย้อมเจดด้วย staining solution ปริมาตร 1 ลิตร นาน 30 นาที โดยเขย่าถาดย้อมตลอดเวลา
5. ล้างด้วยน้ำเปล่า 1 ครั้ง โดยให้น้ำผ่านเจดแล้วเททิ้งทันที โดยขั้นตอนนี้ไม่ควรทำเกิน 10

วินาที

6. ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยแช่แผ่นกระจกใน developing solution ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 ลิตร เขย่าจนเห็นแถบดีเอ็นเอ
7. จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution (10% glacial acetic acid ที่ใช้ในข้อ 2.) นาน 2 – 3 นาที
8. ล้างด้วยน้ำเปล่าอีก 2 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที โดยเขย่าถาดย้อมเจดตลอดเวลา
9. ผึ่งกระจกให้แห้งก่อนนำกระจกไปอ่านผล

Competent Cells

สารเคมี

1. 1M CaCl_2 (1,000 ml)

CaCl_2	110.99	g
dH_2O	up to 1,000	ml

ละลายสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ml นำไปกรอง และฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

4. LB (1,000 ml)

LB broth	25	g
dH_2O	1,000	ml

ละลายสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

6. *E.coli* JM109

ดูดเชื้อ 30 μl ใน LB 3 ml

นำไปปั่นในตู้ shaker ที่ 250 rpm 37°C เป็นเวลา 16 ชม.

Dilute เชื้อในอัตราส่วน 1: 100

ปั่นในตู้ shaker ที่ 250 rpm 37°C เป็นเวลา 2.5 ชม.

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD.) ให้ได้ค่าประมาณ 0.4 – 0.6

วิธีการเตรียม competent cell

1. นำเชื้อ *E.Coli* ที่เลี้ยงจากข้อ 6. ใส่ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml
2. นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที
3. นำไปปั่นที่ 3,000 rpm 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
4. เทอาหารในหลอดทิ้ง
5. เติม 100mM CaCl_2 625 μl แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตต์ นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
6. นำไปปั่นที่ 3,000 rpm 4 °C เป็นเวลา 5 นาที

7. เทส่วนใส่ทิ้ง

8. เติม 100mM CaCl_2 ที่มี 15% glycerol อยู่ด้วยลงไป 375 μl

9. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตต์ แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -80°C จนกระทั่งใช้ (สามารถเก็บไว้ใช้ได้ประมาณ 1 เดือน)

Transformation

สารเคมี

1. LB (1,000 ml)

LB broth	25	g
dH_2O	1,000	ml

ละลายสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

2. LB agar (1,000 ml)

LB	1,000	ml
Agar	15	g

ละลายสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

3. LB agar + AMP (1,000 ml)

LB agar	1,000	ml
AMP	0.1	g

4. X - gal (1 ml)

X - gal	40	mg
Dimethylformamide	1	ml

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่ -20°C จนกระทั่งใช้

5. IPTG (10 ml)

IPTG	0.2383	g
------	--------	---

dH₂O 10 ml

นำไปกรอง เก็บรักษาที่ -20°C จนกระทั่งใช้

วิธีการ

1. นำ competent cell จาก -80°C มาละลายด้วยการแช่น้ำแข็งประมาณ 15 นาที แล้วแบ่งใส่หลอด eppendorf หลอดละ 50 µl (อยู่บนน้ำแข็งตลอดเวลา)
2. ใส่ ligation reaction ที่เตรียมไว้ลงไปหลอด competent cell จากข้อ 1 แล้วแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
3. นำไป heat shock ที่ 42°C เป็นเวลา 40 วินาที จากนั้นรีบจุ่มในน้ำแข็ง ทิ้งไว้ 2 นาที
4. เติมหาอาหาร LB 250 µl และปั่นหลอดด้วยฟาราฟิน
5. นำไปบ่มไว้ใน water bath ที่ 37°C เป็นเวลา 90 นาที โดยเขย่าอยู่ตลอดเวลา
6. นำอาหาร LB agar + Amp ไปบ่มที่ 37°C ก่อนนำมาใช้
7. ผสม X – gal กับ IPTG ในอัตราส่วน 1: 1 หยดลงตรงกลาง plate (LA + AMP) นำไป spread plate รอจน plate แห้ง
8. นำเชื้อที่บ่มไปปั่นที่ 5,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 3 นาที
9. ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกโดยให้เหลือเพียง 100 µl แล้ว resuspension ให้เข้ากัน
10. ดูด resuspension ของเชื้อหยดลงบนเพลทที่มี LB agar + Amp ที่เตรียมไว้ ใช้แท่งแก้ว spread จนแห้ง โดยต้องทำแบบ aseptical
11. นำไปบ่มไว้ในตู้อบ ที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis

สารเคมี

1. Solution I (GTE)

1M glucose

Glucose	18	g
---------	----	---

dH ₂ O	100	ml
-------------------	-----	----

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

GTE (40 ml)

50 mM Glucose	2	ml
---------------	---	----

25mM Tris- HCl (pH 8.0)	1	ml
-------------------------	---	----

10 mM EDTA	0.8	ml
------------	-----	----

2. Solution II (1.4 ml)

0.2 N NaOH	30	μl
------------	----	----

1% SDS	75	μl
--------	----	----

dH ₂ O	1,395	μl
-------------------	-------	----

3. Solution III (100 ml)

5M KOAC	60	ml
---------	----	----

Glacial acetic acid	11.5	ml
---------------------	------	----

dH ₂ O	28.5	ml
-------------------	------	----

4. Alcohol 70%

Alcohol 95%	73.7	ml
-------------	------	----

dH ₂ O	26.3	ml
-------------------	------	----

วิธีการ

1. เทเชื้อจากหลอด 15 ml ใส่หลอด 1.5 ml ประมาณ 1 – 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

2. เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำอีกประมาณ 0.5 – 1 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

3. เทอาหารแล้วดูดอาหารที่เหลือออกจนหมด
4. เติม Solution I 200 μ l นำไป vortex เพื่อให้เซลล์ละลายจนหมด
5. เติม RNase A 3 μ l และนำไป vortex แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที
6. เติม Solution II 400 μ l แล้วกลับหลอดไปมาเบา ๆ แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที
7. เติม Solution III 200 μ l แล้วกลับหลอดไปมาเบา ๆ แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที
8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 4°C เป็นเวลา 15 นาที
9. ดูดส่วนใสใ้หลอด 1.5 ml 200 μ l 3 ครั้ง
10. เติม chloroform 500 μ l นำไป vortex ไม่ให้ติดกันหลอด
11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
12. ดูดส่วนใสด้านบน 600 μ l ใสหลอดใหม่แล้วเติม isopropanol 360 μ l เขย่าให้เข้ากัน
13. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 4°C เป็นเวลา 15 นาที
14. ดูดส่วนใสใ้หลอดใหม่แล้วเติม 70% ethanol 1 ml ผสมให้เข้ากัน
15. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลาย ethanol ออก
16. นำไป dry vacumm หลังจากนั้นเติมน้ำ 30 μ l เคาะให้ตะกอนละลายสลับกับการนำไป spin down
17. นำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis
18. หลังจากได้ clone ที่ต้องการแล้ว นำ clone นั้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI โดยมี ส่วนผสมดังนี้

H ₂ O	7	μ l
10 X buffer	1	μ l
<i>Eco</i> RI Enzyme	1	μ l
Plasmid	1	μ l
Total	10	μ l

19. นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม.
20. นำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ plasmid uncut เป็นตัว control โดยมีส่วนผสมดังนี้

dH ₂ O	7	μl
Dye	2	μl
Plasmid	1	μl
Total	10	μl

ตารางผนวกที่ 1 แสดงความถี่อัลลีลของไมโครแซเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง ในประชากรปลาดุกยักษ์ 4 ประชากร

ตำแหน่ง	อัลลีล	SP	AT	NP	NS
Cga01	(N)	<u>65</u>	<u>30</u>	<u>16</u>	<u>33</u>
	90	0.000	0.000	0.063	0.000
	95	0.000	0.000	0.063	0.379
	103	0.000	0.000	0.188	0.061
	111	0.000	0.000	0.000	0.136
	113	0.323	0.033	0.094	0.197
	115	0.200	0.367	0.250	0.000
	117	0.000	0.000	0.000	0.030
	118	0.000	0.000	0.000	0.015
	119	0.000	0.000	0.000	0.030
	121	0.462	0.500	0.188	0.000
	129	0.000	0.033	0.156	0.000
	131	0.015	0.000	0.000	0.015
	134	0.000	0.000	0.000	0.045
	135	0.000	0.067	0.000	0.091
Cga02	(N)	<u>65</u>	<u>30</u>	<u>16</u>	<u>33</u>
	100	0.000	0.000	0.000	0.030
	108	0.446	0.333	0.188	0.561
	110	0.000	0.133	0.000	0.030
	112	0.354	0.267	0.094	0.000
	114	0.000	0.000	0.281	0.045
	116	0.092	0.033	0.000	0.000
	118	0.000	0.033	0.000	0.333
	120	0.108	0.200	0.438	0.000

(N) คือ จำนวนตัวอย่าง

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตำแหน่ง	อัลลีล	SP	AT	NP	NS
Cga03	(N)	<u>65</u>	<u>30</u>	<u>16</u>	<u>33</u>
	110	0.000	0.032	0.000	0.000
	144	0.000	0.000	0.000	0.015
	147	0.000	0.048	0.000	0.000
	150	0.000	0.000	0.000	0.030
	152	0.000	0.000	0.000	0.303
	154	0.000	0.000	0.000	0.652
	156	0.000	0.081	0.094	0.000
	158	0.531	0.371	0.313	0.000
	160	0.000	0.000	0.156	0.000
	164	0.100	0.048	0.000	0.000
	166	0.000	0.032	0.000	0.000
	168	0.069	0.048	0.000	0.000
	170	0.015	0.016	0.000	0.000
	172	0.038	0.048	0.000	0.000
	174	0.031	0.000	0.000	0.000
	176	0.008	0.065	0.000	0.000
	180	0.015	0.016	0.438	0.000
	184	0.008	0.016	0.000	0.000
	188	0.008	0.016	0.000	0.000
	201	0.000	0.016	0.000	0.000
	204	0.000	0.016	0.000	0.000
	206	0.054	0.048	0.000	0.000
	208	0.008	0.000	0.000	0.000
	213	0.015	0.000	0.000	0.000
	226	0.100	0.032	0.000	0.000
	233	0.000	0.032	0.000	0.000
	236	0.000	0.016	0.000	0.000

(N) คือ จำนวนตัวอย่าง

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตำแหน่ง	อัลลีล	SP	AT	NP	NS
Cga06	(N)	<u>65</u>	<u>30</u>	<u>16</u>	<u>33</u>
	134	0.000	0.032	0.375	0.136
	135	0.000	0.000	0.000	0.015
	136	0.269	0.161	0.000	0.424
	137	0.000	0.000	0.000	0.045
	138	0.000	0.016	0.344	0.303
	140	0.000	0.113	0.219	0.076
	142	0.246	0.129	0.000	0.000
	149	0.000	0.032	0.000	0.000
	150	0.015	0.032	0.000	0.000
	152	0.000	0.032	0.063	0.000
	156	0.015	0.048	0.000	0.000
	160	0.038	0.065	0.000	0.000
	162	0.108	0.081	0.000	0.000
	166	0.054	0.048	0.000	0.000
	168	0.031	0.032	0.000	0.000
	170	0.038	0.113	0.000	0.000
	174	0.054	0.000	0.000	0.000
	176	0.046	0.032	0.000	0.000
	178	0.085	0.016	0.000	0.000
	180	0.000	0.016	0.000	0.000

(N) คือ จำนวนตัวอย่าง

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตำแหน่ง	อัลลีล	SP	AT	NP	NS
Cga09	(N)	<u>65</u>	<u>30</u>	<u>16</u>	<u>33</u>
	178	0.085	0.387	0.344	0.000
	180	0.031	0.016	0.250	0.061
	181	0.000	0.016	0.000	0.000
	182	0.315	0.242	0.219	0.288
	184	0.146	0.129	0.063	0.182
	185	0.000	0.000	0.000	0.015
	186	0.000	0.016	0.063	0.030
	188	0.192	0.081	0.000	0.000
	190	0.231	0.113	0.063	0.379
	194	0.000	0.000	0.000	0.045
Cga10	(N)	<u>65</u>	<u>30</u>	<u>16</u>	<u>33</u>
	108	0.000	0.097	0.313	0.242
	110	0.277	0.065	0.000	0.242
	112	0.238	0.323	0.563	0.045
	114	0.000	0.016	0.125	0.470
	118	0.000	0.016	0.000	0.000
	120	0.038	0.048	0.000	0.000
	124	0.146	0.097	0.000	0.000
	126	0.038	0.016	0.000	0.000
	128	0.031	0.016	0.000	0.000
	130	0.000	0.016	0.000	0.000
	132	0.000	0.016	0.000	0.000
	134	0.015	0.000	0.000	0.000
	136	0.046	0.048	0.000	0.000
	138	0.031	0.032	0.000	0.000
	140	0.054	0.081	0.000	0.000

(N) คือ จำนวนตัวอย่าง

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตำแหน่ง	อัลลีล	SP	AT	NP	NS
Cga10	(N)	65	30	16	33
	142	0.015	0.032	0.000	0.000
	144	0.015	0.016	0.000	0.000
	146	0.008	0.032	0.000	0.000
	148	0.015	0.032	0.000	0.000
	152	0.015	0.000	0.000	0.000
	168	0.015	0.000	0.000	0.000

(N) คือ จำนวนตัวอย่าง

MHC class I partial sequences ของปลาอุกยักษ์ (*Clarias gariepinus*)

>Haplotype01

```
GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGATGATCCCA
AAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGACGATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATCA
GTCAGGGTAATGAGGAGACCTACAAAGTCAATGTGGGTAATCTGATGGGTCGTTTTAACCA
GACTAAAGGAGTTCACACATGGCAGAGGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGACAACACC
GTTAGAGGATACAGCCAGTGGGGTTATGATGGAGAAGATTTTCGTCAGCTTTGATCTGAAGA
CTGTCACCTACACTGCAGCCAAATCTCAAGCTGTGATCACCAAACAGAAGTGGGATCAGAA
TCCTGGTGATACTGTGGGCAGGAAGAACTACCTGGAGAAAACCTGTATTGAGTGGTTAAAG
AAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACACTGGAGAGGAAAGTTTCGTCCCGAGATGTCACCTCT
TTCAGGAAGATGCCACTTATCCAGAGGTGGTGTGTCACGCTACAGGCTTTTACCC
```

>Haplotype02

```
GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGATGATCCCA
AAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGACGATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATCA
GTCAGGGTAATGAGGAGACCTACAAAGTCAATGTGGGTAATCTGATGGGTCGTTTTAACCA
GACTAAAGGAGTTCACACATGGCAGAGGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGACAACACC
GTTAGAGGATACAGCCAGTGGGGTTATGATGGAGAAGATTTTCGTCAGCTTTGATCTGAAGA
CTGTCACCTACACTGCAGCCAAATCTCAAGCTGTGATCACCAAACAGAAGTGGGATCAGAA
TCCTGGTGATACTGTGGGCAGGAAGAACTACCTGGAGAAAACCTGTATTGAGTGGTTAAAG
AAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACACTGGAGAGGAAAGTTTCGTCCCGAGATGTCACCTCT
TTCAGGAAGATGCCACTTATCCAGAGGTGGTGTGTCACGCTACAGGCTTCTTCCC
```

>Haplotype03

```
GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGATGATCCCA
AAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGACGATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATCA
GTCAGGGTAATGAGGAGACCTACAAAGTCAATGTGGGTAATCTGATGGGTCGTTTTAACCA
GACTAAAGGAGTTCACACATGGCAGAGGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGACAACACC
GTTAGAGGATACAGCCAGTGGGGTTATGATGGAGAAGATTTTCGTCAGCTTTGATCTGAAGA
```

CTGTCACCTACACTGCAGCCAAATCTCAAGCTGTGATCACCAAACAGAAGTGGGATCAGAA
TCCTGGTGATACTGTGGGCAGGAAGAACTACCTGGAGAAAACCTGTATTGAGTGGTTAAAG
AAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACACTGGAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGATGTCACTCT
TTCAGGAAGATGCCACTTATCCAGAGGTGGTGTGCCACGCTACAGGCTTCTTCCC

>Haplotype04

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGATGATCCCA
AAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGACGATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATCA
GTCAGGGTAATGAGGAGACCTACAAAGTCAATGTGGGTAATCTGATGGGTCGTTTTAACCA
GACTAAAGGAGTTCACACATGGCAGAGGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGACAACACC
GTTAGAGGATACAGCCAGTGGGGTTATGATGGAGAAGATTTTCGTCAGCTTTGATCTGAAGA
CTGTCACCTACACTGCAGCCAAATCTCAAGCTGTGATCACCAAACAGAAGTGGGATCAGAA
TCCTGGTGATACTGTGGGCAGGAAGAACTACCTGGAGAAAACCTGTATTGAGTGGTTAAAG
AAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACACTGGAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGATGTCACTCT
TTCAGGAAGATGCCACTTATCCAGAGGTGGTGTGCCACGCTACAGGTTTCTTCCC

>Haplotype05

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGATGATCCCA
AAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGACGATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATCA
GTCAGGGTAATGAGGAGACCTACAAAGTCAATGTGGGTAATCTGATGGGTCGTTTTAACCA
GACTAAAGGAGTTCACACATGGCAGAGGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGACAACACC
GTTAGAGGATACAGCCAGTGGGGTTATGATGGAGAAGATTTTCGTCAGCTTTGATCTGAAGA
CTGTCACCTACACTGCAGCCAAATCTCAAGCTGTGATCACCAAACAGAAGTGGGATCAGAA
TCCTGGTGATACTGTGGGCAGGAAGAACTACCTGGAGAAAACCTGTATTGAGTGGTTAAAG
AAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACACTGGAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGATGTCACTCT
TTCAGGAAGATGCCACTTATCCAGAGGTGGTGTGTCACGCTACAGGTTTCTTCCC

>Haplotype06

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGATGATCCCA
AAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGACGATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATCA
GTCAGGATAATGAGGAGACCTACAAAGTCAATGTGGGTAATCTGATGGGTCGTTTTAACCA
GACTAAAGGAGTTCACACATGGCAGAGGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGACAACACC
GTTAGAGGATACAGCCAGTGGGGTTATGATGGAGAAGATTTTCGTCAGCTTTGATCTGAAGA
CTGTCACCTACACTGCAGCCAAATCTCAAGCTGTGATCACCAAACAGAAGTGGGATCAGAA
TCCTGGTGATACTGTGGGCAGGAAGAGCTACCTGGAGAAAACCTGTATTGAGTGGTTAAAG
AAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACACTGGAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGATGTCACTCT
TTCAGGAAGATGCCACTTATCCAGAGGTGGTGTGTCACGCTACAGGCTTCTACCC

>Haplotype07

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGATTGACTACTATGACAGTAAGATCAGGAAAATGATCCCG
AAGACGGAGTGGATACAGAAGCATGAGGGAGACGATTATTGGAGCAGAAACACACAGAATA
TGCAGAGTACTCAGGAGACCTACAAAGTCCATGTGGCCATAGCAATGCAGCGTTTTAATCA
GACTAAAGGAGTTCACACAGTGCAGTACATGTGTGGCTGTGAGCTGGATGATGACGGCACC
ACTAGAGGATACAGACGGTACGGTTACGATGGAGAGGATTTCTCATATATGATCTGAAAA
CTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAAACAGAAGTGGGAGTCTGA
TGCTGCTGATATGAATTATCGAAAGAACTACCTGGAGAAAGAGTGTATCGAGTGGTTAAAG
AAGTATCTGTCTTATGGCAGAGAGACTCTGGAGAGAAAAGTTCGTCTGAGGTGTTAGTGT
TTCAAGAAGAAGCCACTTCTCCAGAGGTGGTGTGTCACGCTACAGGCTTTTACCC

>Haplotype08

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGGAAGACGATCCCA
 AAGACGGAGTGGATACAGAAGCATGAGGGAGACGATTACTGGAGCAGAAACACACAGAACA
 TGCAGGGTCAGGAGGAGACCTACAAAGTCCATGTGGCCATAGCAATGCAGCGTTTTAATCA
 GACTAAAGGTGTTACACAGTGCAGTACATGTGTGGCTGTGAGCTGGATGATGACGGCACC
 ACTAGAGGATACAGACAGTACGGTTACGATGGAGAGGATTTCTCATATATGATCTGAAAA
 CTGAAACCTGGACTGCAGCCAAACCTCAGGCTGTGAGCACCAACAGAAGTGGGAGTCTGA
 TGCTGCTGATATGAATTATCGAAAGAACTACCTGGAGAAAGAGTGTATCGAGTGGTTAAAG
 AAGTATCTGTCTTATGGCAGAGAGACTCTGGAGAGGAAAGTTCGTCCTGAGGTGTTAGTGT
 TTCAAGAAGAAGCCACTTCTCCAGAGGTGGTGTGTCACGCTACAGGCTTTTACCC

>Haplotype09

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGCCTACTATGACAGTAACATCAGGAACCTACATCTCA
 AAGGCAGACTGGCTACAGAAGGTTGATGCTGATGATCCAAATTACTGGACCAGAAACACAA
 ACAATCTGCAGGGTTCTCAGGAGACCTTTAAAGTCGATATGGGTACACTGATGAGCCGCTT
 TAACCAGACTAAAGGAGTTCACACAATACAGGAGATGTACGGCTGTGAGTTGGATGATGAC
 GGCACCACTAGAGGATACTATCAGGACAGTTATGATGGAGAAGATTTTATTAGCTTTGATC
 TGAAGACTCTGACCTGGATCGCTCCGACACCTCAGGCTCTGATCACCAAGAACAAGTGGGA
 TCCTGATAGTGGATATAATAAATACTGGAAGAACTACCTGGAGAAGGAGTGTATCGACTGG
 ATAAAGAAGTACGTGTCATACGGCAGAGAGACTCTGGAGAGGAAAGAGCATCCCAAGGCGT
 CAGTGTGTTGAGAAACAGTCTCCTTCTCCAGAGGTGGTGTGTCACGCTACAGGTTTCTTCCC

>Haplotype10

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTACGTTCTACGACAGTAACAAAAGGAGCTACATTCCA
 AAGACTGACTGGATAAAGAAGAATGAGGGAGAAGATTATTGGAGCAGAGAGACACAGCGCT
 GTCACAATGATCAGGACTTATTCAAAGTCAATATGGGTACACTGATGGGTCGTTTTAACCA
 GGCTAAAGGAGTTCACACATGGCAGAACATGTACGGCTGTGAGTTGGATGATGACGGCACC
 ACTAGAGGATATGATCAGTACGGTTATGATGGAGAAGATTTCTCAGCTTTGATCTGAAGA
 CTCTGACCTGGATCGCTTCGACACCTCAGGCTCTGATCACCAAGAACAAGTGGGATCCTGA
 TAGTGGAAGGAATAATTACCTGAAGAACTATTATGAGAACACCTGTATCGAGTGGTTAAAG
 AAGTACCTGACTTACGGCAAAGAGACTCTGGAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGT
 TCCAGGAAGAGTCTTCTCCAGAGGTGGTGTGTCACGCTACAGGCTTTTACCC

>Haplotype11

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTACGTTCTACGACAGTAACAAAAGGAGCTACATTCCA
 AAGACTGACTGGATAAAGAAGAATGGGGGAGAAGATTATTGGAGCAGAGAGACACAGCGCT
 GTCACAATGATCAGGACTTATTCAAAGTCAATATGGGTACACTGATGGGTCGTTTTAACCA
 GACTAAAGGAGTTCACACATGGCAGAACATGTACGGCTGTGAGTTGGATGATGACGGCACC
 ACTAGAGGATATGATCAGTACGGTTATGATGGAGAAGATTTCTCAGCTTTGATCTGAAGA
 CTCTGACCTGGATCGCTCCGACACCTCAGGCTCTGATCACCAAGAACAAGTGGGATCCTGA
 TAGTGGAAGGAATAATTACCTGAAGAACTATTATGAGAACACCTGTATCGAGTGGTTAAAG
 AAGTACCTGACTTACGGCAAAGAGACTCTGGAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGT
 TCCAGGAAGAGTCTTCTCCAGAGGTGGTGTGTCACGCTACAGGCTTTTACCC

>Haplotype12

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGAGAGAAGATCCCA
 AAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGACGATTACTGGAGCAGGGGCACACAGATCA
 GGCAGGGTAATCAGGAGTGGTTCAAAGCCAATATACCTATAGCAATGCAGCGCTTTAATCA
 CACTAAAGGAGTTCACACAGTACAGGTGATGTTTTGGCTGTGAGCTGGATGATGACGGCACC
 ACTAGAGGATACGATCAGTACGGTTATGATGGAGAAGATTTTCATCAGTCTGGATCTGAAGA
 CTCTGACCTGGATCGCTCCGACACCTCAGGCTCTGATCACCAAGAACAAGTGGGATCAGAA

TAGTGGGCAGAAGAATAACTGGAAGAACTACCTGGAGAACGAGTGTATTGAGTGGTTAAAG
AAGTACGTGTCATACGGCAGAGAGACTCTGGAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCATTAGTGT
TCCAGGAAGAGTCTTCTCCAGAGGTGGTGTGCCACGCTACAGGCTTCTACCC

>Haplotype13

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGGAGAATGATCCCA
AAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGACGATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATTC
TGCAGGGTACTCAGGAGAGCTTCAAAGCCAGTGTGGGTATAGTGATGGAGCGTTTTTAACCA
GACTAATGGAGTTCACACAGTGCAGCTGATGTACGGCTGTGAGCTGAATGATGGCTCAAAT
ACAGGATATTTCCAGTACGGTTATGATGGAGAGGATTTTCATCAGTCTGGATCTGAACACTA
AAACCTGGATCGCTCCGACACCTCAGGCTCTGATCACCAAGAACAAGTGGGATCAAACAGG
AGCTGATGCTGATTACTGGAAGGGATACGCGGAGAACACCTGTATCGAGTGGTTAAATAAA
TACGTGTCATACGGCAGAGAGACTCTGGAGAGGAAAGTTCGTCTGAGGCGTTAGTATTCC
AGGAAGAGTCTTCTCCAGAGGTGGTGTGTACGCTACAGGCTTTTACCC

>Haplotype14

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGATTGACTACTATGACAGTAAGATCAGGGAAATGATCCCG
AAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGACGATTATTGGAGCAGAGAGACACAGAAAC
AGCAGGGTACTGAGGAGACCTTCGAAGCCGGTGTGGGTGCACTGATGGGTCGTTTTAACCA
GACTAAAGGAGTTCACACAGTACAGATGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGACGGCACC
ACTAGAGGATACGAACAGTGGGGGTATGATGGAGAAGATTTCTCAGCTTTGACCTGAAGA
CTCTGACCTGGATCGCTGCAACACGTCAGGCTCTGATCACCAAGAACAAGTGGGATACAAA
TAGTGGAAGGAATGATTACCTGAAGGGATACTATGAGAAAGAGTGTATCGAGTGGATAAAG
AAGTACGTGTCTTATGGCAGAGAGACTCTGGAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGT
TCCAGGAAGAGTCTTCTCCAGAGGTGGTGTGTACGCTACAGGCTTCTTCCC

>Haplotype15

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGGAGAATGATCCCA
AAGACGGAGTGGATACAGAAGAATGTGGGAGACGATTATTGGAGCAGAGAGACACAGATTC
TGCAGGGTACTCAGGAGAGCTTCAAAGCCAGTGTGGGTATAGTGATGGAGCGTTTTAACCA
GACTAATGGAGTTCACACAGTGCAGCTGATGTACGGCTGTGAGCTGAATGATGACGGCACC
ACTAGAGGATACTACCAGTTCGGTTATGATGGAGAAGATTTTGTGACCTTTGACCTGAAGA
CTCTGACCTGGATCGCTCCGACACCTCAGGCTCTGATCACCAAGAACAAGTGGGAGTCTGA
TAGTGGTTTTAATAAGCGCAGGGAGGACTACCTGAAGAACATCTGTATCGACTGGTTAAAG
AAGTACATGAATTACGGCAGACAGACTCTGGAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGT
TCCAGGAAGAGTCTTCTCCAGAGGTGGTGTGTACGCTACAGGTTTCTACCC

>Haplotype16

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTACGTTCTATGACAGTAAGATCAGGAAGTCGATCCCA
AAGACGGAGTGGATAAAGAAGAATGAGGGAGACGATTATTGGAGCGGAGAGACACAGAAAA
TGCAGGGTACTGAGGAGAGCTTCAAAGCCAGTGTGGGTAATCTGATGCAGCGTTTTAACCA
GACTAAAGGAGTTCACACATGGCAGATGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGACGGCACC
ACTAGAGGATACTACCAGTTCGGTTATGATGGAGAAGATTTTGTGACCTTTGACCTGAAGA
CTCTGACCTGGATCGCTCCGACACCTCAGGCTCTGATCACCAAGAACAAGTGGGAGTCTGA
TAGTGGTTTTAATAAGCGCAGGGAGGACTACCTGAAGAACATCTGTATCGACTGGTTAAAG
AAGTACATGAATTACGGCAGACAGACTCTGGAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGTTAGTGT
TCCAGGAAGAGTCTTCTCCAGAGGTGGTGTGTACGCTACAGGCTTTTACCC

>Haplotype17

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGACTACTATGACAGTAAGATCAGGAGAATAATCCCG
AAGACGGAGTGGATAAAGAAGAATGATGCTGAAGATCCAGAGTACTGGAACAGAAACACAC
AGACTGCACAGGGTACTGAGGAGACCTTCAAAGTCGGTGTGGGTATACTGATGGGTCGTTT
TAACCAGACTAAAGGAGTTCACACGTGGCAGCAGATGTACGGCTGTGAGCTGAATGATGAT
GACGGCACCCTAGAGGATACATGCAGTTCGGTTATGATGGAGAGGATTTTGTGACCTTTG
ACCTGAAGACTCTGACCTGGATCGCTCCGACACCTCAGGCTCTGATCACCAAGAACAAGTG
GGATCCTGATAGTGGTTTTAATAAGGGAACAGAGGACTACCTGAAGAACGAGTGTATCGAG
TGGTTAAATAAGTACGTGTCATACGGCAGAGAGACTCTGGAGAGGAAAGTTCGTCCTGAGG
CGTTAGTGTTCCAGGAAGAGTCTTCTCCAGAGGTGGTGTGTACGCTACAGGCTTTTACCC

>Haplotype18

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGTGTACTATGACAGTAAAATCAGGAGTTACATCCCG
AAGACGGAGTGGATACGGAAGATCGATGCTGATGAACCACATTGCTGGGACAGTGAGACCC
GGATTGCACGGGTTGAAGAACAGAGCTTCAAGGCCAGTGTAGCTAAAGTGATGCAGCGCTT
TAATCAAACCTCAAGGAGTTCACACAGTGCAGGAGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGAC
GGCACCCTAGAGGATACAGACAGTACGGATATGATGGAGAAGATTTTCATCAGTCTGGATC
TGAAAACGAAAACCTGGACTGCAGCCAAGCCTCAAGCTAAGGTCACCAAACAGCGGTGGGA
GTCTGATGTTAGTTATACAGATTACTGGAAGAACTACCTGGAGAACACCTGCATCGACTGG
TTAAAGAAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACGCTGGAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGT
TGCTCTTTCAGATGGAATCTTCTCCAGAGGTGGTGTGCCACGCTACAGGCTTCTTCCC

>Haplotype19

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGTGTACTATGACAGTAAAATCAGGAGTTACATCCCG
AAGACGGAGTGGATACGGAAGATCGATGCTGATGAACCACATTACTGGGACAGTGAGACCC
GGATTGCACGGGTTGAAGAACAGAGCTTCAAGGCCAGTGTAGCTAAAGTGATGCAGCGCTT
TAATCAAACCTCAAGGAGTTCACACAGTGCAGGAGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGAC
GGCACCCTAGAGGATACAGACAGTACGGATATGATGGAGAAGATTTTCATCAGTCTGGATC
TGAAAACGAAAACCTGGACTGCAGCCAAGCCTCAAGCTAAGGTCACCAAACAGCGGTGGGA
GTCTGATGTTAGTTATACAGATTACTGGAAGAACTACCTGGAGAACACCTGCATCGACTGG
TTAAAGAAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACGCTGGAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGT
TGCTCTTTCAGATGGAATCTTCTCCAGAGGTGGTGTGTACGCTACAGGTTTCTTCCC

>Haplotype20

GGGTCAGGTGGATGGACAGCAGTTTGTGTACTATGACAGTAAAATCAGGAGTTACATCCCG
AAGACGGAGTGGATACGGAAGATCGATGCTGATGAACCACATTACTGGGACAGTGAGACCC
GGATTGCACGGGTTGAAGAACAGAGCTTCAAGGCCAGTGTAGCTAAAGTGATGCAGCGCTT
TAATCAAACCTCAAGGAGTTCACACAGTGCAGGAGATGTACGGCTGTGAGCTGGATGATGAC
GGCACCCTAGAGGATACAGACAGTACGGATATGATGGAGAAGATTTTCATCAGTCTGGATC
TGAAAACGAAAACCTGGACTGCAGCCAAGCCTCAAGCTAAGGTCACCAAACAGCGGTGGGA
GTCTGATGTTAGTTATACAGATTACTGGAAGAACTACCTGGAGAACACCTGCATCGACTGG
TTAAAGAAATATGTGTCTTATGGCAGAGAGACGCTGGAGAGGAAAGTTCGTCCCGAGGCGT
TGCTCTTTCAGATGGAATCTTCTCCAGAGGTGGTGTGTACGCTACAGGCTTTTACCC

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	น.ส. อัญลักษณ์ วชิรไชยการ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	22 มกราคม 2528
สถานที่เกิด	จ.ปราจีนบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทั่วไป)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นิสิต
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยง สัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา