โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลากระบอก (*Liza subviridis*) ในชายฝั่งทะเลอันดามัน

Population Genetic Structure of Greenback Mullet (*Liza subviridis*) Along the Andaman Sea Coast of Thailand

วีระเกียรติ ทรัพย์มี[1*] จุฑามาศ ศุภพันธ์[2] แจ่มจันทร์ เพชรศิริ[3] และประดิษฐ์ แสงทอง[4]

Verakiat Supmee[1*] Juthamas Suppapan[2] Jamjun Pechsiri[3] and Pradit Sangthong[4]

[1]สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช จ.นครศรีธรรมราช 80110

[2]หลักสูตรครุศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช จ.นครศรีธรรมราช 80280

[3]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง จ. พัทลุง 93110

[4]ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900

[1]Department of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat Campus, Nakhon Si Thammarat 80110

[2] Master of Education in Science program, Faculty of Education, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Nakhon Si Thammarat 80280

[3]Department of Biological and Environmental Sciences, Faculty of Science, Thaksin University, Phattalung Campus, Phattalung 93110

[4]Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

*Corresponding author E–mail : audy422r@yahoo.com

บทคัดย่อ

ศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลากระบอก (*Liza subviridis*) ตลอดชายฝั่งทะเลอันดามัน วิเคราะห์จากความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณคอนโทรลรีเจียนขนาด 596 - 606 คู่เบส เก็บตัวอย่างจาก 6 จังหวัด คือ จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ จังหวัดภูเก็ต จังหวัดพังงา และจังหวัดระนอง จำนวนทั้งหมด 115 ตัว พบว่า มีแฮโพลไทป์ทั้งหมด 89 แฮโพลไทป์ ประกอบด้วย shared haplotype 15 แฮโพลไทป์ และ rare haplotype 74 แฮโพลไทป์ ค่า haplotype diversity และ nucleotide diversity มีค่า 0.990 และ 0.032 ตามลำดับ ทดสอบ neutrality test พบว่าค่า Tajima's *D* และ Fu' *Fs* มีค่า -1.595 และ -23.941 และมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งเบี่ยงเบนไปจากค่าคาดหวังตาม neutral evolution ในทิศทางที่แสดงว่าประชากรปลากระบอกในทะเลอันดามันเคยมีการขยายขนาดมาก่อน การทดสอบ mismatch distribution พบว่า ประชากรน่าจะมีการขยายขนาดมาประมาณ 110,000 ปีที่ผ่านมาในยุคไพลสโตซีน การทดสอบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี AMOVA พบว่า ประชากรปลากระบอกในทะเลอันดามันมีโครงสร้างทางพันธุกรรม โดยแบ่งเป็นกลุ่มประชากรอันดามันตอนล่างและกลุ่มประชากรอันดามันตอนบน ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำข้อมูลมาใช้เป็นแนวทางในการพิจารณาจัดการปลากระบอกในทะเลอันดามันได้

คำสำคัญ :คอนโทรลรีเจียน ความหลากหลายทางพันธุกรรม ประวัติประชากร อนุรักษ์

Abstract

Population genetic structure of the Greenback Mullet (*Liza subviridis*) along the Andaman Sea coast of Thailand was analyzed based on the variations of the nucleotide sequences of the mitochondrial DNA control region (mtDNA CR) with a size of 596 – 606 bp. The mtDNA CR sequences of 115 individuals collected from 6 sampling sites : Satun, Trang, Krabi, Phuket, Phang Nga and Ranong province, were analyzed. A total of 89 haplotypes, consisting of 15 shared and 74 rare haplotypes, were identified. Estimated values of haplotype diversity and nucleotide diversity were 0.990 and 0.032, respectively. The results of neutrality tests, both Tajima's *D* and Fu's *Fs* statistics, yielded negative values (-1.595 and -23.941, respectively), which were statistically significant deviation from the neutrality, indicating that the *L. subviridis* along the Andaman Sea coast had experienced population expansion. Mismatch distribution analysis indicated that a possible expansion that may occur 110,000 years ago during the Pleistocene glaciations period. The AMOVA analysis also revealed genetic differentiation of *L. subviridis* between the lower and upper coast of Andaman Sea populations. This study gave necessary information contributing to efficient strategies to conserve this species along the Andaman Sea coast.

Key words: control region, genetic variation, demographic history, conservation

บทนำ

ปลากระบอก (*Liza subviridis*) เป็นปลาที่อาศัยตามชายฝั่งบริเวณป่าชายเลน พฤติกรรมการสืบพันธุ์ของปลากระบอกจะมีการอพยพจากป่าชายเลนสู่แนวชายฝั่งเพื่อวางไข่ (Chang *et al.*, 2004) หลังจากวางไข่ตัวอ่อนจะอยู่ในระยะแพลงก์ตอนและอาศัยอยู่ใกล้กับชายฝั่งโดยอาศัยการเคลื่อนที่ตามกระแสน้ำบริเวณชายฝั่งจนเข้าสู่ระยะวัยรุ่น (juvenile) จึงว่ายน้ำกลับสู่ป่าชายเลนและเจริญเป็นตัวเต็มวัย (adult) (Chang and Tzeng, 2000) จากความสามารถในการแพร่กระจายของตัวอ่อนที่เคลื่อนที่ได้ในระยะทางจำกัดทำให้มีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างประชากรได้น้อย จึงทำให้มีโอกาสเกิดการแบ่งแยกโครงสร้างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรได้สูง โดยเฉพาะตลอดแนวชายฝั่งทะเลอันดามันซึ่งมีพื้นที่ป่าชายเลนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศไทย (Juntarashote, 2003) รวมระยะทางประมาณ 900 กิโลเมตร ครอบคลุมพื้นที่ 1,764.86 ตารางกิโลเมตรตั้งแต่จังหวัดสตูลถึงจังหวัดระนองซึ่งมีพื้นที่แยกย่อยหลายพื้นที่ (Aungtonya, 2000) อาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปลากระบอกได้

ปลากระบอกเป็นปลาเศรษฐกิจที่นิยมบริโภคเนื่องจากสามารถนำมาทำเป็นอาหารได้หลายชนิด จากข้อมูลทางสถิติประมงในปี พ.ศ. 2553 พบว่าปลากระบอกที่จับได้มีปริมาณลดลง (Fishery Statistics Analysis and Research Group, 2010) ดังนั้นการบริหารจัดการปลากระบอกเพื่อให้ใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืนจึงเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งจำเป็นต้องมีข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อเป็นแนวทางในการจัดการ วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของปลากระบอกที่อาศัยตามแนวชายฝั่งทะเล

อันดามัน โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณคอนโทรลรีเจียน (control region) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอัตราการกลายพันธุ์สูง จึงเหมาะสมในการนำมาศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในประชากร นอกจากนั้นยังมีการถ่ายทอดพันธุกรรมทางแม่ จึงมีลักษณะเป็นแฮพลอยด์ ซึ่งสามารถใช้ประชากรเพื่อศึกษาในจำนวนน้อยกว่าการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมอื่นจากจีโนมในนิวเคลียสได้ (Boore, 1999) อีกทั้งไม่เกิดรีคอมบิเนชัน ดังนั้นลูกจึงมีจีโนมเหมือนกับแม่ ทำให้สามารถศึกษาแบบแผนการถ่ายทอดได้โดยตรง (Avise, 1984) ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำข้อมูลที่ได้เป็นแนวทางในการพิจารณาจัดการประชากรปลากระบอกในธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพและคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปลากระบอกตลอดชายฝั่งทะเลอันดามันจากจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ จังหวัดภูเก็ต จังหวัดพังงา และจังหวัดระนอง รวมทั้งหมดจำนวน 115 ตัว (Figure 1, Table1) แช่ตัวอย่างในน้ำแข็งแล้วนำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

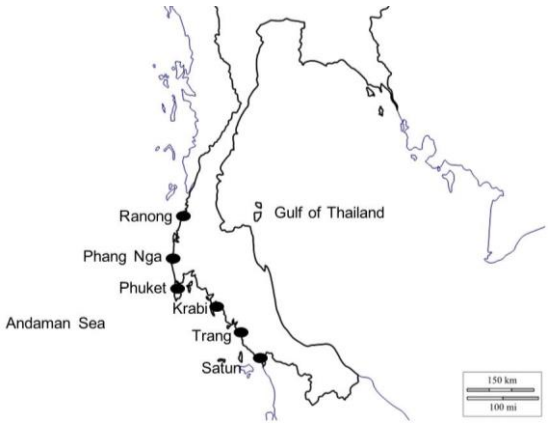

Figure 1 The collecting localities for *L. subviridis* along the Andaman Sea coast

2. การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อปลาโดยใช้ชุดสกัด Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN, BIOTECH CORP.) ตามวิธีและขั้นตอนที่แนบมากับชุดสกัดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณคอนโทรลรีเจียนด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ forward primer LSCR_H1 5'- TCA ACT CCT ATC TAT AGC TCC C 3' และ reverse primer LSCR_L1 5'- GTC CAT CTT AAC ATC TTC AGT GTC 3' (Suppapan, 2015) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดพีซีอาร์ ประกอบด้วย 10X *Taq* buffer 5 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 7.5 ไมโครลิตร, 2 mMdNTPs mix 4 ไมโครลิตร, 10 μM primer forward 2 ไมโครลิตร,10 μM primer reverse 2 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (RBCbiosciences, USA) 0.5 ไมโครลิตร (2.5 unit), DNA template 5 ไมโครลิตร (50-100 ng) และ ultrapure water 24 ไมโครลิตร รวมปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร

ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่อง Mastercycler, Eppendorf (Germany) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ นำผลผลิตที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN, BIOTECH CORP.) ตามที่วิธีและขั้นตอนที่แนบมากับชุดทำผลผลิตให้บริสุทธิ์ จากนั้นส่งดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการ 1ST Base Laboratory ประเทศมาเลเซีย

3. การจัดการข้อมูลและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

3.1 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

เชื่อมต่อข้อมูลชิ้นส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 5' และ 3' ของแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม CAP3 software (Huang and Madan, 1999) ทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW version 2.0.12 (Larkin *et al*., 2007) แล้วตรวจสอบความถูกต้องด้วยสายตาอีกครั้ง วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยหาค่า nucleotide diversity (π) (Nei, 1987), haplotype diversity (*h*) (Nei, 1987) และค่า mean number of nucleotide differences ระหว่างแฮโพลไทป์ทั้งหมดด้วยโปรแกรม DnaSP version 5.00 (Librado and Rozas, 2009)

3.2 การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

วิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี Analysis of Molecular Variance (AMOVA) เพื่อเปรียบเทียบระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรโดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) โดยวิเคราะห์ค่า F-statistic ได้แก่ Φ_{CT}, Φ_{SC} และ Φ_{ST} ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations แบ่งการวิเคราะห์เป็น 2 แบบ โดยการวิเคราะห์แบบแรก แบ่งประชากรเป็น 6 กลุ่มตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง (single region) ได้แก่ จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ จังหวัดภูเก็ต จังหวัดพังงา และจังหวัดระนอง การวิเคราะห์แบบที่สองแบ่งกลุ่มประชากรตามแนวเส้นละติจูด ได้แก่ กลุ่มประชากรในทะเลอันดามันตอนล่าง ประกอบด้วยจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดภูเก็ต และกลุ่มประชากรในทะเลอันดามันตอนบน ประกอบด้วยจังหวัดพังงา และจังหวัดระนอง วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรด้วยวิธี pairwise F_{ST} ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010)

3.3 การวิเคราะห์ประวัติประชากร

วิเคราะห์ประวัติประชากรโดยใช้การทดสอบ 4 วิธีได้แก่ (1) ทดสอบ selective neutrality โดยวิเคราะห์ค่า Tajima's *D* (Tajima, 1989) และ Fu's *Fs* (Fu, 1997) เพื่อทดสอบการเบี่ยงเบนของประชากรจาก neutral evolution (2) วิเคราะห์ mismatch distribution เพื่อศึกษาการขยายขนาดของประชากรภายใต้สมมติฐาน sudden expansion model โดยใช้ค่าทดสอบ Harpending Raggedness index (Harpending, 1994) เพื่อทดสอบการเข้ากันได้ของค่าทดสอบกับค่าคาดหวัง และ sum of squared deviations (*SSD*) เพื่อทดสอบ goodness-of-fit ทุกวิธีการวิเคราะห์ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN

version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) (3) ประเมินขนาดของประชากรด้วยพารามิเตอร์ θ_0 และ θ_1 เมื่อ θ_0 และ θ_1 เท่ากับ $2N\mu$ เมื่อ N คือค่า effective female population size (4) คำนวณเวลาในการขยายขนาดประชากร (t) โดยใช้สูตร $t = \tau/2\mu$ เมื่อ τ คือ expansion time และ $2\mu = \mu \times$ generation time $\times$ number of bases เมื่อค่า μ คือค่า mutation rate และมีค่าเท่ากับ 3.6 % per million year (Henriques *et al*., 2014)

ผลการวิจัย

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลากระบอกแต่ละตัวมีลำดับเบสตั้งแต่ 596 - 606 คู่เบส มีตำแหน่ง align sites 585 ตำแหน่ง แบ่งเป็น monomorphic sites 390 ตำแหน่งและ polymorphic sites 195 ตำแหน่ง (singleton variable site 91 ตำแหน่ง และ parsimony variable site 104 ตำแหน่ง) ประกอบไปด้วย 89 แฮโพลไทป์ โดยเป็นแฮโพลไทป์ชนิด shared haplotype จำนวน 15 แฮโพลไทป์ แบ่งเป็น shared haplotype ภายในประชากร 9 แฮโพลไทป์ และ shared haplotype ระหว่างประชากร 6 แฮโพลไทป์ โดยแฮโพลไทป์ H41 มีสมาชิกจากแต่ละจังหวัดมากที่สุดคือ 3 จังหวัด ได้แก่จังหวัดกระบี่ จังหวัดพังงา และจังหวัดระนอง ส่วนแฮโพลไทป์ที่มีสมาชิกจากจังหวัด 2 จังหวัด มีจำนวน 5 แฮโพลไทป์ ได้แก่ H02, H14, H15, H20 และ H25 (Table 2) พบแฮโพลไทป์ที่เป็น rare haplotype จำนวนทั้งหมด 74 แฮโพลไทป์ แบ่งเป็น จังหวัดสตูล 15 แฮโพลไทป์ (H01, H03, H04, H05, H06, H07, H08 ,H09, H10, H11, H12, H13, H16, H17, H18) จังหวัดตรัง 13 แฮโพลไทป์ (H21, H22, H23, H24, H26, H27, H29, H30, H31, H32, H33, H34, H35) จังหวัดกระบี่13 แฮโพลไทป์ (H36, H37, H38, H40, H43, H44, H45, H46, H47, H48, H49, H50, H51) จังหวัดภูเก็ต 13 แฮโพลไทป์ (H61, H62, H63, H64, H65, H66, H67, H68, H69, H70, H71, H72, H73) จังหวัดพังงา 7 แฮโพลไทป์ (H52, H54, H55, H57, H58, H59, H60) และจังหวัดระนอง13 แฮโพลไทป์ (H75, H76, H77, H79, H80, H81, H82, H84, H85, H86, H87, H88, H89) ค่า haplotype diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.784-1.000 โดยมีค่าของประชากรรวมคือ 0.990$\pm$0.004 ส่วนค่า nucleotide diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.020-0.037 โดยมีค่าของประชากรรวมคือ 0.032$\pm$0.001 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมได้แก่ จำนวนแฮโพลไทป์, จำนวน polymorphic sites, haplotype diversity (h) และ nucleotide diversity (π) แสดงใน Table1

Table 1 Collecting localities, number of individuals per sampling locality (*N*) and summary statistics of genetic variability for *L. subviridis* along the Andaman Sea coast

Locality	*N*	No. haplotypes	No. polymorphic sites	Haplotype diversity (*h*) (mean ± SD)	Nucleotide diversity (π) (mean ± SD)
Satun	18	18	85	1.000±0.019	0.034±0.001
Trang	20	17	80	0.979±0.024	0.033±0.001
Krabi	19	17	71	0.988±0.021	0.031±0.002
Phuket	19	18	96	0.994±0.019	0.037±0.003
Phang Nga	19	10	119	0.784±0.098	0.035±0.009
Ranong	20	16	53	0.974±0.025	0.020±0.003
Total	115	89	195	0.990±0.004	0.032±0.001

Table 2 Share haplotype distributions of *L. subviridis* from 6 localities along the Andaman Sea coast

Haplotype	Satun	Trang	Krabi	Phuket	Phang Nga	Ranong	Total
H02	1	-	-	1	-	-	2
H14	1	-	-	1	-	-	2
H15	1	-	1	-	-	-	2
H19	-	2	-	-	-	-	2
H20	-	1	-	1	-	-	2
H25	-	1	-	1	-	-	2
H28	-	3	-	-	-	-	3
H39	-	-	2	-	-	-	2
H41	-	-	2	-	1	3	6
H42	-	-	2	-	-	-	2
H53	-	-	-	-	9	-	9
H56	-	-	-	-	2	-	2
H74	-	-	-	2	-	-	2
H78	-	-	-	-	-	2	2
H83	-	-	-	-	-	2	2

2. โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลากระบอกในทะเลอันดามัน เมื่อวิเคราะห์โดยแบ่งประชากรเป็น 6 กลุ่มตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง พบว่ามีโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร โดยมีค่า Φ_{ST} เท่ากับ 0.032 (p= 0.004)(Table3) เมื่อวิเคราะห์โดยแบ่งกลุ่มประชากรเป็นกลุ่มประชากรในทะเลอันดามันตอนล่าง และกลุ่มประชากรในทะเลอันดามันตอนบน พบว่ามีโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร โดยมีค่า Φ_{CT} เท่ากับ 0.047 (p= 0.036)(Table3) ผลการวิเคราะห์ค่า pairwise F_{ST} พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างประชากรจังหวัดสตูลกับจังหวัดพังงา, จังหวัดสตูลกับจังหวัดระนอง,จังหวัดตรังกับจังหวัดพังงา, จังหวัดตรังกับจังหวัดระนอง, จังหวัดกระบี่กับจังหวัดระนอง, จังหวัดภูเก็ตกับจังหวัดพังงา, จังหวัดภูเก็ตกับจังหวัดระนอง และจังหวัดพังงากับจังหวัดระนอง (Table4)

Table 3 Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) of *L. subviridis*

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	*p-value*
1) Single region					
Among populations	5	75.801	0.309Va	3.24	Φ_{ST} = 0.032*
Within populations	109	1006.938	9.237Vb	96.76	
Total	114	1082.739	9.547		
2) Lower and Upper of Andaman Sea					
Among groups	1	34.489	0.468Va	4.80	Φ_{CT}= 0.047*
Among populations within groups	4	41.312	0.057Vb	0.58	Φ_{SC}= 0.006
Within populations	109	1006.938	9.237Vc	94.62	Φ_{ST}= 0.053*
Total	114	1082.739	9.763		

*significant differentiation (p<0.05)

Table 4. Population pairwise F_{ST} values of *L. subviridis* in Andaman Sea

	Satun	Trang	Krabi	Phuket	Phang Nga	Ranong
Satun	-					
Trang	0.007	-				
Krabi	0.001	0.012	-			
Phuket	0.031	0.001	0.002	-		
Phang Nga	0.050*	0.044*	0.017	0.042*	-	
Ranong	0.086*	0.105*	0.085*	0.061*	0.049*	-

*significant differentiation (p<0.05)

3. ประวัติประชากร

จากการทดสอบประวัติประชากรได้ผลดังนี้ (1) การทดสอบ selective neutrality ด้วยวิธี neutrality test พบว่าค่า Tajima' s *D* มีค่าติดลบในทุกจังหวัด โดยมีค่าของประชากรรวม คือ - 1.595 (p= 0.025) และค่า Fu' *Fs* มีค่าติดลบในทุกจังหวัดโดยมีค่าของประชากรรวมคือ - 23.941(p= 0.013)(Table5) (2) การทดสอบ mismatch distribution พบว่าค่า *SSD* ของประชากรรวม มีค่า 0.002 (p=0.458) และค่า Harpending Raggedness index ของประชากรรวมมีค่า 0.002 (p=0.771) (Table5) (3) ค่าพารามิเตอร์ θ_0 ของประชากรรวมมีค่า 0.005 และค่า θ_1 ของประชากรรวมค่า 70.619 โดยในทุกจังหวัดมีค่า θ_1 มากกว่า θ_0 (Table5) (4) คำนวณระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรพบว่ามีการขยายขนาดมาเป็นระยะเวลา 116,125 ปีที่ผ่านมา (Table5)

Table 5 Parameter indices of mismatch distribution analysis, neutrality test and expansion time of *L. subviridis*

Locality	Tajima's *D*	Fu' s *Fs*	τ	θ_0	θ_1	*SSD*	Rag	Expansion time (year ago)
Satun	-0.753*	-6.058*	6.787	0.021	405.517	0.007	0.017	301,162
Trang	-0.595*	-2.331*	6.125	0.000	99999.000	0.015	0.023	271,787
Krabi	-0.431*	-3.379*	6.640	0.000	264.462	0.023	0.019	294,639
Phuket	-0.848*	-4.141*	2.000	2.932	138.110	0.009	0.013	88,746
Phang Nga	-1.619*	-4.255*	1.001	0.000	99999.000	0.657	0.073	44,417
Ranong	-0.659*	-2.907*	1.816	15.960	99999.000	0.046	0.062	80,582
Total	**-1.595***	**-23.941***	**2.617**	**0.005**	**70.619**	**0.002**	**0.002**	**116,125**

*significant differentiation (p<0.05)

τ = time in number of generation

θ_0= preexpansion population size ($\theta_0=2N_0\mu$)

θ_1= postexpansion population size ($\theta_1=2N_1\mu$)

SSD = sum of squared deviations

Rag = Harpending Raggedness index

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากผลการศึกษาพบว่าประชากรปลากระบอกในทะเลอันดามันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในประชากรมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในทุกประชากรมีแบบแผนความสัมพันธ์ของค่า haplotype diversity และ nucleotide diversity เหมือนกัน คือมีค่า haplotype diversity มากกว่า nucleotide diversity ในทุกจังหวัด ซึ่งพบได้ในประชากรที่กำลังมีการขยายขนาด

(Watterson,1984) โดยสาเหตุเกิดจากมีการกลายพันธุ์และมีการสะสมของแฮโพลไทป์แบบใหม่อย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับผลการคำนวณระยะเวลาในการขยายขนาดประชากร ที่พบว่าประชากรปลากระบอกในทะเลอันดามันเคยมีการขยายขนาดมาเมื่อประมาณ 110,000 ปีที่ผ่านมา โดยแบบแผนดังกล่าวพบได้ในสัตว์ทะเลหลายชนิดเช่น ปูม้า (Xu *et al*., 2009) ปลากระบอก (Liu *et al*., 2009), ปลาตะกรับ (Supmee, 2015) และหอยชักตีน (Suppapan and Supmee, 2016) เป็นต้น ผลการศึกษาพบว่าจากจำนวนแฮโพลไทป์ทั้งหมด 89 แฮโพลไทป์ เป็น rare haplotype จำนวน 74 แฮโพลไทป์ แสดงว่ามีจำนวนแฮโพลไทป์ที่มีความแตกต่างกันเป็นจำนวนมาก (Lewontin, 1974) บ่งบอกว่าปลากระบอกในชายฝั่งทะเลอันดามันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและมีปลากระบอกเพศเมียที่มีความสามารถในการขยายพันธุ์เป็นจำนวนมาก และยังพบว่ามี private allele ซึ่งเป็นแฮโพลไทป์ที่พบเฉพาะในแต่ละจังหวัดจำนวน 83 แฮโพลไทป์ โดยสามารถใช้ private allele ระบุแหล่งที่มาของสายพันธุ์หรือแหล่งทางพันธุกรรม (genetic stock) ได้ (Xu *et al*., 2009)

2. โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

ผลการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี AMOVA พบว่าปลากระบอกในทะเลอันดามันมีโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรแบ่งเป็นสองกลุ่มประชากร โดยแบ่งเป็นประชากรในทะเลอันดามันตอนล่าง ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดภูเก็ต และกลุ่มประชากรในทะเลอันดามันตอนบน ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดพังงา และจังหวัดระนอง และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมเป็นรายจังหวัดด้วยวิธี pairwise F_{ST} พบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างประชากรในกลุ่มจังหวัดทะเลอันดามันตอนล่างและกลุ่มจังหวัดทะเลอันดามันตอนบน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี AMOVA สาเหตุที่เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเป็นสองกลุ่มประชากร น่าจะเกิดจากรูปแบบการสืบพันธุ์ของปลากระบอกที่มีการผสมพันธุ์โดยการวางไข่ใกล้บริเวณชายฝั่งที่เป็นแหล่งที่อยู่เดิม และเมื่อตัวอ่อนเจริญเติบโตจะว่ายน้ำเข้ามาหากินและอาศัยในป่าชายเลนที่เคยอาศัยเพื่อทำการรวมฝูง (Lee, 1992) จึงทำให้มีการแพร่กระจายอยู่ในบริเวณที่จำกัด เมื่อประกอบกับระยะทางแนวของชายฝั่งที่เป็นป่าชายเลนซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่ของปลากระบอกในเขตทะเลอันดามันมีระยะทางยาวประมาณ 900 กิโลเมตร จึงน่าจะเป็นอีกปัจจัยในการขัดขวางการผสมพันธุ์และการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างประชากรทำให้มีการแบ่งแยกโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรเป็นสองกลุ่มประชากร การเกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมของปลากระบอกในการศึกษาครั้งนี้มีผลแบบเดียวกับการเกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมของปลากระบอก (*Mugil cephalus*) ระหว่างชายฝั่งทะเลตอนล่างและชายฝั่งทะเลตอนบนของประเทศจีน (Liu *et al*., 2009) เป็นการยืนยันว่าลักษณะการดำรงชีวิต พฤติกรรมการสืบพันธุ์ และระยะทางของแหล่งที่อยู่ของปลากระบอกน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้เกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปลากระบอกในทะเลอันดามัน

3. ประวัติประชากร

ผลการศึกษาประวัติประชากร พบว่าประชากรปลากระบอกในทะเลอันดามันเคยมีการขยายขนาดประชากรมาก่อน โดยสอดคล้องกับผลการทดสอบดังนี้ (1) การทดสอบ neutrality test ทั้งวิธี Tajima's *D* test และ Fu's *Fs* test พบว่ามีค่าติดลบซึ่งแสดงว่าประชากรมีการเบี่ยงเบนไปจากสมดุล (neutral state) ในส่วน

ของค่า Tajima's *D* ที่มีค่าติดลบ แสดงว่า ประชากรน่าจะมีการคัดเลือกโดยการคัดการกลายพันธุ์ที่ไม่เหมาะสมทิ้งไป (purifying selection) หรืออาจเกิดการขยายขนาดของประชากรมาก่อน (Yang, 2006) ส่วนค่า Fu's *Fs* ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการขยายขนาดของประชากรที่เหมาะสมกับเครื่องหมายพันธุกรรมที่เป็นนอนรีคอมบิเนชัน (non- recombination genetic data)(Ramirez-Soriano *et al*., 2008) มีค่าติดลบด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าประชากรปลากระบอกน่าจะเคยมีการขยายขนาดประชากรมาก่อน (2) การทดสอบ mismatch distribution พบว่าค่า Harpending Raggedness index ยอมรับการกระจายตัวแบบ unimodal และค่า *SSD* ยอมรับสมมติฐาน sudden expansion model (3) การประเมินขนาดของประชากรด้วยพารามิเตอร์ θ_1 พบว่ามีค่ามากกว่า θ_0 ในทุกกลุ่มประชากรแสดงว่าประชากรเคยมีการขยายขนาดจากขนาดเล็กสู่ขนาดใหญ่ (4) การคำนวณเวลาในการขยายขนาดประชากรพบว่าประชากรเคยมีการขยายขนาดมาประมาณ 110,000 ปีที่ผ่านมา โดยเมื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์ τ พบว่า จังหวัดกลุ่มอันดามันตอนล่างมีค่ามากกว่าจังหวัดกลุ่มอันดามันตอนบน (Table5) บ่งบอกว่าการขยายขนาดประชากรของปลากระบอกในกลุ่มอันดามันตอนล่างมีการขยายขนาดของประชากรมานานกว่ากลุ่มอันดามันตอนบน การขยายขนาดประชากรของปลากระบอกในทะเลอันดามันน่าจะมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงสภาพทางภูมิศาสตร์ในยุคไพลสโตซีน (Pleistocene) เมื่อประมาณ 275,000 - 11,500 ปีที่ผ่านมา โดยในช่วงเวลาดังกล่าวบริเวณคาบสมุทรอินโดจีนจะถูกปกคลุมไปด้วยน้ำทะเลเนื่องจากการละลายของน้ำแข็งจากขั้วโลก หลังจากนั้นระดับน้ำทะเลจะเริ่มลดระดับลงเรื่อยๆจนเข้าสู่ยุคโฮโลซีน (Holocene) ประมาณ 10,000 ปีที่ผ่านมา (Gradstein *et al*., 2004) แต่แผ่นดินยังคงมีระดับน้ำทะเลท่วมสูงและคงระดับไว้จนถึงยุคโฮโลซีนตอนกลาง และจะเริ่มลดระดับลงจนเข้าสู่ยุคโฮโลซีนตอนปลาย (Horton *et al*., 2005) หลังจากนั้นบริเวณชายฝั่งของทะเลอันดามันจะเริ่มมีการทับถมของตะกอนเกิดเป็นพื้นที่ชายฝั่งและเริ่มมีการขยายพื้นที่ของป่าชายเลน (Rhodes *et al*.,2011) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการขยายขนาดประชากรของปลากระบอกในฝั่งอันดามันน่าจะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของแหล่งที่อยู่ ซึ่งในช่วงระยะเวลาดังกล่าวนี้มีหลายรายงาน พบว่า มีการขยายขนาดของประชากรในสัตว์ทะเลอีกหลายชนิดและในหลายพื้นที่ เช่น ปลากระบอกในอ่าวไทย (Suppapan, 2015) และปูทะเล (mud crab) ในชายฝั่งของประเทศจีน (He *et al*., 2010) นอกจากนั้นยังพบว่าการขยายขนาดประชากรในครั้งนี้อยู่ในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกับการขยายขนาดประชากรของปูแสมก้ามขาวในเขตทะเลอันดามันด้วย (Supmee *et al*., 2012)

4. แนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากผลการศึกษาที่พบว่ามีโครงสร้างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรปลากระบอกในทะเลอันดามันตอนล่างและทะเลอันดามันตอนบน ดังนั้นแนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมควรมีการจัดการโดยแยกเป็นเป็นสองกลุ่มประชากรตามโครงสร้างทางพันธุกรรม เช่น การปล่อยพันธุ์ปลาสู่แหล่งน้ำธรรมชาติควรใช้พ่อแม่พันธุ์จากหลายพื้นที่ในกลุ่มประชากรที่มีโครงสร้างทางพันธุกรรมเดียวกันปล่อยลงสู่แหล่งน้ำเพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม และควรมีการจัดการด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม เช่น การรักษาถิ่นที่อยู่ตามธรรมชาติ โดยการไม่ทำลายแหล่งที่อยู่หรือการเพิ่มขนาดของแหล่งที่อยู่ เช่น การเพิ่มพื้นที่ป่าชายเลนเพื่อรองรับการขยายขนาดประชากรและไม่ควรจับปลาตัวเมียที่กำลังวางไข่ เนื่องจากเป็นการขัดขวางการเพิ่ม

จำนวนประชากร สำหรับการเพาะเลี้ยงหรือการปรับปรุงสายพันธุ์ปลากระบอก ควรสร้างประชากรพ่อแม่พันธุ์ให้มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับในธรรมชาติโดยอาจมีการผสมระหว่างประชากรหรือนำประชากรจากธรรมชาติเข้ามาผสมเพื่อให้ได้ประชากรพ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพทางพันธุกรรมที่สมบูรณ์และมีศักยภาพที่ยั่งยืนในการเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ดี อย่างไรก็ตามในการพิจารณาแนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมควรมีการใช้ข้อมูลจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอื่น เช่น เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งมีอัตราการกลายพันธุ์สูง ในการพิจารณาหาแนวทางในการจัดการปลากระบอกในทะเลอันดามันควบคู่กันไปด้วย

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรปลากระบอกในทะเลอันดามัน โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณคอนโทรลรีเจียนขนาด 596 – 606 คู่เบส พบว่า มีการแบ่งโครงสร้างทางพันธุกรรมเป็นสองกลุ่มประชากร ได้แก่ กลุ่มประชากรในทะเลอันดามันตอนล่าง ประกอบด้วยประชากรปลากระบอกจากจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดภูเก็ต และกลุ่มประชากรในทะเลอันดามันตอนบน ประกอบด้วยประชากรปลากระบอกจากจังหวัดพังงา และจังหวัดระนอง เมื่อวิเคราะห์ประวัติประชากร พบว่าปลากระบอกในทะเลอันดามันเคยมีการขยายขนาดมาประมาณ 110,000 ปีที่ผ่านมา และพบว่าประชากรปลากระบอกจากกลุ่มอันดามันตอนล่างมีการขยายขนาดมานานกว่ากลุ่มอันดามันตอนบน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

เอกสารอ้างอิง

Aungtonya, C., Thaipal, S. and Tendal, O. 2000. A preliminary report on the Thai-Danish Bioshelf surveys (1996-2000) of the west coast of Thailand, Andaman Sea. Phuket, Mar. Biol. Cent. Res. Bull. 63 : 53-76.

Avise, J.C., Neigel, J. E. and Arnold, J. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. J. Mo. Evol. 20: 99-105.

Boore, J.L. 1999. Survey and summary animal mitochondria genome. Nucleic Acids Res. 27(8): 1767-1780.

Chang, C.W., and Tzeng, W.N. 2000. Species composition and seasonal occurrence of mullets (Pisces, Mugilidae) in the Tanshui Estuary northwest Taiwan. J. Fish Soc. Taiwan. 27: 253–262.

Chang, C.W., Iizuka, Y. and Tzeng, W.N. 2004. Migratory environmental history of the grey Mullet *Mugil cephalus* as revealed by otolith Sr : Ca ratios. Mar. Ecol. Prog. 269: 277–288.

Excoffier, L. and Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol. Ecol. Res. 10: 564-567.

Fishery Statistics Analysis and Research Group. 2010. Fisheries Statistics of Thailand 2010, No. 12 / 2012. Department of Fisheries. Ministry of Agriculture and Cooperatives. 91p. [in Thai]

Fu, F.X.1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics.147: 915–925.

Gradstein, F.M., Ogg, J. G. and Smith, A. G. 2004. A geologic time scale. Cambridge Univ. Press, New York, 589 p.

Harpending, R.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Hum. Biol. 66: 591-600.

He, L., Zhang, A., Weese, D., Zhu, C., Jiang, C. and Qiao, Z. 2010. Late Pleistocene population expansion of *Scylla paramamosain* along the coast of China: a population dynamic response to the Last Interglacial sea level highstand. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 385: 20-28.

Henriques, R., Potts, W. M., Santos, C. V., Sauer,W. H. H. and Shaw, P. W. 2014. Population connectivity and phylogeography of a coastal fish, *Atractoscion aequidens* (Sciaenidae), across the Benguela current region: Evidence of an ancient vicariant event. PLOS ONE, 9 (2) : 1-11.

Horton, B.P., Gibbard, P. L., Milne, G.M ., Morley, R.J., Purintavaragul, C . and Stargardt, J.M. 2005. Holocene sea levels and palaeoenvironments, Malay- Thai Peninsula, Southeast Asia. Holocene.15 : 1199-1213.

Huang, X. and Madan, A. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program, Genome Res. 9: 868 – 877.

Juntarashote, K. 2003. Country report for BOBLME programme: Bangkok, Thailand: national workshop, 29-30 October 2003, Bangkok, Kasetsart Univ.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R. , Thompson, J.D. , Gibson, T.J. and Higgins, D.G. 2007. Sequence analysis Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics Applications Note. 23 (21): 2947-2948.

Lee, S.C. 1992. Fish fauna and abundance of some dominant species in the estuary of Tanshui, northwestern Taiwan. J. Fish Soc. Taiwan. 19: 263–271.

Lewontin, R.C. 1974. The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press, New York, 24 p.

Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 25: 1451-1452.

Liu, J., Brown, C. L. and Yang, T. 2009. Population genetic structure and historical demography of grey mullet, *Mugil cephalus*, along the coast of China, inferred by analysis of the mitochondrial control region. Biochem. Syst. Ecol. 37: 556–566.

Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, 512 p.

Ramirez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S. E. , Rozas, J., Calafell, F. and Navarro, A. 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. Genetics.179: 555-567.

Rhodes, B.P., Kirby, M.E., Jankaew, K .and Choowong, M. 2011. Evidence for a mid-Holocene tsunami deposit along the Andaman coast of Thailand preserved in a mangrove environment. Mar. Geol. 282 : 255-267.

Supmee, V. 2015. Population genetic structure and demographic history of Spotted scat (*Scatophagus argus*) in Southern of Thailand. Phranakhon Rajabhat Research Journal. 10(2): 38-56. [in Thai]

Supmee, V., Ngernsiri, L., Sriboonlert, A., Wonnapinij , P. and Sangthong, P. 2012. Population genetic analysis of Violet vinegar crab (Episesarma versicolor) along the Andaman sea coast of Thailand. Zool. Stud. 51(7): 1040-1050.

Suppapan, J. 2015. Population genetic structure of Greenback Mullet (*Liza subviridis*) in Gulf of Thailand coast : Implication for conservation. Phranakhon Rajabhat Research Journal. 10 (1) : 118-130. [in Thai]

Suppapan, J. and Supmee, V. 2016. Population genetic structure of Wing Shell (*Strombus canarium*) along the Andaman Sea coast. Burapha Science Journal. 21(3): 138 – 150. [in Thai]

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA Polymorphism. Genetics.123 : 585–595.

Watterson, G.A. 1984. Allele frequencies after a bottleneck. Theor. Populat. Biol. 26: 387-407. Xu, Q., Liu, R. and Liu, Y. 2009. Genetic population structure of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the East China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 371 : 121-129.

Yang, Z. 2006. Computational molecular evolution, Oxford Univ. Press, New York, 376 p.