Thai J. Genet. 2012, 5(2) : 166-182

การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในประชากรปลากะพงขาวจากแหล่งเพาะพันธุ์

Microsatellite-based analysis of genetic variation in hatchery populations of Asian seabass, *Lates calcarifer* (BLOCH, 1790)

พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข[1]* สุภาพ ไพรพนาพงศ์[2] นิพนธ์ เสนอินทร์[3] ศรีรัตน์ สอดศุข[1] และพลชาติ ผิวเณร[1]

Panom K. Sodsuk[1]*, Supap Praipanapong[2], Nipon Sain-in[3], Srirat Sodsuk[1] and Ponlachart Pewnain[1]

[1]*สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ ปทุมธานี 12120*

[2]*ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งพังงา พังงา 82120*

[3]*ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งเพชรบุรี เพชรบุรี 76100*

[1]*Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute, Pathum Thani 12120, Thailand*

[2]*Phangnga Coastal Fisheries Research and Development Center, Phangnga 82120, Thailand*

[3]*Phetchaburi Coastal Fisheries Research and Development Center, Phetchaburi 76100, Thailand*

**Corresponding author: panomks@yahoo.com*

บทคัดย่อ

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรปลากะพงขาวจากแหล่งเพาะพันธุ์ 5 ประชากร คือ ประชากรพ่อแม่พันธุ์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่ ตรัง นครศรีธรรมราช ระยอง และประชากรลูกพันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 12 ตำแหน่งพบความหลากหลายของแอลลีลสูงสุด 13 แอลลีล ที่ตำแหน่ง LcaM27F (AF404089) และพบ monomorphism ที่ตำแหน่ง LcaM06 (AF404075) ข้อมูลความผันแปรทางพันธุกรรม ซึ่งประกอบด้วยค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่งของ averaged number of alleles (N_a), effective number of alleles (A_e), allelic richness (R) และเฮเทอโรไซโกซิตีในรูปค่าสังเกต (H_o) และค่าคาดคะเน (H_e) มีค่า N_a = 4.0000–4.5000, A_e = 2.5567–3.0091, R=3.4510–3.8841, H_o = 0.5627–0.6278 และ H_e = 0.5391–0.6092 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์รวมทุกตำแหน่งระบุว่า ประชากร

ระยองและประชากรลูกพันธุ์ มีการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (P_{HWE}>0.05) ปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้ อยู่ในระดับเดียวกันทั้ง 5 ประชากร และอยู่ในระดับต่ำกว่าที่เคยมีการศึกษาในปลากะพงขาวของไทย ทั้งในประชากรธรรมชาติ และประชากรเพาะเลี้ยง การวิเคราะห์โครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากรระบุว่า ทั้ง 5 ประชากรมีพันธุกรรมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรภายในกลุ่มเดียว จากการวิเคราะห์ความแตกต่างในทุกคู่ประชากร ผนวกกับข้อมูลพันธุ์ประวัติของแต่ละประชากร ทำให้ทราบความแตกต่างระหว่างประชากรโดยละเอียด และเข้าใจถึงสาเหตุที่ประชากรมีการเปลี่ยนแปลงในองค์ประกอบทางพันธุกรรม จากผลการศึกษาที่ระบุว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรปลากะพงขาวจากแหล่งเพาะพันธุ์ 5 ประชากร มีปริมาณต่ำกว่าในประชากรธรรมชาติ จึงสมควรสร้างประชากรพ่อแม่พันธุ์ เพื่อยกระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมให้สูงขึ้น และมีคุณภาพทางพันธุกรรมที่สมบูรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงในประเทศไทย

ABSTRACT

Genetic variation based on microsatellite markers was comparatively analysed among 5 hatchery populations of Asian seabass, *Lates calcarifer* (BLOCH, 1790). Four populations were from the broodstocks of Krabi, Trang, Nakhon Si Thammarat and Rayong Coastal Fisheries Research and Development Center, and one population is the progeny. From the 12 microsatellite loci screened, LcaM27F (AF404089) was found to be the most polymorphic locus with 13 variant alleles, whereas LcaM06 (AF404075) was found to be the only monomorphic. Genetic variabilities per locus including averages number of alleles (N_a), effective number of alleles (A_e), allelic richness (R), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygousity (H_e) were N_a = 4.0000–4.5000, A_e = 2.5567–3.0091, R = 3.4510–3.8841, H_o = 0.5627–0.6278 and H_e = 0.5391–0.6092, respectively. When all loci were analysed, the population from Rayong and the progeny were found to deviate from Hardy-Weinberg equilibrium (P_{HWE}>0.05). However, the levels of genetic variation observed in all 5 populations were similar, and were lower than the level of wild and hatchery populations in Thailand reported by previous studies. Analyses of genetic structure and differences among populations showed that the 5 populations can be genetically classified as a single group, with genetic differences between populations within the group. Results from the analyses of each pair of populations together with each populations' pedigree revealed differences of the populations in details and reasons leading to their changes in their genetic composition. Due to low genetic diversity level in the 5 hatchery populations of Asian seabass compared to that of wild populations, a recommendation is that founding populations of Asian seabass broodstock should have higher

level of genetic diversity to obtain good quality and high potential broodstock for Thai aquaculture.

คำสำคัญ: ปลากะพงขาว, *Lates calcarifer*, ความแปรปรวนทางพันธุกรรม, ไมโครแซทเทลไลท์
Keywords: Asian seabass, *Lates calcarifer*, genetic variation, microsatellite

บทนำ

ปลากะพงขาว หรือ Asian seabass มีชื่อระบุตาม FAO ว่า Barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) (Rainboth, 1996; Larson, 1999) เป็นปลาขนาดใหญ่ ที่จัดว่ามีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของไทย เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อมีรสชาติดี สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม จึงเป็นที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในเขตจังหวัดชายทะเลของประเทศ ปัจจุบันประเทศไทยมีความสามารถในการเพาะพันธุ์ปลากะพงขาว เพื่อเลี้ยงในประเทศและส่งขายยังต่างประเทศได้เป็นจำนวนมาก จากสถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2552 (ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2554) ระบุว่า ปริมาณผลผลิตปลากะพงในปี 2552 ทั้งหมดมีประมาณ 14,900 ตัน มีมูลค่า 1,708.3 ล้านบาท ซึ่งในจำนวนนี้อาจกล่าวได้ว่า เกือบทั้งหมดเป็นผลผลิตจากการเพาะเลี้ยง เพราะในปริมาณและมูลค่าดังกล่าว มาจากผลผลิตที่เป็นการจับจากทะเลเพียง 78 ตัน เท่านั้น

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้น เป็นที่ทราบดีว่าการให้ความสนใจดูแลในเรื่องของการบริหารจัดการพ่อแม่พันธุ์ (broodstock management) และการดำรงรักษาพันธุ์ตามหลักวิชาการทางพันธุศาสตร์เป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งต้องใช้ทั้งพื้นที่และค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานสูง ประกอบกับปลากะพงขาวมีพฤติกรรมในการเปลี่ยนเพศจากเพศผู้เป็นเพศเมีย จึงเพิ่มความยุ่งยากในการดูแลเก็บรักษาและจัดการพ่อแม่พันธุ์มากยิ่งขึ้นไปอีก แต่ด้วยเหตุที่ปลากะพงขาว ยังสามารถขายได้ราคาดีและเป็นที่ต้องการของตลาด จึงทำให้ผู้ผลิตลูกพันธุ์ปลากะพงขาวส่วนใหญ่ สนใจแต่เพียงการผลิตลูกปลาให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้เลี้ยง โดยมิได้คำนึงถึงเรื่องพันธุกรรมของประชากร หรือสายพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ หรือการบริหารจัดการพ่อแม่พันธุ์ และการดำรงรักษาพันธุ์ตามหลักพันธุศาสตร์ที่ดี ทั้งที่การดำเนินงานดังกล่าวเป็นปัจจัยที่สำคัญยิ่งต่อความยั่งยืนของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทุกชนิด

การดำเนินงานเพื่อการบริหารจัดการด้านพันธุกรรม ของประชากรพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสมและถูกต้อง สมควรเริ่มต้นด้วยการประเมินคุณภาพหรือศักยภาพทางพันธุกรรม ของประชากรหรือสายพันธุ์จากข้อมูลที่ระบุความหลากหลาย หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม เพราะความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมคือแหล่งทรัพยากรพันธุกรรมพื้นฐาน ที่เป็นปัจจัยสำคัญยิ่งต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ เป็นที่ทราบดีว่าภายใต้กิจกรรมการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำนั้น องค์ประกอบทางพันธุกรรมของประชากรจะเปลี่ยนไป เมื่อการเพาะพันธุ์มีการคัดเลือก (selective breeding) เข้าไปเกี่ยวข้อง โดยจะมีปริมาณลดลงทุกครั้งที่มีการเพาะพันธุ์แต่ละรุ่น (Allendorf and Ryman, 1987) ดังนั้นปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรม หรือทรัพยากรพันธุกรรมพื้นฐานที่สำคัญยิ่งนี้ สามารถลดลงและสูญเสียไปได้ตลอดเวลา ถ้าไม่มีการบริหารจัดการที่ถูกต้องและเหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลากะพงขาว ซึ่งเป็นปลาที่มีความดกไข่

สูงและใช้วิธีผสมพันธุ์หมู่ (mass spawning) ในการเพาะพันธุ์ จึงเป็นไปได้สูงที่องค์ประกอบทางพันธุกรรมจะเสื่อมโทรมลงในปลารุ่นถัดไป ถ้าไม่มีการจัดการพ่อแม่พันธุ์และการผสมพันธุ์ที่เหมาะสมหรือดีพอ จากรายงานของ Lewis *et al*. (2006) ระบุว่า ประชากรปลากะพงขาวจากโรงเพาะฟัก 2 แห่งในประเทศออสเตรเลียซึ่งมีค่า effective population size ต่ำ มีพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่ที่ถ่ายทอดสู่รุ่นลูกในสัดส่วนที่แตกต่างกัน รวมถึงอัตรารอดของลูกปลา และการคัดขนาดลูกปลาสำหรับเลี้ยงเป็นพ่อแม่พันธุ์ในรุ่นถัดไป ล้วนมีผลทำให้ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรลดลงทั้งสิ้น

การประเมินศักยภาพทางพันธุกรรมของประชากร จากข้อมูลที่ระบุปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรม สามารถศึกษาวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite genetic marker) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาและรายงานไพรเมอร์สำหรับการศึกษาวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ในปลากะพงขาวไว้มากกว่า 80 คู่ไพรเมอร์ (Yue *et al*., 2002; Zhu *et al*., 2006) ซึ่งสามารถใช้วิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์ ที่มีความหลากรูปแบบทางพันธุกรรม (genotypic polymorphism) ในปลากะพงขาวได้เป็นอย่างดี และทำให้ทราบถึงข้อมูลความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม ที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการบริหารจัดการสายพันธุ์ การคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในประชากรธรรมชาติ (Norris *et al*., 1999; Kim *et al*., 2004; Lui and Cordes, 2004)

ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงสมควรวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในประชากรปลากะพงขาวจากแหล่งเพาะพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถระบุคุณภาพ หรือศักยภาพของประชากรหรือสายพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ ในการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์ รวมทั้งการบริหารจัดการพ่อแม่พันธุ์ และการดำรงรักษาพันธุ์ที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา การเก็บตัวอย่าง และสกัดดีเอ็นเอ

การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างปลากะพงขาวจาก 5 ประชากร (Table 1) ตัวอย่าง 3 ประชากรเป็นปลาจากประชากรพ่อแม่พันธุ์ ของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่ ตรัง และนครศรีธรรมราช ปลาเหล่านี้เลี้ยงรวมกันอยู่ที่ศูนย์ฯ กระบี่ โดยปลาแต่ละตัวติดเครื่องหมาย PIT Tag ตัวอย่างจากประชากรพ่อแม่พันธุ์อีก 1 ประชากรเป็นพ่อแม่พันธุ์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง ซึ่งเลี้ยงอยู่ที่ศูนย์ฯ ระยอง สุดท้ายได้แก่ตัวอย่างจากประชากรลูกพันธุ์ที่ผลิตโดยศูนย์ฯ กระบี่

เก็บตัวอย่างเลือดและครีบจากปลากะพงขาว 5 ประชากร (Table 1) แยกใส่ในหลอด (microtube) 1 หลอด/ตัวอย่าง ไม่ให้ปะปนกัน เติม heparin ลงไปในหลอดตัวอย่างเลือดเพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว และเริ่มขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยทันทีเมื่อเดินทางถึงห้องปฏิบัติการ ส่วนตัวอย่างครีบเก็บในหลอดที่มี 95% ethanol บรรจุอยู่ โดยเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด และครีบโดยประยุกต์จากวิธีการของ Boom *et al*. (1990), Höss and Pääbo (1993), Höss (1994) และ Kemp *et al*. (2006) โดยใช้ฟีนอลคลอโรฟอร์มและใช้ silica ร่วมกับ extraction buffer ในการสกัด นำ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปผ่านขั้นตอนการตรวจสอบ และคณะ (2552) ได้รายงานไว้
คุณภาพ และวัดปริมาณดีเอ็นเอ ตามวิธีการที่ พนม

Table 1 Information of each stock, sources and sample size.

Sample/stock	Stock/population information	Source/station	Sample size
Krabi Coastal Fisheries Research and Development Center	The Krabi broodstock was produced for few generations from fish originally from the wild area of Satun province. The original wild fish were collected and reared in cage by Satun local people.	Krabi Coastal Fisheries Research and Development Center	30
Trang Coastal Fisheries Research and Development Center	The Trang broodstock was produced for many generations from fish with unclear original. There might be an introduction of some fish into the stock from Nakhon Si Thammarat and Satun Coastal Fisheries Research and Development Centers. Some original and introduced fish might have been collected from the wild.	Krabi Coastal Fisheries Research and Development Center	16
Nakhon Si Thammarat Coastal Fisheries Research and Development Center	The Nakhon Si Thammarat broodstock was produced for many generations from fish collected both from the wild and private cage-culture. Introduction of some fish from the East Coast was likely possible.	Krabi Coastal Fisheries Research and Development Center	11
Rayong Coastal Fisheries Research and Development Center	The Rayong broodstock was produced for 6-7 generations from fish collected both from the wild and private cage-culture in the East Coast area. There was an introduction of some fish from the Nakhon Si Thammarat Center into the stock	Rayong Coastal Fisheries Research and Development Center	45
The progeny produced by Krabi Coastal Fisheries Research and Development Center	These progeny were produced from the Krabi, Trang and Nakhon Si Thammarat broodstocks by mass spawning	Krabi Coastal Fisheries Research and Development Center	55

การวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอ

วิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ตามที่ระบุใน Table 2 เพื่อวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 12 ตำแหน่ง โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (10 µl) ประกอบด้วย ดีเอ็นเอเริ่มต้น 10 ng, ไพรเมอร์อย่างละ 0.5 µM, 1x PCR buffer (Promega), 1.5-2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.2U *Taq* DNA polymerase (Promega) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบที่ 1 ที่ 94 °C 3 นาที รอบที่ 2-35 ที่ 94 °C 30 วินาที, ที่อุณหภูมิตาม Table 2 30 วินาที และที่ 72 °C 1 นาที และรอบสุดท้ายที่ 72 °C 5 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis บน denaturing polyacrylamide gel 6% ใน TBE buffer ที่ระดับกระแสไฟฟ้า 70 วัตต์ 1 ชั่วโมง และที่ 40 วัตต์ต่ออีก 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลมาย้อมด้วย silver nitrate และอ่านผลโดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน M13 sequence ladder

Table 2 Twelve microsatellite loci and their primers for the Asian seabass analyses used in this study.

Locus	GenBank accession no.	References	Annealing temp. (°C)	Allelic size (bp)
LcaM06	AF404075	Yue *et al*. (2002)	57	160
LcaM08F	AF404076	Yue *et al*. (2002)	65	256-262
LcaM16F	AF404080	Yue *et al*. (2002)	63	246-288
LcaM18F	AF404081	Yue *et al*. (2002)	65	149-155
LcaM20F	AF404082	Yue *et al*. (2002)	60	120-130
LcaM24F	AF404086	Yue et al. (2002)	57	275-285
LcaM27F	AF404089	Yue *et al*. (2002)	65	211-329
LcaM40F	AF404099	Yue *et al*. (2002)	65	123-139
Lca58	AY998850	Zhu *et al*. (2006)	68	398-432
Lca64	AY998856	Zhu *et al*. (2006)	60	272-290
Lca69	AY998859	Zhu *et al*. (2006)	60	346-354
Lca70	AY998860	Zhu *et al*. (2006)	68	297-306

การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลพันธุกรรมที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความหลากหลาย หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในรูปของค่าความผันแปรทางพันธุกรรมต่างๆ ได้แก่ ค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (per locus average) ของแอลลีลที่ประกอบด้วย averaged number of alleles (N_a), effective number of alleles (A_e) และ allelic richness (R) และรวมถึงค่าเฮเทอโรไซโกซิตี ทั้งค่าสังเกต (observed heterozygosity, H_o) และค่าคาดคะเน (expected heterozygosity, H_e) และทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) ในแต่

ละประชากร โดยการวิเคราะห์ ณ แต่ละตำแหน่งที่มีความหลากรูปแบบทางพันธุกรรม (polymorphic locus) ด้วยวิธี likelihood ratio test (Yeh *et al*., 1999) และวิเคราะห์รวมทุกตำแหน่งที่สำรวจด้วยวิธี Chi-square test (Smouse *et al*., 1983) ตรวจวิเคราะห์ null allele ในทุกตำแหน่งของทุกประชากร โดยจะปรับจีโนไทป์และทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กใหม่ ณ ตำแหน่งและประชากรที่ตรวจพบ null allele คำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของ Nei (1978) พร้อมทั้งวิเคราะห์โครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (dendrogram) ด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม FSTAT version 1.2 (Goudet, 1995) และ POPGENE version 1.31 (Yeh *et al*., 1999) ยกเว้นการวิเคราะห์ null allele และปรับจีโนไทป์ใช้โปรแกรม Micro-Checker version 2.2.3 (Van Oosterhout *et al*., 2004)

วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยวิธี analysis of molecular variance (AMOVA) โดยระบุกลุ่มประชากรตามที่ปรากฏในโครงสร้างความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์ได้ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างให้ครอบคลุมทุกระดับที่ปรากฏในโครงสร้าง โดยตรวจสอบจากค่า F-statistics (inbreeding coefficients หรือ fixation indexes) ซึ่งคำนวณจากค่า variance components แล้วทดสอบโดยการวิเคราะห์ค่า *P* ในทุกระดับ และทุกคู่ประชากร ของการตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญของค่า *P* ที่ 0.02 (Fu, 1997; Alonso and Armour, 2001; Excoffier *et al*., 2006; Holsinger, 2012) การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างคู่ประชากรทุกคู่ ใช้การวิเคราะห์ค่า *P* ของ F_{st} ระหว่างคู่ประชากร (P_{Fst}) และวิธี exact test (P_{exact}) ภายใต้ระดับนัยสำคัญของค่า *P* ที่ได้รับการปรับโดยใช้ Bonferroni correction เพื่อความถูกต้องสำหรับการทดสอบแบบ multiple tests (Rice, 1989) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Arlequin version 3.1 (Excoffier *et al*., 2006)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ข้อมูลความความแปรปรวนทางพันธุกรรม และผลการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิคเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ที่จำนวน 12 ตำแหน่ง ในประชากรปลากะพงขาวจากแหล่งเพาะพันธุ์ 5 ประชากร (กระบี่ ตรัง นครศรีธรรมราช ระยอง และลูกพันธุ์) พบ 1 ตำแหน่ง (LcaM06) ที่ไม่มีความหลากหลาย (monomorphism) คือปรากฏเพียง 1 แอลลีล (Table 3) และเป็นแอลลีลเดียวกันที่แสดงรูปแบบพันธุกรรมโฮโมไซกัสเหมือนกันหมดในทุกประชากร พบความหลากหลายของยีนแอลลีลสูงสุด 13 แอลลีล ที่ตำแหน่ง LcaM27F ข้อมูลความแปรปรวนทางพันธุกรรมของทั้ง 5 ประชากร มีค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่งต่อประชากร คือ N_a = 4.0000–4.5000, A_e = 2.5567–3.0091, R = 3.4510–3.8841, H_o = 0.5627–0.6278 และ H_e = 0.5391–0.6092 ตามลำดับ (Table 3)

ผลการวิเคราะห์ null allele ในทุกตำแหน่งของทุกประชากรระบุว่า ที่ตำแหน่ง LcaM27F และ Lca58 ของประชากรกระบี่มี null allele เกิดขึ้น แต่หลังจากปรับจีโนไทป์ และคำนวณค่าเฮเทอโรไซโกซิตี พร้อมทั้งทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กใหม่ ไม่ทำให้ผลการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (แสดงโดยค่า P_{HWE}) ของประชากรเปลี่ยนไป (Table 3)

Table 3 Genetic variabilities (N_a, A_e, R, H_o and H_e) and the P_{HWE} values showing results of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) tests at each of the 12 microsatellite loci of 5 populations of Asian seabass (broodstocks of Krabi, Trang, Nakhon Si Thammarat, and Rayong and the progeny stock).

Locus	Genetic variabilities	Krabi	Trang	Nakhon Si Thammarat	Rayong	Progeny
LcaM06	N_a	1	1	1	1	1
	A_e	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	R	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	H_o	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	H_e	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	P_{HWE}	-	-	-	-	-
LcaM08F	N_a	3	2	3	3	2
	A_e	1.8565	1.9321	1.9675	1.7536	1.3931
	R	2.7820	2.0000	2.8180	2.8360	1.9760
	H_o	0.5172	0.4375	0.4545	0.4091*	0.3400
	H_e	0.4694	0.4980	0.5152	0.4347	0.2851
	P_{HWE}	0.9152	0.6149	0.5324	0.0016*	0.1617
LcaM16F	N_a	7	4	6	7	6
	A_e	3.3439	3.7926	3.6667	4.3493	3.0470
	R	5.0560	3.9900	5.7840	5.3580	4.6270
	H_o	0.8276	0.8750	1.0000	0.9024	0.9815*
	H_e	0.7132	0.7601	0.7619	0.7796	0.6781*
	P_{HWE}	0.8085	0.4308	0.4091	0.3158	0.0000*
LcaM18F	N_a	4	3	3	3	3
	A_e	1.7062	1.9310	1.5152	1.6582	1.5235
	R	2.8090	2.6430	2.9890	2.3650	2.7150
	H_o	0.5333	0.7143	0.4000	0.4773	0.3704
	H_e	0.4209	0.5000	0.3579	0.4015	0.3468
	P_{HWE}	0.7201	0.2812	0.9297	0.5041	0.6134
LcaM20F	N_a	3	4	4	4	4
	A_e	2.5655	2.4348	3.1765	2.1138	2.4546
	R	2.9910	3.5240	4.0000	3.2940	3.1610
	H_o	0.6538	0.5714	0.6667	0.5952	0.7000
	H_e	0.6222	0.6111	0.7255	0.5333	0.5986
	P_{HWE}	0.1047	0.9420	0.1775	0.1903	0.2141

Table 3 (Continued).

Locus	Genetic variabilities	Krabi	Trang	Nakhon Si Thammarat	Rayong	Progeny
LcaM27F	N_a	8	8	8	11	11
	A_e	5.5410	7.1111	6.9143	4.3118	4.2847
	R	6.7840	7.5520	7.7560	7.0100	7.0800
	H_o	0.6154* *0.7308**	0.7500	0.9091	0.8409	0.8545
	H_e	0.8356 *0.8620*	0.8871	0.8961	0.7769	0.7736
	P_{HWE}	0.0010* *0.0153**	0.0592	0.3122	0.7894	0.4418
LcaM40F	N_a	4	6	5	6	4
	A_e	2.1925	3.2667	3.5217	3.6441	3.0750
	R	3.5060	5.1300	5.0000	4.6710	3.8820
	H_o	0.6667	0.5714	0.8889	0.8438	0.7358
	H_e	0.5542	0.7196	0.7582	0.7371	0.6812
	P_{HWE}	0.4793	0.5023	0.5119	0.2703	0.4409
Lca58	N_a	6	6	6	5	6
	A_e	3.7545	3.9690	4.0333	2.9082	3.6765
	R	4.6210	5.3020	5.6310	4.1900	4.9600
	H_o	0.5517 *0.7586*	0.6875	0.7273	0.8205	0.7800*
	H_e	0.7465 *0.7937*	0.7722	0.7879	0.6647	0.7354
	P_{HWE}	0.0682 *0.1920*	0.5279	0.1719	0.2914	0.0009*
Lca64	N_a	4	4	3	4	3
	A_e	2.5601	2.8132	1.9675	2.5912	1.9570
	R	3.4660	3.5530	2.8180	3.6080	2.3070
	H_o	0.6552	0.6875	0.3636	0.6000	0.5926
	H_e	0.6201	0.6653	0.5152	0.6210	0.4936
	P_{HWE}	0.9676	0.8862	0.5324	0.2314	0.3124
Lca69	N_a	3	4	2	4	4
	Ay	2.2400	2.4381	1.9360	2.3226	2.9555
	R	2.7990	3.4890	2.0000	3.5840	3.7620
	H_o	0.7500	0.5000	0.4545	0.4762	0.8000
	H_e	0.5636	0.6089	0.5065	0.5763	0.6677
	P_{HWE}	0.1757	0.8550	0.7203	0.4704	0.2252

Table 3 (Continued).

Locus	Genetic variabilities	Krabi	Trang	Nakhon Si Thammarat	Rayong	Progeny
Lca70	N_a	4	4	4	4	4
	A_e	3.1173	3.1034	3.3333	3.9320	3.3155
	R	3.6910	3.6000	3.9950	3.9840	3.9420
	H_o	0.7143	0.8667	0.8000	0.8667	0.8148
	H_e	0.6916	0.7011	0.7368	0.7541	0.7049
	P_{HWE}	0.5264	0.3948	0.8967	0.2935	0.4673
Per locus average	N_a	4.1667	4.0833	4.0000	4.5000	4.1667
	A_e	2.6223	3.0091	2.9250	2.7090	2.5567
	R	3.5009	3.7258	3.8841	3.6583	3.4510
	H_o	0.5627 *0.5895*	0.6228	0.6084	0.6212*	0.6278*
	H_e	0.5512 *0.5574*	0.6092	0.5919	0.5637	0.5391
	P_{HWE}	0.2859 *0.5395*	0.7474	0.0798	0.0019*	0.0000*

Sample size of each population as shown in Table 1

P_{HWE}<0.05: H_o and H_e are significantly different under Hardy-Weinberg equilibrium (*)

New values of H_o, H_e and P_{HWE} adjusted due to null alleles detected are shown in '*italic*' (LcaM27F, Lca58 and per locus average of Krabi).

ผลการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (P_{HWE}) ที่แต่ละตำแหน่ง ที่มีความหลากรูปแบบทางพันธุกรรม (11 ตำแหน่ง) ในแต่ละประชากร (Table 3) พบว่า มีนัยสำคัญในการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (P_{HWE}<0.05) ที่ตำแหน่ง LcaM27F ในประชากรกระบี่ LcaM08F ในประชากรระยอง และ LcaM16F กับ Lca58 ในประชากรลูกพันธุ์ แต่เมื่อวิเคราะห์รวมทุกตำแหน่งของแต่ละประชากร พบการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (P_{HWE}<0.05) ในประชากรระยอง และลูกพันธุ์ ซึ่งเป็นการเบี่ยงเบนในแบบที่มีเฮเทอโรไซโกตมากกว่าที่ควรจะเป็น (heterozygote excess, H_o>H_e) การเบี่ยงเบนในลักษณะนี้มักมีสาเหตุจากการปะปนระหว่างต่างประชากร (Allendorf and Ryman, 1987) โดยเฉพาะประชากรโรงเพาะฟัก (พนม และคณะ, 2553; Chareontawee *et al*., 2007) ซึ่งมักจะมีการนำเข้าหรือขนย้ายแลกเปลี่ยนประชากรระหว่างต่างโรงเพาะฟักอยู่ตลอดเวลา และเมื่อพิจารณาจากพันธุ์ประวัติของประชากรระยอง และประชากรลูกพันธุ์ (Table 1) ก็ปรากฏว่ามีความสอดคล้องและเป็นไปได้อย่างยิ่งที่ 2 ประชากรนี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบพันธุกรรมในลักษณะดังกล่าว

ปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จัดว่าอยู่ในระดับเดียวกันทั้ง 5 ประชากร และเมื่อเทียบเคียงกับข้อมูล (ค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่งต่อประชากร) ที่ได้จากการศึกษาในประชากรปลากะพงขาวของไทยก่อนหน้านี้ (ฟารีดะ และคณะ, 2551; Yue *et al*., 2009; Sonkaew *et al*., 2011; Wansuk Senanan,

unpublished data) ปรากฏว่ามีทั้งที่อยู่ในระดับเดียวกัน (N_a = 4.00, H_e = 0.65; ฟารีดะ และคณะ, 2551) และต่ำกว่าที่เคยมีการศึกษาไว้ ทั้งในประชากรธรรมชาติ [N_a = 10.71, R = 8.50, H_o = 0.73, H_e = 0.78 (Yue *et al*., 2009); N_a = 7.90, R = 7.21, H_o = 0.75, H_e = 0.72 (Sonkaew*et al*., 2011)] และประชากรโรงเพาะฟัก (N_a = 9.73, R = 9.17, H_o = 0.79, H_e = 0.76; Wansuk Senanan, unpublished data) เมื่อพิจารณาจากข้อมูลพันธุ์ประวัติในภาพรวมของประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (Table 1) และจากการสอบถามข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการเพาะพันธุ์จากเจ้าหน้าที่ที่รับผิดชอบทำให้เชื่อได้ว่ามีการนำเข้าหรือขนย้ายพ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาว ระหว่างศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งแต่ละแห่ง ทั้งภายในพื้นที่ภาคเดียวกันและต่างภาคกัน เกิดการผสมระหว่างต่างประชากร รวมทั้งอาจมีการผลิตพ่อแม่พันธุ์รุ่นใหม่ขึ้นมาอีกจากการใช้พ่อแม่จำนวนน้อยหรือเพียงไม่กี่คู่ จึงเป็นเหตุให้ประชากรเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งรวมถึงการเปลี่ยนแปลงในองค์ประกอบทางพันธุกรรมของประชากรด้วยเช่นกัน โดยอาจเปลี่ยนไปได้ทั้งในทางเพิ่มขึ้นหรือลดลง (Allendorf and Ryman, 1987) ดังเช่นที่ปรากฏในการศึกษาของ ฟารีดะ และคณะ (2551), Wansuk Senanan (unpublished data) และการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งมีการดำเนินการในช่วงเวลาที่ต่างกัน (2-3 ปี หรืออาจมากกว่า) และมีผลการวิเคราะห์ปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่างกัน โดยปรากฏผลการวิเคราะห์ทั้งในระดับที่สูง (Wansuk Senanan, unpublished data) และต่ำ (ฟารีดะ และคณะ, 2551; การศึกษาครั้งนี้) ถึงแม้จะเป็นการวิเคราะห์ในประชากรที่มาจากแหล่ง/ศูนย์ เดียวกันก็ตาม

ความสัมพันธ์และความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Nei, 1978) ระหว่างประชากรปลากะพงขาวทุกคู่ประชากร (ใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม) พร้อมทั้งค่า P_{exact} ซึ่งระบุผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากรทุกคู่ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี exact test (Fisher's method) ได้แสดงไว้ใน Table 4

Figure 1 แสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ระหว่างประชากรปลากะพงขาวจากแหล่งเพาะพันธุ์ 5 ประชากร จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของ Nei (1978) (Table 4, above diagonal) ซึ่งปรากฏว่าได้แสดงความสัมพันธ์ออกมาเป็น 2 กลุ่มประชากร คือ กลุ่มประชากรจากกระบี่ ตรัง และนครศรีธรรมราช และกลุ่มประชากรระยองและลูกพันธุ์ ดังนั้นในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากรโดย AMOVA จึงได้ระบุกลุ่มประชากรตามที่ปรากฏใน Figure 1 เพื่อตรวจสอบความแตกต่างให้ครอบคลุม 3 ระดับ คือ (1) ความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มประชากรที่ปรากฏ (2) ความแตกต่างระหว่างประชากรภายในกลุ่มของ 2 กลุ่มประชากรที่ปรากฏ และ (3) ความแตกต่างระหว่างประชากรภายในประชากรทั้งหมด

ความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยค่า F-statistics (inbreeding coefficients, fixation indexes) 3 ระดับ ประกอบด้วยค่าที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร (F_{ct}) ระหว่างประชากรภายในกลุ่ม (F_{sc}) และระหว่างประชากรทั้งหมด (F_{st}) ซึ่งคำนวณจากค่า variance components (V_a ค่าระหว่างกลุ่ม, V_b ค่าระหว่างประชากรภายในกลุ่ม, V_c ค่าภายในประชากรทั้งหมด, และ V ค่ารวม) พร้อมทั้งผลการวิเคราะห์

ความแตกต่างโดยค่า P (P_{Fct}, P_{Fsc} และ P_{Fst}) ได้แสดงไว้ใน Table 5

นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ค่า F_{st} และ P_{Fst} ระหว่างประชากรทุกคู่ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างในทุกคู่ประชากรได้แสดงไว้ใน Table 6

Table 4 Nei (1978)'s genetic distances between each pair of populations (above diagonal), and P_{exact} values from the analyses using exact test (below diagonal) (P_{exact}<0.005: significant difference under Bonferroni correction, 0.05/10 tests = 0.005).

Population	Krabi	Trang	Nakhon Si Thammarat	Rayong	Progeny of Krabi
Krabi	-	0.0903	0.0747	0.0998	0.1183
Trang	0.2892	-	0.0330	0.0867	0.1217
Nakhon Si Thammarat	0.3445	1.0000	-	0.0937	0.0799
Rayong	0.0099	0.0668	0.1251	-	0.0511
Progeny of Krabi	0.0000	0.0005	0.0051	0.0000	-

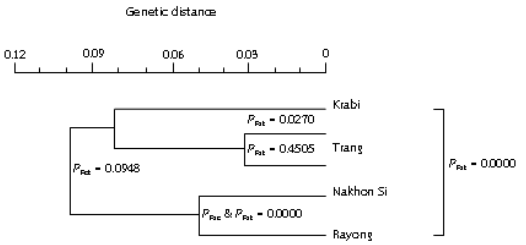

Figure 1 Phylogenetic dendrogram of 5 Asian seabass populations constructed by UPGMA using Nei (1978)'s genetic distances. The P_{Fct}, P_{Fsc} and P_{Fst} values are the ones shown in Tables 5 and 6.

การตรวจสอบความแตกต่างโดยระบุเป็น 2 กลุ่มประชากรตามที่ปรากฏใน Figure 1 พบว่า ความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร (V_a และ F_{ct}) และระหว่างประชากรภายในกลุ่ม (V_b และ F_{sc}) มีน้อยมากและอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน โดยคิดเป็นเพียง 2.43% และ 3.36% ของปริมาณทั้งหมดตามลำดับ (Table 5) ปริมาณความแตกต่างเกือบทั้งหมดไปอยู่ที่ ความแตกต่างระหว่างประชากรทั้งหมด (V_c และ F_{st}) ซึ่งมีถึง 94.21% อย่างไรก็ตาม จากผลการทดสอบโดยค่า P_{Fct}, P_{Fsc} และ P_{Fst} (Table 5) ระบุว่าไม่มีนัยสำคัญในความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร (P_{Fct}>0.02) แต่มีนัยสำคัญในความแตกต่างระหว่างประชากรภายในกลุ่ม (P_{Fsc}<0.02) และในประชากรทั้งหมด (P_{Fst}<0.02) แสดงว่าประชากรทั้งหมดอยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือไม่แบ่งกลุ่มกัน แต่มีความแตกต่างระหว่างประชากรที่อยู่ภายในกลุ่มเดียวกันนี้

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากรทุกคู่โดยวิธี exact test (P_{Exact}) และ F_{st} (P_{Fst}) (Tables 4 and 6, below diagonal) ที่ระดับนัยสำคัญภายใต้ Bonferroni correction ปรากฏว่าไม่มีนัยสำคัญในความแตกต่างในทุกคู่ประชากรของกลุ่มกระบี่ ตรัง และนครศรีธรรมราช (P_{Exact}>0.005, P_{Fst}>0.002) แสดงว่า ความแตกต่างระหว่างประชากรภายในกลุ่มตามที่ระบุข้างต้น (V_b 3.36%, P_{Fsc}<0.02) อยู่ที่คู่ของประชากรระยองและลูกพันธุ์

ซึ่งแสดงผลตรงกันทั้งจากการวิเคราะห์โดย exact test และ F_{st} ที่ระบุว่ามีนัยสำคัญในความแตกต่างซึ่งกันและกัน (P_{Exact}<0.005, P_{Fst}<0.002)

Table 5 Variance components (V_a, V_b, V_c and V), F-statistics (F_{ct}, F_{sc} and F_{st}) and the *P* values showing differences between groups (P_{Fct}), between populations within groups (P_{Fsc}) and within total populations (P_{Fst}) (*P*<0.02, having significant difference; Fu, 1997; Excoffier *et al*., 2006).

Variance components	V_a 0.0915 = 2.43%	V_b 0.1269 = 3.36%	V_c 3.5540 = 94.21%	$V = V_a+V_b+V_c$ 3.7724 = 100%
F-statistics	$F_{ct} = V_a/V$ 0.0243	$F_{sc} = V_b/(V_b+V_c)$ 0.0345	$F_{st} = (V_a+V_b)/V$ 0.0579	
P-values	P_{Fct} 0.0948	P_{Fsc} 0.0000	P_{Fst} 0.0000	

Table 6 F_{st} (above diagonal) and P_{Fst} (below diagonal) between each pair of populations (P_{Fst}<0.002: significant difference under Bonferroni correction = 0.02/10 tests = 0.002).

Population	Krabi	Trang	Nakhon Si Thammarat	Rayong	Progeny of Krabi
Krabi	-	0.0476	0.0366	0.0564	0.0704
Trang	0.0270	-	0.0008	0.0448	0.0697
Nakhon Si Thammarat	0.0451	0.4505	-	0.0437	0.0422
Rayong	0.0000	0.0000	0.0180	-	0.0335
Progeny of Krabi	0.0000	0.0000	0.0270	0.0000	-

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากรทุกคู่โดยวิธี exact test (P_{Exact}) และ F_{st} (P_{Fst}) (Tables 4 and 6, below diagonal) ที่ระดับนัยสำคัญภายใต้ Bonferroni correction ปรากฏว่าไม่มีนัยสำคัญในความแตกต่างในทุกคู่ประชากรของกลุ่มกระบี่ ตรัง และนครศรีธรรมราช (P_{Exact}>0.005, P_{Fst}>0.002) แสดงว่า ความแตกต่างระหว่างประชากรภายในกลุ่มตามที่ระบุข้างต้น (V_b 3.36%, P_{Fsc}<0.02) อยู่ที่คู่ของประชากรระยองและลูกพันธุ์ ซึ่งแสดงผลตรงกันทั้งจากการวิเคราะห์โดย exact test และ F_{st} ที่ระบุว่ามีนัยสำคัญในความแตกต่างซึ่งกันและกัน (P_{Exact}<0.005, P_{Fst}<0.002)

ส่วนผลการวิเคราะห์ระหว่างคู่ของประชากรระยองกับอีก 3 ประชากร (กระบี่ ตรัง และนครศรีธรรมราช) ปรากฏว่าการวิเคราะห์โดย exact test ไม่ระบุนัยสำคัญในความแตกต่าง (P_{Exact}>0.005) ในขณะที่ค่า F_{st} ระบุว่าประชากรระยองมีนัยสำคัญแตกต่างจากประชากรกระบี่ และตรัง (P_{Fst}<0.002) โดยไม่แตกต่างจากประชากรนครศรีธรรมราช (P_{Fst}>0.002) ซึ่งสอดคล้องกับสภาพทางภูมิศาสตร์ ในกรณีที่พ่อแม่พันธุ์เริ่มต้นของแต่ละประชากรมาจากธรรมชาติในฝั่งทะเลเดียวกัน (ฝั่งอันดามัน, กระบี่ และ ตรัง; ฝั่งอ่าวไทย ระยอง และ นครศรีธรรมราช) หรือต่างฝั่งกัน

(กระบี่/ตรัง และ ระยอง) แต่เมื่อพิจารณาจากพันธุ์ประวัติของประชากรเหล่านี้ ที่ถูกนำเข้าหรือขนย้ายระหว่างต่างโรงเพาะฟัก (Table 1) ทำให้เชื่อได้ว่าน่าจะมีการปะปนกันของประชากรเหล่านี้ในระดับหนึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความแตกต่างที่ไม่ระบุนัยสำคัญในความแตกต่าง ถึงแม้จะเป็นประชากรที่อยู่คนละฝั่งทะเลกันก็ตาม ทั้งการวิเคราะห์โดยวิธี exact test (นครศรีธรรมราช/ระยอง และ ตรัง/กระบี่, P_{Exact}>0.005) และโดยค่า F_{st} (นครศรีธรรมราช และ ตรัง/กระบี่, P_{Fst}>0.002)

สุดท้ายประชากรลูกพันธุ์ แสดงผลการวิเคราะห์ทั้งโดยวิธี exact test และ F_{st} ว่ามีนัยสำคัญแตกต่างจากประชากรกระบี่ ตรัง และระยอง (P_{Exact}<0.005, P_{Fst}<0.002) แต่ไม่แตกต่างจากประชากรนครศรีธรรมราช (P_{Exact}>0.005, P_{Fst}>0.002) ที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะว่าลูกพันธุ์ประชากรนี้มาจากการเพาะพันธุ์โดยนำพ่อแม่พันธุ์ต่างประชากร (กระบี่ ตรัง และนครศรีธรรมราช) จำนวนหนึ่งปล่อยลงบ่อผสมพร้อมกันในคราวเดียว (Table 1) เป็นเหตุให้ประชากรลูกพันธุ์ที่เกิดขึ้นเป็นแหล่งรวมพันธุกรรมของพ่อแม่ที่มาจากต่างประชากร และมีความแตกต่างออกไปมากเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรอื่นๆ ถึงแม้จะเป็นประชากรพ่อแม่ก็ตาม แต่ภายใต้วิธีการผสมพันธุ์แบบหมู่ (mass spawning) เช่นนี้ เป็นไปได้ที่พ่อแม่พันธุ์จากประชากรนครศรีธรรมราช อาจสามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้มากกว่าประชากรอื่น จึงทำให้ประชากรใหม่ที่เกิดขึ้นมีพันธุกรรมไม่แตกต่างจากประชากรนครศรีธรรมราช

ประโยชน์ของข้อมูลความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ข้อมูลความแปรปรวนหรือความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเฉพาะค่าเฮเทอโรไซโกซิตีและจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง เป็นข้อมูลอีกด้านหนึ่งที่ระบุคุณภาพของสายพันธุ์ได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น เพราะสามารถสื่อถึงศักยภาพในการวิวัฒนาการของประชากรได้ โดยค่าเฮเทอโรไซโกซิตีซึ่งมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการคัดเลือก ทั้งโดยมนุษย์และการคัดเลือกตามธรรมชาติ จะมีความสำคัญต่อการปรับตัวในระยะสั้น ขณะที่ความหลากหลายของแอลลีล (จำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง) จะเกี่ยวข้องกับความอยู่รอดในระยะยาว (Allendorf, 1986) โดยเฉพาะในประชากรขนาดเล็ก (อย่างเช่นประชากรโรงเพาะฟัก) การลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม อาจส่งผลกระทบต่อความอยู่รอดของประชากรในอนาคตได้ (Frankham *et al*., 2002) ด้วยเหตุนี้ความแปรปรวนหรือความหลากหลายทางพันธุกรรม จึงเป็นแหล่งทรัพยากรทางพันธุกรรมพื้นฐาน ที่จำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ ซึ่งจะประสบผลสำเร็จหรือไม่เพียงใดขึ้นกับแหล่งทรัพยากรนี้เป็นสำคัญ แต่ด้วยเหตุที่กิจกรรมการเพาะเลี้ยงหรือปรับปรุงพันธุ์สามารถทำให้องค์ประกอบพันธุกรรมของประชากรพื้นฐาน (base population) เปลี่ยนไปด้วยเช่นกัน โดยจะมีปริมาณลดลงทุกครั้งที่มีการเพาะพันธุ์แต่ละรุ่น (Allendorf and Ryman, 1987) ดังนั้นการดำเนินงานจึงจำเป็นต้องเริ่มต้นจากประชากรพ่อแม่พันธุ์ (ประชากรพื้นฐาน) ที่มีปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงพอสมควร ซึ่งจากการศึกษาในกุ้งกุลาดำ (พนม และคณะ, 2548) ระบุว่าปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรเริ่มต้น อย่างน้อยที่สุดไม่ควรจะต่ำกว่าหรืออยู่ในระดับเดียวกัน เมื่อเทียบกับค่าที่ปรากฏในประชากรธรรมชาติ แต่ภายใต้ค่าที่วิเคราะห์ได้ในปลากะพงขาวจากแหล่งเพาะพันธุ์ในครั้งนี้ ปรากฏว่ามีปริมาณต่ำกว่าประชากรธรรมชาติที่เคยมีการศึกษาไว้แล้วค่อนข้างมาก จึงควรมีการสร้างประชากรพ่อแม่พันธุ์ เพื่อยกระดับความหลากหลาย

ทางพันธุกรรมให้สูงขึ้น (โดยอาจมีการผสมระหว่างต่างประชากร หรือนำประชากรธรรมชาติเข้ามาผสม) ประชากรที่มีอยู่ทั้งหมดควรได้รับการตรวจสอบ โดยเฉพาะประชากรที่ไม่มีในการศึกษาครั้งนี้ ในกระบวนการสร้างประชากรพ่อแม่พันธุ์ควรมีการตรวจเช็คข้อมูลปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรม พร้อมกับทดสอบลักษณะแสดงออกด้านการเพาะเลี้ยงควบคู่กันไป เพื่อให้ได้ประชากรที่มีคุณภาพทางพันธุกรรมที่สมบูรณ์ และมีศักยภาพที่ยั่งยืนในการเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง และกระบี่ และเจ้าหน้าที่ศูนย์ฯ ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง โดยเฉพาะคุณอาคม สิงหบุญ ที่ได้ช่วยเก็บตัวอย่างเลือดและให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์ผลการศึกษา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมโมเลกุลสัตว์น้ำ สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ และขอขอบคุณ ดร.วันศุกร์ เสนานาญ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อนุเคราะห์ข้อมูลที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์ งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากกรมประมง ในส่วนกิจกรรมพัฒนาการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์ภายใต้โครงการ “วิเคราะห์เปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ในประชากรปลากะพงขาวจากแหล่งเพาะพันธุ์” รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 52-0600-52068

เอกสารอ้างอิง

พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข ศรีรัตน์ สอดศุข ธนัญช์ สังกรธนกิจ พลชาติ ผิวเณร และ ภูวนัย ชัยศรี. 2552. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างระหว่างประชากรในปูม้าจากแหล่งธรรมชาติของไทย โดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์และการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโต. เอกสารวิชาการฉบับที่ 10/2552 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข ศรีรัตน์ สอดศุข พลชาติ ผิวเณร และ สุภัทรา อุไรวรรณ์. 2553. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์และการทดสอบยืนยันโดยใช้วิเคราะห์พ่อ-แม่-ลูก ในกุ้งก้ามกราม. *Thai J Genet* 3: 137–148.

พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข สุภัทรา อุไรวรรณ์ และ ศรีรัตน์ สอดศุข. 2548. วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายในกระบวนการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 5/2548 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ฟารีดะ มะลี อรุณรัศมิ์ วณิชชานนท์ และ แจ่มจันทร์ เพชรศิริ. 2551. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) โดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ. การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 18 ประจำปี 2551 “การวิจัยกับการแก้ปัญหาวิกฤตชาติ”.วันที่ 25-26 กันยายน 2551 ณ โรงแรมกรีนเวิลด์ พาเลซ จ.สงขลา (URL: http://www.pt.tsu.ac.th/rdi/ConAll/Poster18/P18.pdf)

ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง. 2554. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2552. เอกสารฉบับที่ 9/2554 ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

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

Allendorf, F.W. and Ryman, N. 1987.Genetic management of hatchery stocks. In: N. Ryman and F. Utter (eds.) *Population Genetics&Fisheries Management*. University of Washington Press, Seattle. pp. 141–159.

Alonso, S. and Armour, J.A.L. 2001. A highly variable segment of human subterminal 16p reveals a history of population growth for modern humans outside Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 864–869.

Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E. and Van der Noordaa, J. 1990.Rapid and simple methods for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495–503.

Charoentawee, K., Poompuang, S., Na-Nakorn, U. and Kamonrat, W. 2007. Genetic diversity of hatchery stocks of giant freshwater prawn (*Macrobrachium Rosenbergii*) in Thailand. *Aquaculture* 271: 121–129.

Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. 2006. Arlequin ver 3.1. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Berne, Switzerland. (URL: http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3)

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

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

Goudet, J. 1995. Fstat version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *J Hered* 86: 485–486.

Holsinger, K.E. 2012. Tajima's *D*, Fu's F_s, Fay and Wu's *H*, and Zeng et al.'s *E*. (URL: http://darwin.eeb.uconn.edu/eeb348/lecture-notes/molevol-tajima.pdf).

Höss, M. 1994. More about the silica method. *Ancient DNA Newsletter* 2: 10–12.

Höss, M. and Pääbo, S. 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res* 21: 3913–3914.

Kemp, B.M., Monroe, C. and Smith, D.G. 2006. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. *J Archaeol Sci* 33: 1680–1689.

Kim, J.E., Withler, R.E., Ritland, C. and Cheng, K.M. 2004.Genetic variation within and between domesticated Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, strains and their progenitor populations. *Environ Biol Fishes* 69: 371–378.

Larson, H.K. 1999. Order Perciformes. Suborder Percoidei. Centropomidae. Sea perches. In: K.E. Carpenter and V.H. Neim (eds.) *The Living Marine Resources of the Western Central Pacific.* FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes. Vol 4: Bony fishes part 2 (Mugillidae to Carangidae). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. pp. 2429–2432.

Lewis, A.F., Evans, B.S. and Jerry, D.R. 2006. Loss of genetic diversity due to hatchery

culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 261: 1056–1064.

Lui, Z.J. and Cordes, J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1–37.

Nei, M. 1978. Estimation of average hetero zygosisty and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590.

Norris, A.T., Bradley, D.G. and Cunningham, E.P. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture* 180: 247–264.

Rainboth, W.J. 1996. *Fishes of the Cambodian Mekong*. FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225.

Smouse, P.E., Neel, J.V. and Liu, W. 1983. Multiple-locus departures from panmictic equilibrium within and between village gene pools of Amerindian Tribes at different stages of agglomeration. *Genetics* 104: 133–153.

Sonkaew, S., Senanan, W. and Na-Nakorn, U. 2011. Genetic diversity of *Lates calcarifer* Bloch populations in the Gulf of Thailand. *J Appl Anim Sci* 4: 21–30.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, B., Wills, D. and Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identification and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4: 535–538.

Yeh, F.C., Yang, R. and Boyle,T. 1999. POPGENE Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. (URL: http://ualberta.ca/~fyeh/popgene_info.html)

Yue, G.H., Li, Y., Chao, T.M., Chou, R. and Orban, L. 2002. Novel microsatellites from Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and their application to broodstock analysis. *Mar Biotechnol* 4: 503–511.

Yue, G.H., Zhu, Z.Y., Lo, L.C., Wang, C.M., Lin, G., Feng, F., Pang, H.Y., Li, J., Gong, P., Liu, H.M., Tan, J., Chou, R., Lim, H. and Orban, L. 2009. Genetic variation and population structure of Asian seabass (*Lates calcarifer*) in the Asia-Pacific region. *Aquaculture* 293: 22–28.

Zhu, Z.Y., Lin, G., Lo, L.C., Xu, Y.X., Feng, F., Chou, R. and Yue, G.H. 2006. Genetic analysis of Asian seabass stocks using novel polymorphic microsatellites. *Aquaculture* 256: 167–173.