

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทวายแดง (*Nemipterus hexodon*)
ในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย

GENETIC DIVERSITY OF THREADFIN BREAM (*Nemipterus hexodon*)
IN LOWER PART OF SOUTHERN THAILAND

วีระเกียรติ ทรัพย์มี^{1*} และ จุฑามาศ ศุภพันธ์²

¹สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช
จ.นครศรีธรรมราช 80110

²หลักสูตรครุศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช
จ.นครศรีธรรมราช 80280

Verakiat Supmee^{1*} and Juthamas Suppapan²

¹Master of Education in Science program, Faculty of Education, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University,
Nakhon Si Thammarat 80280

²Department of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya,
Nakhon Si Thammarat Campus, Nakhon Si Thammarat 80110

*E-mail: audy422r@yahoo.com

Received: 2018-07-04

Revised: 2019-03-22

Accepted: 2019-07-08

บทคัดย่อ

ศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลาทวายแดง (*Nemipterus hexodon*) ในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ของยีน cytochrome oxidase subunit I ขนาด 443 คู่เบส โดยเก็บตัวอย่างปลาทวายแดง จำนวน 80 ตัว จากฝั่งทะเลอันดามัน 2 จังหวัด คือ จังหวัดสตูล จำนวน 21 ตัว กับจังหวัดกระบี่ จำนวน 18 ตัว และฝั่งทะเลอ่าวไทย 2 จังหวัด คือ จังหวัดสงขลา จำนวน 21 ตัว กับจังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 20 ตัว พบว่ามีตำแหน่ง polymorphic site จำนวน 33 ตำแหน่ง ซึ่งแสดงว่าประชากร ปลาทวายแดงในภาคใต้ตอนล่างมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ค่า haplotype diversity และ nucleotide diversity มีค่า 0.687 ± 0.050 และ 0.011 ± 0.002 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี Analysis of Molecular Variance และ Pairwise F_{ST} พบว่า

เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร โดยแบ่งเป็นประชากรจากฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งทะเลอ่าวไทย ซึ่งการเกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรน่าจะเกิดจากปัจจัยทางภูมิศาสตร์คือคาบสมุทรลพบุรีที่ขัดขวางการผสมพันธุ์ระหว่างประชากรปลาทรายแดงที่อาศัยระหว่าง 2 พื้นที่จนทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรม ผลการวิเคราะห์ประวัติประชากรจากการทดสอบ mismatch distribution ด้วยพารามิเตอร์ SSD และ Harpending Raggedness index, การทดสอบ neutrality test ด้วยวิธี Tajima's D test และ Fu' F_s test , การประเมินขนาดประชากรด้วยพารามิเตอร์ θ_0 และ θ_1 , การวิเคราะห์แผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮปโลไทป์ (MSN) ให้ผลการทดลองในทิศทางที่แสดงว่าประชากรปลาทรายแดงในภาคใต้ตอนล่างเคยมีการขยายขนาดประชากร ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการจัดการปลาทรายแดงในภาคใต้ตอนล่างได้

คำสำคัญ: ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ปลาทรายแดง, ภาคใต้ตอนล่าง

ABSTRACT

Genetic diversity of the Threadfin Bream (*Nemipterus hexodon*) living in the lower part of Southern Thailand was investigated using nucleotide sequence of the mitochondrial DNA in cytochrome oxidase subunit I gene. Fragments of 443 bp of the cytochrome oxidase subunit I gene were sequenced for 80 individuals from 4 localities over most of the species range in the Andaman Sea (Satun (21), Krabi (18)) and the Gulf of Thailand (Songkhla (21), Nakhon Si Thammarat (20)). The polymorphic site was 33 indicating that *N. hexodon* populations living in the lower part of Southern Thailand had high levels of genetic diversity. Estimated values of haplotype and nucleotide diversities were 0.687 ± 0.050 and 0.011 ± 0.002 , respectively. The analysis of molecular variance (AMOVA) and Pairwise F_{ST} test revealed genetic differentiation of *N. hexodon* between the Andaman Sea and the Gulf of Thailand populations. Genetic separation the result from the gene flow disruption between populations of the Gulf of Thailand and the Andaman Sea, caused by a geographic barrier like the Malaysian peninsula. Mismatch distribution (SSD, Harpending Raggedness index), neutrality tests (Tajima's D test, Fu' F_s test), estimates of population parameters (θ_0 , θ_1) and minimum spanning network (MSN) suggested that *N. hexodon* might have undergone a population expansion. This study provided basic information that could be used for management this species in lower Southern Thailand.

Keywords: mitochondrial DNA, genetic diversity, Threadfin Bream, Lower Southern

บทนำ

ปลาทรายแดง (*Nemipterus hexodon*) เป็นปลาน้ำเค็มที่อาศัยบริเวณพื้นทรายปนโคลนบริเวณชายฝั่งในเขตนํ้าลึกตั้งแต่ 10 - 80 เมตร พบแพร่กระจายทั่วไปตามชายฝั่งทะเลในเขตร้อนในประเทศไทยพบตลอดทั้งชายฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งทะเลอ่าวไทย (Russell, 1990) จัดเป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญและมีการจับเป็นปริมาณมากด้วยเรือประมงพาณิชย์ เป็นปลาที่นิยมนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตสุริมิเนื่องจากเนื้อปลามีสีขาว มีไขมันต่ำและไม่มีกลิ่นคาว (Hatstuti et al., 2017) จากสถิติการประมงพบว่าปริมาณปลาทรายแดงเริ่มมีการจับได้ในปริมาณที่ลดลงเนื่องจากมีการทำประมงที่ผิดกฎหมาย เช่น เรืออวนลาก เรืออวนรุน (Fishery Statistics Analysis and Research Group, 2017) ดังนั้นจึงควรมีแนวทางในการจัดการ ซึ่งการจัดการทรัพยากรปลาทรายแดงอย่างยั่งยืนนั้นจำเป็นต้องใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อพิจารณาประกอบ แต่พบว่าข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรปลาทรายแดงยังไม่เคยมีมาก่อน

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบว่าประชากรมีพันธุกรรมแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด และมีการแยกออกเป็นประชากรย่อยหรือไม่ โดยประชากรย่อยอาจมีการผสมพันธุ์ข้ามกลุ่มซึ่งทำให้เกิดโอกาสในการถ่ายเทยีน ถ้ามีการถ่ายเทของยีนมากประชากรก็จะแตกต่างกันน้อยและถ้ามีการถ่ายเทของยีนน้อยหรือไม่มีเลยประชากรก็จะแตกต่างกันมากขึ้น ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรคือสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ซึ่งทำให้ประชากรย่อยไม่สามารถแพร่กระจายเพื่อมาผสมพันธุ์กันได้ และปัจจัยจากความสามารถในการแพร่กระจายของสมาชิกภายในประชากร ซึ่งหากประชากรมีความสามารถในการแพร่กระจายได้อย่างจำกัด จะทำให้โอกาสที่จะมีการผสมพันธุ์ระหว่างประชากรจึงเกิดขึ้นได้น้อยและมีโอกาสที่จะเกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมมากขึ้น (Panithanarak, 2017) โดยภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทยตั้งอยู่ระหว่างสองฝั่งทะเลคือ ฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งทะเลอ่าวไทยซึ่งถูกขวางกั้นด้วยคาบสมุทรมลายู จึงอาจเป็นปัจจัยในการขัดขวางการถ่ายเทพันธุกรรมระหว่างประชากรทั้งสองฝั่งทะเลและอาจส่งผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมได้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากไม่มีระบบตรวจสอบความถูกต้องจากการจำลองดีเอ็นเอ (proofreading) และมีการถ่ายเทพันธุกรรมทางเดียว จึงทำให้ไม่เกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม (recombination) และไม่จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างเพื่อศึกษาในปริมาณมาก (Boore, 1999) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน cytochrome oxidase subunits I เครื่องหมายพันธุกรรมที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาทะเลหลายชนิด เช่น ปลา *Lateolabrax maculatus* (Wang et al., 2017), ปลา *Larimichthys polyacis* (Zhang et al., 2017) และปลา *Sardinella longiceps* (Sukumaran et al., 2016) อีกทั้งเครื่องหมายทางพันธุกรรมดังกล่าวสามารถนำไปวิเคราะห์ประวัติประชากรเพื่อใช้ในการอธิบายสาเหตุของการแยกกลุ่มประชากรตามสภาพ

ภูมิศาสตร์และการวิเคราะห์ประวัติประชากรได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อใช้ในการอธิบายการเกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของปลาทรายแดงในภาคใต้ตอนล่าง ซึ่งข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการจัดการอนุรักษ์ประชากรปลาทรายแดงในธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพและยังคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรม

วิธีการ

1.1 การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างปลาทรายแดงตัวเต็มวัยจากฝั่งทะเลอันดามัน ได้แก่ จังหวัดสตูล (บ้านบ่อเจ็ดลูก) และจังหวัดกระบี่ (อ่าวท่าเลน) และจากฝั่งทะเลอ่าวไทย ได้แก่ จังหวัดสงขลา (บ้านสะกอม) และจังหวัดนครศรีธรรมราช (บ้านปลายทอน) จำนวน 80 ตัว โดยเก็บตัวอย่างระหว่างเดือน มกราคม-เมษายน 2561 (ตารางที่ 1) นำตัวอย่างมาตรวจทดสอบเพื่อยืนยันชนิดตาม Russell (1990) จากนั้นนำชิ้นเนื้อน้ำหนักประมาณ 20-30 มิลลิกรัม มาสกัด total genomic DNA ด้วยชุดสกัดจากชิ้นเนื้อ (TIANamp Genomic Mini Kit, TAIWAN)

1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 600 คู่เบส ของยีน cytochrome oxidase subunits I โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจากยีน cytochrome oxidase subunits I ในปลา *N. hexodon* จากฐานข้อมูล NCBI หมายเลข Accession number KY362820.1 (Hung et al., 2017) ซึ่งได้ไพรเมอร์ดังนี้ NH_COI_H1 5' CCT TTA TCT CTT ATT TGG TGC C 3' และ NH_COI_L1 5' GAA GAG ATG TTG ATA AAG AAT GGG 3' จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction : PCR) โดยใช้ปริมาตรรวมในหลอด PCR ขนาด 50 ไมโครลิตรซึ่งประกอบด้วย 10X Taq buffer 5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 7.5 ไมโครลิตร, 2 mM dNTPs mix 4 ไมโครลิตร, 10 μM primer forward 2 ไมโครลิตร, 10 μM primer reverse 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (Thermo SCIENTIFIC, USA) 0.5 ไมโครลิตร (2.5 unit), DNA template 5 ไมโครลิตร (50-100 ng) และ Ultrapure water 24 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่อง Major Cycler, CYCLER-25 (TAIWAN) โดยใช้อุณหภูมิดังนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที, จากนั้น denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 40 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาทีรวมเป็นจำนวน 35 รอบ ใช้อุณหภูมิสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำผลการทำปฏิกิริยา PCR ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis นำผลผลิต PCR ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR Purification

Mini Kit (TIANgel Mini DNA Purification Kit, TAIWAN) จากนั้นส่งดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการ (1ST Base Laboratory, Malaysia)

1.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

1.3.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากหน่วยบริการมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของยีน cytochrome oxidase subunits I ในปลา *N. hexodon* จากฐานข้อมูล NCBI หมายเลข Accession number KY362820.1 จากนั้นจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบ multiple alignment ในตัวอย่างปลาระหว่างประชากรด้วยโปรแกรม Clustal W 1.83 (Chenna et al., 2003) คำนวณค่า genetic variation ได้แก่ ค่า polymorphic site, จำนวน haplotype, haplotype diversity, π (Nei, 1987) และ nucleotide diversity, π (Nei, 1987) โดยใช้โปรแกรม DnaSP version 5.00 (Librado & Rozas 2009)

1.3.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

วิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี Analysis of Molecular Variance (AMOVA) เพื่อเปรียบเทียบระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรโดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) โดยวิเคราะห์ค่า F -statistic ได้แก่ Φ_{CT} , Φ_{SC} และ Φ_{ST} ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations แบ่งการวิเคราะห์เป็น 2 แบบ แบบที่ 1 แบ่งประชากรเป็น 4 กลุ่มตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง (single region) ได้แก่ จังหวัดสตูล, จังหวัดกระบี่, จังหวัดสงขลาและจังหวัดนครศรีธรรมราช และแบบที่ 2 แบ่งกลุ่มประชากรตามสภาพภูมิศาสตร์ ได้แก่ กลุ่มประชากรในฝั่งทะเลอันดามันประกอบด้วยจังหวัดสตูลกับจังหวัดกระบี่และกลุ่มประชากรในฝั่งทะเลอ่าวไทยประกอบด้วยจังหวัดสงขลา กับจังหวัดนครศรีธรรมราช วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรด้วยวิธี pairwise F_{ST} ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010)

1.3.3 ประวัติประชากร

วิเคราะห์ประวัติประชากรโดยใช้การทดสอบ 4 วิธี ได้แก่ (1) วิเคราะห์ mismatch distribution เพื่อทดสอบการขยายขนาดของประชากรภายใต้สมมติฐาน sudden expansion model โดยใช้ค่าทดสอบ Harpending Raggedness index (Harpending, 1994) เพื่อทดสอบการเข้ากันได้ของค่าทดสอบกับค่าคาดหวัง และการทดสอบ sum of squared deviations (SSD) เพื่อทดสอบ goodness-of-fit ทุกวิธีการวิเคราะห์ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) (2) ทดสอบ selective neutrality โดยวิเคราะห์ค่า Tajima's D (Tajima, 1989) และ Fu's F_s (Fu, 1997) เพื่อทดสอบการเบี่ยงเบนไปจากประชากรสมดุลตาม neutral evolution (3) ประเมินขนาดของประชากร

ด้วยพารามิเตอร์ θ_0 และ θ_1 เมื่อ θ_0 คือขนาดประชากรก่อนขยายขนาด และ θ_1 คือ ขนาดประชากรหลังขยายขนาด และมีค่าเท่ากับ $2N\mu$ เมื่อ N คือค่า effective female population size และ μ คือ ค่า mutation rate (4) สร้างแผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ (Minimum Spanning Network, MSN) โดยใช้ค่า mean number of pairwise differences ระหว่างแฮพลไทป์ด้วยโปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations

ผลการทดลอง

ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunits I ที่ทำการวิเคราะห์ขนาด 443 คู่เบส พบว่ามีตำแหน่ง align sites จำนวน 443 ตำแหน่ง แบ่งเป็น monomorphic sites 410 ตำแหน่ง และ polymorphic sites 33 ตำแหน่ง (singleton variable site 4 ตำแหน่ง และ parsimony variable site 29 ตำแหน่ง) พบจำนวนแฮพลไทป์ทั้งหมด 14 แฮพลไทป์ประกอบไปด้วยแฮพลไทป์ที่เป็น shared haplotype จำนวน 6 แฮพลไทป์ โดยแฮพลไทป์ NH02 มีการ shared haplotype กับทุกกลุ่มประชากร ส่วนแฮพลไทป์ NH01, NH04, NH06 มีการ shared haplotype กับกลุ่มประชากรในฝั่งทะเลอันดามัน และแฮพลไทป์ NH12, NH13 มีการ shared haplotype กับกลุ่มประชากรในฝั่งทะเลอ่าวไทย (ตารางที่ 1) พบ rare haplotype จำนวน 8 แฮพลไทป์ โดยทุกกลุ่มประชากรมี rare haplotype พบว่าจังหวัดกระบี่มี rare haplotype มากที่สุดคือ 3 แฮพลไทป์ รองลงมาคือจังหวัดสตูลและจังหวัดนครศรีธรรมราช 2 แฮพลไทป์ และจังหวัดสงขลา 1 แฮพลไทป์ ค่า haplotype diversity และค่า nucleotide diversity ของประชากรรวม มีค่า 0.687 ± 0.050 และ 0.011 ± 0.002 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 การกระจายของแฮพลไทป์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในปลาทรายแดงแต่ละจังหวัดตามแนวชายฝั่งในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย

Haplotype	Satun	Krabi	Songkhla	Nakhon Si Thammarat	Total
NH01	10	5			15
NH02	7	6	15	14	42
NH03	1				1
NH04	1			2	3
NH05	1				1
NH06	1	4			5
NH07		1			1
NH08		1			1
NH09		1			1
NH10				1	1
NH11				1	1
NH12			2	2	4
NH13			2	1	3
NH14			1		1
Total	21	18	20	21	80

ตารางที่ 2 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน cytochrome oxidase subunit I ในโมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของปลาทรายแดงที่อาศัยตามตามแนวชายฝั่งในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย

Locality	No.	No.	No.	Haplotype	Nucleotide diversity (π)
		haplotypes	polymorphic sites	diversity (h)	
Satun	21	6	23	0.686(0.075)	0.006(0.002)
Krabi	18	6	20	0.797(0.056)	0.019(0.004)
Songkhla	21	6	26	0.557(0.124)	0.006(0.004)
Nakhon Si Thammarat	20	4	24	0.437(0.130)	0.010(0.005)
Total	80	14	33	0.687 (0.050)	0.011(0.002)

(ในวงเล็บคือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรพบว่ามีความแตกต่างของโครงสร้างทางพันธุกรรมเมื่อวิเคราะห์จากประชากรรวมทั้งหมด (single region) โดยมีค่า $\Phi_{ST} = 0.084$ และมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยประชากรมีความแปรปรวนภายใน 91.51 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) เมื่อวิเคราะห์โดยแบ่งกลุ่มประชากรเป็นฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งทะเลอ่าวไทย พบว่าทั้งสองกลุ่มประชากรมีความแตกต่างกันโดยมีค่า $\Phi_{CT} = 0.037$ และมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยประชากรมีความแปรปรวนภายใน 90.37 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ผลการวิเคราะห์ค่า pairwise F_{ST} พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างประชากรจังหวัดสตูล กับ จังหวัดสงขลา และจังหวัดนครศรีธรรมราช, จังหวัดกระบี่ กับ จังหวัดสงขลาและจังหวัดนครศรีธรรมราชและไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างจังหวัดสตูลกับจังหวัดกระบี่, จังหวัดสงขลา กับ จังหวัดนครศรีธรรมราช (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร ทดสอบด้วยวิธี AMOVA และค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปลาทรายแดงที่อาศัยตามแนวชายฝั่งในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	p-value
1) Single region					
Among populations	3	19.819	0.214Va	8.49	$\Phi_{ST} = 0.084^*$
Within populations	76	176.031	2.316 Vb	91.51	
Total	79	195.850	2.530		
2) Andaman sea and Gulf of Thailand					
Among groups	1	9.177	0.096Va	3.75	$\Phi_{CT} = 0.037^*$
Among populations within groups	2	10.642	0.150Vb	5.88	$\Phi_{SC} = 0.096$
Within populations	76	176.031	2.316Vc	90.37	$\Phi_{ST} = 0.061^*$
Total	79	195.850	2.562		

*significant differentiation ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 ความแตกต่างทางพันธุกรรมทดสอบด้วยวิธี pairwise FST ระหว่างกลุ่มของปลาทรายแดงวิเคราะห์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากยีน cytochrome oxidase subunit I

	Satun	Krabi	Songkhla	Nakhon Si Thammarat
Satun	-			
Krabi	0.120			
Songkhla	0.023*	0.154*	-	
Nakhon Si Thammarat	0.045*	0.114*	0.030	-

*significant differentiation ($p < 0.05$)

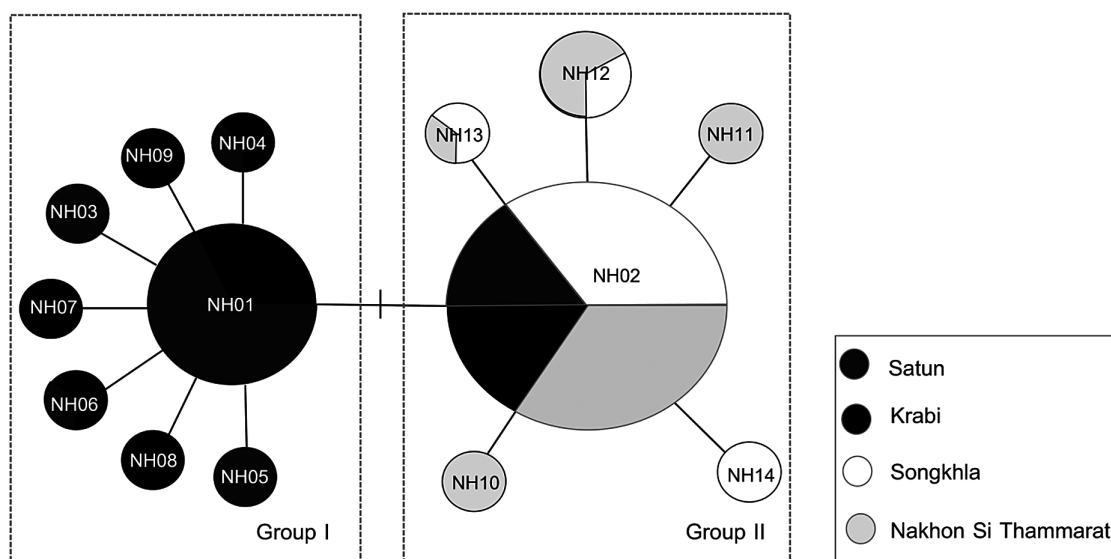
ประวัติประชากร

จากการวิเคราะห์ประวัติประชากรโดยใช้การทดสอบ 4 วิธี ได้ผลดังนี้ (1) การทดสอบ mismatch distribution พบว่าค่า SSD มีค่า 0.104 และไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และค่า Harpending Raggedness index มีค่า 0.357 และไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5) (2) การทดสอบ selective neutrality ด้วยวิธี neutrality test พบว่าค่า Tajima' s D มีค่าติดลบในทุกจังหวัดและมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าของประชากรรวมคือ -1.843 และมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่า F_u F_s มีค่าติดลบในทุกจังหวัดและมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าของประชากรรวมคือ -5.515 และมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5) (3) ค่าพารามิเตอร์ θ_0 และ θ_1 ของประชากรรวมมีค่า 0.000 และ 99999.000 ตามลำดับ โดยในทุกจังหวัดมีค่า θ_1 มากกว่า θ_0 (ตารางที่ 5) (4) แผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ (MSN) พบว่ามีรูปร่างแบบดาว (star topologies) โดยมีแฮพลไทป์ NH02 เป็น common haplotype ซึ่งมีสมาชิกจากทุกกลุ่มประชากร และเชื่อมต่อกับแฮพลไทป์จากสมาชิกฝั่งทะเลอันดามันและทะเลอ่าวไทยด้วยการกลายพันธุ์ 1- 2 ครั้ง ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มประชากรได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยประชากรทั้งหมดจากฝั่งทะเลอันดามันคือ จังหวัดสตูล และจังหวัดกระบี่ และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยประชากรจากฝั่งทะเลอันดามัน คือจังหวัดสตูล และจังหวัดกระบี่ ร้อยละ 24 และประชากรจากฝั่งทะเลอ่าวไทย คือจังหวัดสงขลา และจังหวัดนครศรีธรรมราช ร้อยละ 76 (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ในการทดสอบ mismatch distribution (SSD, Rag), การทดสอบ neutrality test (Tajima's D , F_u s F_s) และ การประเมินขนาดประชากร (θ_0 , θ_1) วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากยีน cytochrome oxidase subunit I

Locality	SSD	Rag	Tajima's D	F_u s F_s	θ_0	θ_1
Satun	0.011	0.103	-2.210*	-4.658*	0.423	99999.000
Krabi	0.108	0.102	-1.873*	-4.781*	1.255	99999.000
Songkhla	0.154	0.324	-2.194*	-4.107*	1.570	99999.000
Nakhon Si Thammarat	0.247	0.310	-1.147*	-5.322*	0.001	99999.000
Total	0.104	0.357	-1.843*	-5.515*	0.000	99999.000

*significant differentiation ($p < 0.05$)



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunits I ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ของปลาทรายแดง : ขนาดวงกลมแสดงตามสัดส่วนของจำนวนสมาชิกในแต่ละแฮพลไทป์, เส้นที่เชื่อมระหว่างแฮพลไทป์คือการเกิดการกลายพันธุ์จำนวนหนึ่งครั้ง, เส้นที่ขีดขวางระหว่างเส้นที่เชื่อมระหว่างแฮพลไทป์ คือ การกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นหนึ่งครั้ง

สรุปและวิจารณ์ผล

ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit I ในปลาทรายแดงที่ทำการวิเคราะห์จำนวน 443 คู่เบส พบตำแหน่ง polymorphic site ถึง 33 ตำแหน่งซึ่งแสดงว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นจึงเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม การศึกษาครั้งนี้พบแฮพลไทป์จำนวน 14 แฮพลไทป์และมีการ share haplotype จำนวน 6 แฮพลไทป์ และมี rare haplotype ซึ่งเป็นแฮพลไทป์เฉพาะของแต่ละจังหวัด จำนวน 8 แฮพลไทป์ ซึ่งสามารถใช้ rare haplotype ในการระบุแหล่งพันธุกรรมของแต่ละจังหวัดได้ (Xu et al., 2009) อีกทั้งการเกิด rare haplotype จำนวนมากในประชากรแสดงว่าประชากรมีความสามารถในการเพิ่มขนาดประชากรสูง (Lewontin, 1974) ซึ่งพบว่าในปลาทะเลหลายชนิดที่อาศัยบริเวณชายฝั่งของประเทศไทยมีจำนวน rare haplotype เป็นจำนวนมาก เช่น ปลาจวด (*Pennahia anea*) (Kanjana et al., 2018) กับปลาตะกรับ (*Scatophagus argus*) ในภาคใต้ของประเทศไทย (Supmee, 2015) และปลาระบอก (*Liza subviridis*) ในทะเลอ่าวไทย (Suppapan, 2015) เป็นต้น สำหรับค่า haplotype diversity ทุกกลุ่มประชากรมีค่าสูงกว่าค่า nucleotide diversity ซึ่งเกิดจาก

ประชากรมีการสะสมการกลายพันธุ์แบบใหม่ในอย่างรวดเร็ว (Watterson, 1984) รูปแบบดังกล่าวพบได้ในประชากรที่มีการขยายขนาดประชากรและพบได้ในปลาหลายชนิด เช่น ปลา small yellow croaker (*L. polyacis*) (Zhang et al., 2017), ปลา Chinese sea bass (*L. maculatus*) (Wang et al., 2017) และ ปลา Indian oil sardine (*S. longiceps*) (Sukumaran et al., 2016) เป็นต้น

โครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี AMOVA และ pairwise F_{ST} พบว่าประชากรปลาทรายแดงในภาคใต้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งทะเลอ่าวไทย ซึ่งน่าจะเกิดจากปัจจัยทางภูมิศาสตร์จากการขวางกั้นของคาบสมุทรมลายูขัดขวางการผสมพันธุ์ระหว่างประชากรปลาทรายแดงจากฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งทะเลอ่าวไทย จึงทำให้เกิดเป็นโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร ซึ่งเคยมีรายงานการเกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลาทะเลชนิดอื่นที่อาศัยระหว่างสองฝั่งทะเลดังกล่าว เช่น ปลาจวด (*P. anea*) (Kanjana et al., 2018) กับปลาตะกรับ (*S. argus*) ในภาคใต้ของประเทศไทย (Supmee, 2015) และม้าน้ำ (*Hippocampus kuda*) (Panithanarak et al., 2010) เป็นต้น สำหรับผลการศึกษา pairwise F_{ST} พบว่าประชากรปลาทรายแดงที่อาศัยในฝั่งทะเลเดียวกันไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมน่าจะเกิดจากประชากรปลาทรายแดงมีความสามารถในการกระจายพันธุ์ได้ดีซึ่งรูปแบบกระจายพันธุ์ของตัวอ่อนของปลาทรายแดงสามารถกระจายพันธุ์ได้ดีโดยมีระยะเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ตามกระแสน้ำได้นานกว่า 35 วัน (Wellington & Victor, 1989) จึงทำให้มีโอกาสในการเคลื่อนย้ายประชากรเพื่อเจริญเติบโตรวมกับประชากรอื่นและผสมพันธุ์กับสมาชิกต่างประชากรในฝั่งทะเลเดียวกันทำให้เกิดการถ่ายเทยีนระหว่างประชากร จึงทำให้ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาทรายแดงที่อาศัยในฝั่งทะเลเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการไม่เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างปลาทะเลชนิดอื่นที่อาศัยในฝั่งทะเลเดียวกัน เช่น ฝั่งทะเลอันดามันได้แก่ ปลาตะกรับ (Supmee, 2015) และฝั่งทะเลอ่าวไทย ได้แก่ ปลากระบอก (Suppapan, 2015) เป็นต้น จากการเกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลาทรายแดงในภาคใต้ของประเทศไทย สามารถกำหนดทำแนวทางในการอนุรักษ์ได้โดยการใช้พ่อแม่พันธุ์ของแต่ละฝั่งทะเลปล่อยเพื่อขยายพันธุ์ภายในฝั่งทะเลเดียวกันเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนทางพันธุกรรมและคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรม

ประวัติประชากร

จากการศึกษาประวัติประชากรพบว่าประชากรปลาทรายแดงในทะเลอันดามันเคยมีการขยายขนาดประชากร ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษา 4 วิธีได้แก่ (1) การทดสอบ mismatch distribution พบว่ายอมรับการเกิด sudden expansion model และมีรูปแบบการกระจายตัวแบบ unimodal ซึ่งยอมรับสมมติฐานของการทดสอบการขยายขนาดประชากร (2) การทดสอบ selective neutrality ด้วยวิธี neutrality test จากการทดสอบ Tajima's D test และ Fu's F_s test

พบว่า มีค่าติดลบซึ่งแสดงว่าประชากรเบี่ยงเบนไปจากประชากรสมมูล ซึ่งค่า D statistic ที่มีค่าติดลบบ่งบอกว่าประชากรกำลังถูกคัดเลือกโดยการคัดการกลายพันธุ์ที่ไม่เหมาะสมทิ้งไปหรืออาจกำลังมีการขยายขนาดประชากรเกิดขึ้น (Yang, 2006) และค่า F_s statistic ซึ่งเป็นค่าสถิติที่ใช้ทดสอบการขยายขนาดประชากรสำหรับเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เป็นนอกรีตคอมบินีชัน (Ramirez-Soriano et al., 2008) พบว่ามีค่าติดลบด้วยเช่นกัน จึงเป็นการยืนยันว่าประชากรปลาทรายแดงเคยมีการขยายขนาดประชากร (3) ค่าพารามิเตอร์ θ_1 มีค่ามากกว่า θ_0 ในทุกประชากรแสดงว่าประชากรที่มีความสามารถในการสืบพันธุ์ในเวลาปัจจุบันมีจำนวนมากกว่าจำนวนประชากรที่ผ่านมา ซึ่งบ่งบอกว่าประชากรเคยมีการขยายขนาดประชากร (4) แผนผังความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ พบว่าเป็นรูปแบบดาว (star like) ซึ่งพบได้ในประชากรที่เคยมีการขยายขนาดประชากร (Slatkin & Hudson, 1991) และจากแผนผังสามารถแบ่งกลุ่มประชากรตามสภาพภูมิศาสตร์เป็นประชากรฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งทะเลอ่าวไทยได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการเกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

เอกสารอ้างอิง

- Boore, J. L. (1999). Survey and summary animal mitochondria genome. **Nucleic acids research**. 27(8), 1767-1780.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G. & Thompson, D.(2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Research**. 31, 3497-3500.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**. 10, 564-567.
- Fishery Statistics Analysis and Research Group. 2017. **Fisheries Statistics of Thailand 2010, No. 5/2017**. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives. (in Thai)
- Fu, F.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**. 147, 915-925.

- Harpending, H.C. (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. **Human Biology**. 66, 591-600.
- Hastuti, K.S., Yonvitner, Y. & Boer, M. (2017). Indicator parameters population for the management of Threadfin Bream (*Nemipterus spp.*) in the inshore Java Sea, Indonesia. **International Research Journal of Applied and Basic Sciences**. 33(3), 35-51.
- Hung, K., Russell, B.C. & Chen, W. (2017). Molecular systematics of threadfin brems and relatives (Teleostei, Nemipteridae). **Zoologica scripta**. 46(5), 536-551.
- Janthawong, K., Ruksain, P., Supmee, V. & Suppapan, J. (2018). **Population genetic structure of Donkey croaker (*Pennahia anea*) in Southern Thailand**. Proceeding in The 6th Marine Science Conference, 18-20 June 2018 Chonburi, Thailand, pp : 583-593. (in Thai).
- Lewontin, R.C.(1974). **The genetic basis of evolutionary change**. New York: Columbia University Press.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**. 25, 1451-1452.
- Nei, M. (1987). **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press.
- Panithanarak, T., Karuwanchaoen, R., Na-Nakorn, U. & Nguyen, T. T.T. (2010). Population genetics of the Spotted seahorse (*Hippocampus kuda*) in Thai waters: Implications for conservation. **Zoological Studies**. 49(4), 564-576
- Panithanarak, T. (2017). Population genetic structure of marine organisms within the Gulf of Thailand. **Burapha Science Journal**. 22(3), 481-499. (in Thai)
- Ramirez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., Calafell, F. & Navarro, A. (2008). Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. **Genetics**. 179, 555-567.
- Russell, B.C., (1990). **FAO Species Catalogue**. Vol. 12. **Nemipterid fishes of the world. (Threadfin brems, whiptail brems, monocle brems, dwarf monocle brems, and coral brems), Family Nemipteridae**. An annotated and illustrated catalogue of nemipterid species known to date. FAO Fish. Synop. 125(12), 149.
- Slatkin, M. & Hudson, R. R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. **Genetics**. 129, 555-562.

- Sukumaran, S., Sebastian, W. & Gopalakrishnan, A. (2016). Population genetic structure of Indian oil sardine, *Sardinella longiceps* along Indian coast. **Gene**. 576, 372- 378.
- 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)
- Suppapan, J. (2015). Population genetic structure of Greenback Mullet (*Liza subviridis*) in Gulf of Thailand : Implication for conservation. **Phranakhon Rajabhat Research Journal**. 10 (1), 118-130. (in Thai)
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**. 123, 585–595.
- Wang, W., Ma, C., Chen, W., Zhang, H., Kang, W., Ni, Y. & Ma, L. (2017). Population genetic diversity of Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) from southeast coastal regions of China based on mitochondrial COI gene sequences. **Biochemical Systematics and Ecology**. 71, 114-120.
- Watterson, A. (1984). Allele frequencies after a bottleneck. **Theoretical Population Biology**. 26, 387-407.
- Wellington, G.M. & Victor, B.C. (1989). Planktonic larval duration of one hundred species of Pacific and Atlantic damselfishes (Pomacentridae). **Marine Biology**. 101(4), 557-567.
- Xu, Q., Liu, R. & Liu, Y. (2009). Genetic population structure of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the East China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 371, 121-129.
- Yang, Z. (2006). **Computational molecular evolution**. New York: Oxford University Press.
- Zhang, Y., Yang, F., Wang, Z., You, Q., Lou, B., Xu, D., Chen, R., Zhan, W. & Liu, F. (2017). Mitochondrial DNA variation and population genetic structure in the small yellow croaker at the coast of Yellow Sea and East China Sea. **Biochemical Systematics and Ecology**. 71, 236-243.

.....