

โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลากระบอก (*Liza subviridis*) ในอ่าวไทย
และแนวทางในการอนุรักษ์

POPULATION GENETIC STRUCTURE OF GREENBACK MULLET
(*Liza subviridis*) IN GULF OF THAILAND : IMPLICATION FOR CONSERVATION

จุฑามาศ ศุภพันธ์

คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช นครศรีธรรมราช 80280

Juthamas Suppapan

Faculty of Education, Nakhon si Thammarat Rajabhat University, Nakhon Si Thammarat, 80280

weedbeauty@yahoo.com

บทคัดย่อ

ศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของปลากระบอก (*Liza subviridis*) ในอ่าวไทยโดยวิเคราะห์จากความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียบริเวณคอนโทรลรีเจียนเก็บตัวอย่างจาก 7 จังหวัด คือ ปัตตานี สงขลา นครศรีธรรมราช เพชรบุรี สมุทรสงคราม ระยอง และตราด จำนวนทั้งหมด 147 ตัว พบว่ามีจำนวนแฮพลไทป์ทั้งหมด 38 แฮพลไทป์ประกอบไปด้วย shared haplotype 13 แฮพลไทป์และ rare haplotype 25 แฮพลไทป์การที่มีจำนวน rare haplotype จำนวนมากแสดงว่าประชากรปลากระบอกในอ่าวไทยมีจำนวนเพศเมียที่มีความสามารถในการ

ขยายพันธุ์เป็นจำนวนมาก ค่า haplotype diversity และ nucleotide diversity มีค่า 0.779 และ 0.065 ตามลำดับ จากการทดสอบ neutrality test พบว่าค่า Tajima's D และ Fu' Fs มีค่า -1.586 และ -10.031 และมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งเบี่ยงเบนไปจากสมดุล (neutral population) แสดงว่าประชากรปลากระบอกในอ่าวไทยเคยมีการขยายขนาดมาก่อน โดยจากการทดสอบ mismatch distribution พบว่า ประชากรน่าจะมีการขยายขนาดมาประมาณ 100,000 - 10,000 ปีที่ผ่านมา ในยุคไพลสโตซีนจนถึงยุคโฮโลซีน การทดสอบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี AMOVA พบว่าประชากรปลากระบอกในอ่าวไทยมีโครงสร้างทางพันธุกรรมเกิดขึ้น

แต่ไม่มีความแตกต่างของโครงสร้างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในอ่าวไทยตอนล่างกับอ่าวไทยตอนบน ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการจัดการปลากะบอกในอ่าวไทยได้

คำสำคัญ : ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ, คอนโทรลรีเจียน, ประวัติประชากร, ปลากะบอก

ABSTARCT

Population genetic structure and demographic history of the Greenback Mullet (*Liza subviridis*) living along the Thailand's Gulf coast was analysed based on the variation of the nucleotide sequence of mitochondrial DNA control region (mtDNA CR). The mtDNA CR sequences of 147 individual collecting from 7 sampling sites : Pattani, Songkhla, Nakorn Si Thammarat, Petchburi, Samut Songkram, Rayong and Trat province, were analyzed. A total of 38 haplotypes, consisting of 13 shared and 25 rare haplotypes, were identified. An excess of rare haplotypes indicated that the female effective population size of *L. subviridis* living in the Gulf of Thailand is large. Estimated values of haplotype

diversity and nucleotide diversity were 0.779 and 0.065, respectively. The results of neutrality tests, both Tajima's D and Fu's F_s statistics, yielded negative values (-1.586 and -10.031, respectively) and statistically significant deviation from the neutrality, indicating that the *L. subviridis* living in the Thailand's Gulf coast had experienced population expansion. Mismatch distribution analysis indicated that a possible expansion that would occur 100,000 - 10,000 years ago during Pleistocene to Holocene glaciations period. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed the genetic structure of the population living in Gulf of Thailand. But genetic structure was not differenced between lower and upper Gulf of Thailand. This study is necessary information contributing to efficient strategies to conserve this species in Gulf of Thailand.

Key words : mitochondrial DNA, Control region, Demographic history, Greenback Mullet

บทนำ

ปลากระบอก (*Liza subviridis*) เป็นปลาที่อาศัยตามแหล่งน้ำธรรมชาติที่น้ำทะเลเข้าถึงเช่นป่าชายเลนและบริเวณแม่น้ำที่ติดต่อกับทะเลตลอดจนบริเวณแนวชายฝั่ง ในฝั่งทะเลอ่าวไทยที่มีระยะทางยาวถึง 1,960 กิโลเมตร (Yanagi and Takao, 1998) จะพบการแพร่กระจายของปลากระบอกได้ตลอดแนวชายฝั่ง (ปิยะเทพ อวระกุล, 2553) ปลากระบอกเป็นปลาเศรษฐกิจที่นิยมบริโภคสด และแปรรูปเนื่องจากสามารถนำมาทำเป็นอาหารได้หลายชนิด จากข้อมูลทางสถิติประมงในปี พ.ศ. 2555 พบว่า การจับปลากระบอกในประเทศไทยในแต่ละปีมีปริมาณมากกว่า 6,000 ตันต่อปี (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติทางการประมง, 2555) จากการที่มีความต้องการบริโภคปลากระบอกเพิ่มมากขึ้นจึงควรมีแนวทางในการบริหารจัดการปลากระบอกเพื่อรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและสามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืน ซึ่งการจัดการดังกล่าวจำเป็นต้องมีข้อมูลทางพันธุศาสตร์ เช่น โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเพื่อใช้ในการจัดการแต่พบว่าข้อมูลดังกล่าวของปลากระบอกในอ่าวไทยยังไม่เคยมีมาก่อน

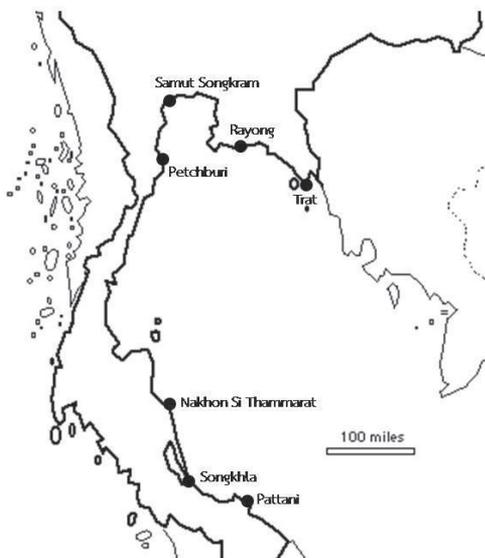
โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีน หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม การอพยพหรือการกลายพันธุ์ (Ayala, 1982; Slatkin, 1987) รูปแบบโครงสร้างพันธุศาสตร์

ประชากรจะบ่งบอกถึงความสามารถในการอยู่รอดที่สิ่งมีชีวิตสามารถปรับตัวให้เหมาะสมกับแหล่งที่อยู่โดยแสดงออกในรูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมกับกลุ่มประชากร (Tudela et al., 1999) ซึ่งสามารถนำข้อมูลโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรไปใช้ในการวางแผนจัดการทรัพยากรให้เหมาะสมกับแหล่งที่อยู่ได้ (Roldan et al., 2000) อีกทั้งยังสามารถใช้ระบุกลุ่มทางพันธุกรรม (genetic stock) ของประชากรในธรรมชาติจากแหล่งอาศัยต่าง ๆ เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร และประวัติประชากรของปลากระบอกในทะเลอ่าวไทย โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมคือลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียบริเวณคอนโทรลรีเจียน (control region) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมากกว่าบริเวณอื่นในไมโทคอนเดรีย 5 - 10 เท่า และสูงกว่าในยีนในนิวเคลียส 25 - 100 เท่า อีกทั้งมีการถ่ายทอดพันธุกรรมทางแม่ทำให้ไม่ต้องใช้ตัวอย่างในการศึกษามากเมื่อเทียบกับการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดอื่น (Boore, 1999) จึงเหมาะสมในการนำมาศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในประชากร (Ghivizzani et al., 1993 ; Douzery and Randi, 1997 ; Guo et al., 2011) ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการจัดการประชากรปลากระบอกในบริเวณฝั่งอ่าวไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพและยังคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรม

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและการสกัด ดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างปลากระบอกจากจังหวัดปัตตานี สงขลา นครศรีธรรมราช เพชรบุรี สมุทรสงคราม ระยอง และตราด รวมทั้งหมดจำนวน 147 ตัว (ภาพที่ 1, ตารางที่ 1) จากนั้นนำเนื้อปลา (muscle tissue) น้ำหนักประมาณ 20–30 มิลลิกรัม มาสกัด total genomic DNA ด้วยชุดสกัด Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN, BIOTECH CORP.)



ภาพที่ 1 บริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่าง

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณคอนโทรลจีโนมด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ 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' ในหลอดพีซีอาร์ประกอบด้วย 10X Taq buffer 5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 7.5 ไมโครลิตร, 2 mM dNTPs mix 4 ไมโครลิตร, 10 mM primer forward 2 ไมโครลิตร, 10 mM 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 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่อง Mastercycler, Eppendorf (Germany) เริ่มต้นโดยการแยกสายดีเอ็นเอ (initial denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที จากนั้นแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 40 วินาที, ลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิเพื่อต่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาทีรวมเป็นจำนวน 35 รอบ และใช้อุณหภูมิสุดท้ายเพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN, BIOTECH CORP.) จากนั้นส่งดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการ (1ST Base Laboratory, Malaysia)

3. การจัดการข้อมูลและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

3.1 การจัดการข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

เชื่อมต่อข้อมูลชิ้นส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม CAP3 software (Huang and Madan, 1999) ทำการ alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW version 2.0.12 (Larkin et al., 2007) แล้วปรับด้วยสายตาอีกครั้ง

3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยหาค่า nucleotide diversity (π ; Nei, 1987), haplotype diversity (h ; Nei, 1987) และค่า mean number of nucleotide differences ระหว่างแฮปโลไทป์ทั้งหมดด้วยโปรแกรม DnaSP version 5.00 (Librado and Rozas, 2009)

4. การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

4.1 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

วิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี analysis of molecular variance (AMOVA) เพื่อเปรียบเทียบระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรโดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations วิเคราะห์ค่า F - statistic ได้แก่ Φ_{CT} , Φ_{SC} และ Φ_{ST} ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations การวิเคราะห์แบบแรกแบ่งประชากรเป็น 7 กลุ่ม

ประชากรตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง (single region) ได้แก่ จังหวัดปัตตานี สงขลา นครศรีธรรมราช เพชรบุรี สมุทรสงคราม ระยอง และตราด การวิเคราะห์แบบที่สองแบ่งกลุ่มประชากรตามแนวเส้นละติจูด ได้แก่ อ่าวไทยตอนล่างประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดปัตตานี สงขลา และนครศรีธรรมราช และอ่าวไทยตอนบนประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสงคราม ระยอง และตราด

4.2 ระยะห่างทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรด้วยวิธี pairwise F_{ST} ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010)

5. การวิเคราะห์ประวัติประชากร

5.1 ทดสอบ neutrality test

วิเคราะห์ค่า Tajima's D (Tajima, 1989) และ Fu's F_s (Fu, 1997) เพื่อทดสอบการเบี่ยงเบนของประชากรจาก neutral population ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010)

5.2 ทดสอบ mismatch distribution

วิเคราะห์ mismatch distribution เพื่อศึกษาการขยายขนาดของประชากรภายใต้สมมติฐาน sudden expansion model โดยใช้ค่าทดสอบ Harpending Raggedness index (Harpending, 1994) และ sum of

squared deviations (SSD) เพื่อทดสอบ goodness - of - fit ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) ประเมินขนาดของประชากรด้วยพารามิเตอร์ θ_0 และ θ_1 เมื่อ θ_0 และ θ_1 เท่ากับ $2N\mu$ เมื่อ N คือค่า effective female population size

5.3 สร้าง minimum spanning tree (MSN)

สร้าง minimum spanning tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของแต่ละแฮพลไทป์โดยใช้ค่า mean number of pairwise differences ระหว่างแฮพลไทป์ด้วยโปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations

5.4 ทหาระยะเวลาในการขยายขนาดประชากร

หาเวลาในการขยายขนาดประชากร (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 20% per million year (Bowen and Grant, 1997)

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลากะบอก แต่ละตัวมีลำดับเบสตั้งแต่ 538 - 545 คู่เบส

มีตำแหน่ง align sites 531 ตำแหน่ง แบ่งเป็น monomorphic sites 401 ตำแหน่ง polymorphic sites 130 ตำแหน่ง (singleton variable site 11 ตำแหน่ง และ parsimony variable site 119 ตำแหน่ง) มีแฮพลไทป์ทั้งหมด 38 แฮพลไทป์ ประกอบไปด้วย แฮพลไทป์ที่เป็น shared haplotype จำนวน 13 แฮพลไทป์ โดยแบ่งเป็น แฮพลไทป์ที่เป็น shared haplotype ระหว่างประชากร 11 แฮพลไทป์ และ shared haplotype ภายในประชากร 2 แฮพลไทป์ โดยแฮพลไทป์ LS07 เป็น แฮพลไทป์เดียวที่มีสมาชิกจากทุกจังหวัด (ตารางที่ 2) โดยทุกกลุ่มประชากรมี rare haplotype รวมจำนวน 25 แฮพลไทป์ โดยจังหวัดระยองมี rare haplotype มากที่สุด 8 แฮพลไทป์ รองลงมา คือ จังหวัดปัตตานี 6 แฮพลไทป์ และจังหวัดสงขลา 5 แฮพลไทป์ สำหรับค่า haplotype diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.100 - 0.957 ส่วนค่า nucleotide diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.000 - 0.071 โดยค่า haplotype diversity ของประชากรทั้งหมด มีค่า 0.779 ± 0.035 และค่า nucleotide diversity ของประชากรทั้งหมดมีค่า 0.065 ± 0.004 สำหรับค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมได้แก่ จำนวนแฮพลไทป์, จำนวน polymorphic sites, haplotype diversity (h) และ nucleotide diversity (π) แสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม

Locality	Code	No.	No. haplotypes	No. polymorphic sites	Haplotype diversity (<i>h</i>)	Nucleotide diversity (π)
Pattani	PT	21	15	114	0.957 (0.000)	0.051 (0.045)
Songkhla	SK	22	12	116	0.896 (0.002)	0.065 (0.067)
Nakhon Si Thammarat	NS	21	5	84	0.424 (0.131)	0.028 (0.012)
Petchburi	PB	22	5	4	0.641 (0.070)	0.001 (0.002)
Samut Songkram	SM	20	2	1	0.100 (0.088)	0.000 (0.000)
Rayong	RY	21	13	83	0.914 (0.049)	0.071 (0.004)
Trat	TR	20	6	77	0.737 (0.068)	0.067 (0.041)
Total		147	38	130	0.779 (0.035)	0.065 (0.004)

หมายเหตุ : ค่าในวงเล็บคือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 2 การกระจายของแฮปโลไทป์ในแต่ละจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง

Haplotype	PT	SK	NS	PB	SM	RY	TR	Total
LS01	2	1	-	-	-	-	-	3
LS02	1	-	-	-	-	-	-	1
LS03	1	1	-	-	-	-	-	2
LS04	1	-	-	-	-	-	-	1
LS05	1	-	-	1	-	-	-	2
LS06	1	-	-	-	-	-	-	1
LS07	2	6	16	11	19	6	7	67
LS08	1	4	2	-	-	-	-	7
LS09	2	-	-	-	-	-	-	2
LS10	1	-	1	8	-	-	-	10
LS11	1	-	-	-	-	2	8	11
LS12	1	-	-	-	-	-	-	1
LS13	1	-	-	-	-	-	-	1
LS14	1	-	-	-	-	-	-	1
LS15	4	3	-	-	-	-	-	7
LS16	-	1	-	-	-	-	-	1
LS17	-	1	-	-	-	-	-	1
LS18	-	1	-	-	-	-	-	1
LS19	-	1	1	-	-	-	-	2
LS20	-	1	-	-	-	-	-	1
LS21	-	1	-	-	-	-	-	1
LS22	-	1	-	-	-	2	2	5
LS23	-	-	1	-	-	-	-	1
LS24	-	-	-	1	-	-	-	1

ตารางที่ 2 (ต่อ) การกระจายของแฮพลไทป์ในแต่ละจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง

Haplotype	PT	SK	NS	PB	SM	RY	TR	Total
LS25	-	-	-	1	-	-	-	1
LS26	-	-	-	-	1	-	-	1
LS27	-	-	-	-	-	1	-	1
LS28	-	-	-	-	-	1	-	1
LS29	-	-	-	-	-	1	-	1
LS30	-	-	-	-	-	1	-	1
LS31	-	-	-	-	-	1	-	1
LS32	-	-	-	-	-	1	-	1
LS33	-	-	-	-	-	1	-	1
LS34	-	-	-	-	-	1	-	1
LS35	-	-	-	-	-	2	-	2
LS36	-	-	-	-	-	1	1	2
LS37	-	-	-	-	-	-	1	1
LS38		-	-	-	-	-	1	1
Total	21	22	21	22	20	21	20	147

หมายเหตุ : อักษรย่อ คือ จังหวัดที่เก็บตัวอย่างซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 1

2. โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร
จากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรเมื่อวิเคราะห์โดยแบ่งกลุ่มประชากรออกเป็นประชากร 7 ประชากรตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่างพบว่ามีความแตกต่างโดยมีค่า $\Phi_{ST} = 0.417$ ($p = 0.000$) และประชากรมีความแปรปรวนภายใน 58.22 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) เมื่อวิเคราะห์โดยแบ่งกลุ่มประชากรเป็น 2 ประชากรคืออ่าวไทยตอนล่างและอ่าวไทยตอนบนพบว่าไม่มีความ

แตกต่างโดยมีค่า $\Phi_{CT} = 0.151$ ($p = 0.111$) และประชากรมีความแปรปรวนภายใน 54.45 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ผลการวิเคราะห์ค่า pairwise F_{ST} พบว่าประชากรของทุกกลุ่มประชากรมีความแตกต่างกันยกเว้นประชากรระหว่างจังหวัดปัตตานีกับจังหวัดสงขลา, จังหวัดเพชรบุรีกับจังหวัดตราด และจังหวัดสมุทรสงครามกับจังหวัดระยองที่ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยวิธี AMOVA

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	p - value
1) Single region					
Among populations	6	1039.665	7.739 Va	41.78	$\Phi_{ST} = 0.417^*$
Within populations	140	1509.968	10.785 Vb	58.22	
Total	146	2549.633	18.524		
2) Lower and Upper Gulf of Thailand					
Among groups	1	355.103	3.008 Va	15.19	$\Phi_{CT} = 0.151$
Among populations within groups	5	684.562	6.013 Vb	30.36	$\Phi_{SC} = 0.357^*$
Within populations	140	1509.968	10.785 Vc	54.45	$\Phi_{ST} = 0.455^*$
Total	146	2549.633	19.807		

หมายเหตุ : * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 ค่า pairwise F_{ST}

	PT	SK	NS	PB	SM	RY	TR
PT	-						
SK	-0.024	-					
NS	0.682*	0.558*	-				
PB	0.678*	0.552*	0.202*	-			
SM	0.397*	0.288*	0.438*	0.429*	-		
RY	0.440*	0.339*	0.579*	0.572*	-0.015	-	
TR	0.491*	0.364*	0.071*	0.062	0.301*	0.439*	-

หมายเหตุ : * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)
อักษรย่อคือจังหวัดที่เก็บตัวอย่างซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 1

3. ประวัติประชากร

จากการทดสอบการเบี่ยงเบนไปจาก neutral population พบว่าค่า D statistic มีค่า - 1.586 ($p = 0.008$) และค่า F_s statistic มีค่า - 10.031 ($p = 0.009$) ซึ่งเบี่ยงเบนไปจาก neutral population สำหรับการทดสอบ mismatch distribution พบว่าสอดคล้องกับ sudden expansion model โดยค่า SSD มีค่า 0.065 ($p = 0.236$) และค่า Harpending Raggedness index มีค่า 0.036 ($p = 0.725$) ค่าพารามิเตอร์ θ_1 มีค่ามากกว่า θ_0 ในทุกจังหวัดแสดงว่าประชากรกำลังมีการขยายขนาดประชากร (ตารางที่ 5) เมื่อคำนวณระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรพบว่าประชากรมีการขยายขนาดมาประมาณ 100,000 - 10,000 ปีที่ผ่านมาจากการวิเคราะห์

ความสัมพันธ์ของแต่ละแฮพลไทป์พบว่าเป็นแบบซับซ้อน (complicated MSN) ไม่สามารถแบ่งแยกกลุ่มประชากรตามสภาพภูมิศาสตร์ได้ แต่สามารถแบ่งกลุ่มของแฮพลไทป์ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่หนึ่งมีรูปแบบเป็น star-like network โดยมีการเชื่อมต่อของแต่ละแฮพลไทป์เป็นแบบ short genealogy โดยมี common haplotype คือ LS07 ซึ่งมีสมาชิกมาจากทุกจังหวัดคือจังหวัดปัตตานี สงขลา นครศรีธรรมราช เพชรบุรี สมุทรสงคราม ระยอง และตราด โดยกลุ่มที่หนึ่งเชื่อมต่อกับกลุ่มที่สองด้วยการกลายพันธุ์จำนวน 5 mutation step กลุ่มที่สองมีลักษณะแบบ long genealogy โดยมี common haplotype คือ LS08 ซึ่งมีสมาชิกมาจากจังหวัดในกลุ่มภาคใต้ คือ จังหวัดปัตตานี สงขลา และ

นครศรีธรรมราช กลุ่มที่ 3 มีลักษณะแบบ star - like network มีการเชื่อมต่อของแต่ละแฮพลไทป์เป็นแบบ short genealogy โดยมี แฮพลไทป์ LS22 เป็น common

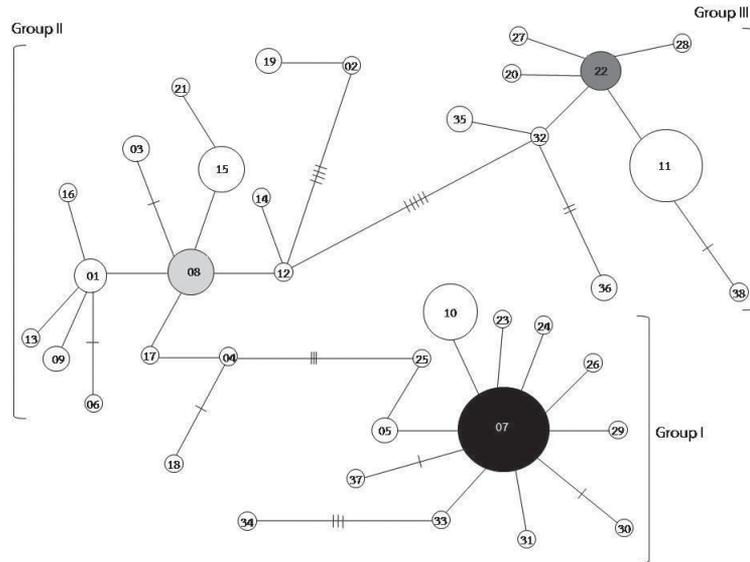
haplotype ซึ่งมีสมาชิกมาจากจังหวัดสงขลา ระยองและตราด โดยกลุ่มที่สองและกลุ่มที่สามเชื่อมต่อกันด้วยการกลายพันธุ์จำนวน 6 mutation step (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากร

Locality	Tajima's D	Fu's FS	τ	θ_0	θ_1	SSD	Raggedness	Expansion time (year ago)
PT	-0.523*	-1.186*	1.2	3.121	99999.000	0.058	0.037	10,791
SK	0.384	-6.242*	5.7	0.000	61.909	0.065*	0.032*	51,258
NS	-1.413*	-12.051*	3.2	0.485	0.581	0.046	0.252	28,776
PB	-0.658*	-1.445*	1.0	0.000	99999.000	0.016	0.152	8,992
SM	-1.164*	-0.879*	3.0	0.000	0.117	0.000	0.650	26,978
RY	-2.674*	-4.566*	12.5	0.000	6.874	0.069	0.032	112,410
TR	-2.706*	-17.510*	11.7	0.000	3.158	0.174*	0.317	105,215
Total	-1.586*	-10.031*	10.7	0.003	3.809	0.065	0.036	97,726

หมายเหตุ : * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

อักษรย่อคือจังหวัดที่เก็บตัวอย่างซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 1



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ (minimum spanning network)

หมายเหตุ : ขนาดวงกลมแสดงตามสัดส่วนของจำนวนสมาชิกในแต่ละแฮพลไทป์, รายละเอียดสมาชิกในแต่ละแฮพลไทป์แสดงในตารางที่ 2, วงกลมที่แรเงา คือ common haplotype ของแต่ละกลุ่ม, หมายเลขในวงกลมคือชื่อแฮพลไทป์, เส้นที่เชื่อมระหว่าง แฮพลไทป์ และ เส้นที่ขีดคั่นคือจำนวนครั้งของการเกิด mutation step

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากแฮพลไทป์จำนวน 38 แฮพลไทป์ พบว่ามี rare haplotype จำนวน 25 แฮพลไทป์ และเป็นแฮพลไทป์เฉพาะของแต่ละจังหวัด ซึ่งแสดงว่าปลากะบอกในอ่าวไทยยังคงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และจากการที่มีจำนวนของ rare haplotype จำนวนมาก ในประชากรแสดงว่าประชากรปลากะบอกในอ่าวไทย มีปลากะบอกเพศเมียที่มีความสามารถในการขยายพันธุ์เป็นจำนวนมาก

จึงทำให้มีจำนวนแฮพลไทป์ที่มีความแตกต่างกันเป็นจำนวนมาก (Lewontin, 1974) สอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลากะบอก grey mullet (*Mugill cephalus*) ที่พบว่ามีจำนวน rare haplotype เป็นจำนวนมากเช่นเดียวกัน (Liu et al., 2009 : Livi et al., 2011) และการที่ทุกกลุ่มประชากรในแต่ละจังหวัด มี rare haplotype เฉพาะท้องถิ่นนั้นสามารถใช้ระบุแหล่งที่มาของสายพันธุ์หรือแหล่งทางพันธุกรรม (genetic stock) ของ

ปลากระบอกได้เนื่องจากจะมีความจำเพาะเจาะจงกับแหล่งที่อยู่ (Xu et al., 2009) สำหรับค่า haplotype diversity ที่มีค่าสูง ในขณะที่ค่า nucleotide diversity มีค่าต่ำ แสดงว่าประชากรกำลังมีการขยายขนาด (population expansion) โดยสาเหตุเกิดจากการที่ประชากรกำลังเริ่มมีการกลายพันธุ์เรื่อย ๆ ตามระยะเวลาที่ผ่านมา (Avisé et al., 1984; Rogers, 1995) ซึ่งลักษณะแบบนี้สามารถพบได้ในสัตว์ทะเลที่อาศัยบริเวณชายฝั่งทะเล เช่น กุ้ง fleshy shrimp (Kong et al., 2010) และปูก้ามดาบ (*Uca sindensis*) (Shih et al., 2015) เป็นต้น

2. โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่าประชากรปลากระบอกในทะเลอ่าวไทยมีความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยเฉพาะประชากรจากจังหวัดในอ่าวไทยตอนล่างทุกจังหวัดมีความแตกต่างกับประชากรในอ่าวไทยตอนบนทุกจังหวัดซึ่งแสดงให้เห็นว่าปัจจัยจากระยะทางที่อยู่ห่างกันมากน่าจะส่งผลในการขัดขวางการผสมพันธุ์ระหว่างประชากร ซึ่งจะเป็นการขัดขวางการแลกเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างประชากรด้วย ส่วนประชากรที่ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมพบว่าเป็นกลุ่มของประชากรในจังหวัดที่มีระยะห่างระหว่างประชากรไม่มาก ได้แก่ อ่าวไทยตอนล่าง คือ จังหวัดปัตตานีกับสงขลา อ่าวไทยตอนบน ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรีกับจังหวัดตราด และจังหวัดสมุทรสงครามกับจังหวัดระยอง ซึ่งเป็นการยืนยันว่าปัจจัยจากระยะทางน่าจะส่งผลต่อความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลา

กระบอกในทะเลอ่าวไทย อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมโดยการแบ่งประชากรออกเป็นสองกลุ่มจากรวมประชากรของทุกจังหวัดในอ่าวไทยตอนล่าง และจังหวัดในอ่าวไทยตอนบนเข้าด้วยกันพบว่าไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมซึ่งอาจเป็นเพราะเมื่อมีการรวมกลุ่มของประชากรทำให้รูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมเปลี่ยนไป และการที่พื้นที่ที่ทำการรวมกลุ่มใหม่มีขนาดเพิ่มขึ้นทำให้ระยะทางระหว่างสองกลุ่มประชากรลดลง อีกทั้งตำแหน่งที่ตั้งของถิ่นอาศัยยังอยู่ในเขตทะเลเดียวกันจึงทำให้ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปูแสมก้ามม่วง (*Episesarma mederi*) ในอ่าวไทย (Supmee et al., 2012) ซึ่งเป็นปูที่อาศัยในเขตป่าชายเลน และมีรูปแบบของการแพร่กระจายของตัวอ่อน (larva dispersion) แบบเดียวกับปลากระบอก และพบว่าไม่มีความแตกต่างของโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรระหว่างอ่าวไทยตอนล่างและอ่าวไทยตอนบนเช่นเดียวกัน

3. ประวัติประชากร

จากการทดสอบ neutrality test พบว่าค่า Tajima's *D* มีค่าเบี่ยงเบนไปจาก neutral state โดยมีค่าติดลบแสดงว่าประชากรน่าจะเกิดการคัดเลือกแบบ purifying selection หรืออาจเกิดการขยายขนาดของประชากรมาก่อน (Yang, 2006) อีกทั้งพบว่าค่า Fu's *F_s* ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการขยายขนาดของประชากร (Ramirez - Soriano et al., 2008) มีค่าติดลบด้วย เช่น

กันจึงเป็นการยืนยันว่าประชากรปลากระบอก น่าจะเคยมีการขยายขนาดประชากรมาก่อน สอดคล้องกับผลการทดสอบด้วยการวิเคราะห์ วิธี mismatch distribution ที่สอดคล้อง กับสมมติฐาน sudden expansion model และยังสามารถสอดคล้องกับค่า θ_1 ซึ่งมีค่ามากกว่า θ_0 ในทุกกลุ่มประชากรแสดงว่าประชากรกำลัง มีการขยายขนาดประชากรจากขนาดเล็กสู่ ขนาดใหญ่ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ แอสโทโลไทป์พบว่าไม่สามารถแบ่งกลุ่มประชากร ตามสภาพภูมิศาสตร์ได้อย่างชัดเจนสอดคล้อง กับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี AMOVA ที่พบว่า ไม่เกิดโครงสร้างของประชากรระหว่างอ่าวไทย ตอนล่างและอ่าวไทยตอนบนแต่พบว่าสามารถ แบ่งกลุ่มตามแอสโทโลไทป์ออกได้เป็น 3 กลุ่ม โดยพบว่ากลุ่มที่หนึ่งน่าจะมีการขยายขนาด ประชากรมาเมื่อไม่นานมานี้เนื่องจากลักษณะ ของการเชื่อมต่อระหว่างแอสโทโลไทป์เป็นแบบ short genealogy และมีรูปร่างเป็นแบบ star-like network สำหรับกลุ่มที่สอง และ กลุ่มที่สามมีการเชื่อมต่อของแอสโทโลไทป์เป็น แบบ long genealogy ซึ่งแสดงว่าประชากร ในสองกลุ่มนี้น่าจะมีการขยายขนาดประชากร มานาน สอดคล้องกับค่าพารามิเตอร์ τ ของ ประชากรจากจังหวัดระยองและตราดส่วนใหญ่ จะอยู่ในกลุ่มที่สามจะมีค่ามากที่สุด ในขณะที่ จังหวัดอื่นมีค่าลดลงเรื่อยๆแสดงว่าประชากร เริ่มมีการขยายขนาดมานานโดยเริ่มจากอ่าวไทย ตอนบนสู่อ่าวไทยตอนล่าง และเมื่อคำนวณ ระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรพบว่ามีการขยายขนาดประชากรเมื่อประมาณ 100,000 - 10,000 ปีที่ผ่านมาสอดคล้องกับ

รายงานของ Sinsakul (2000) ที่รายงานว่า ชายฝั่งทะเลในประเทศไทยเริ่มกำเนิดในยุค ไพลสโตซีน (Pleistocene) ประมาณ 125,000 ปีที่ผ่านมา โดยในช่วงนี้ระดับน้ำทะเลจะ ท่วมสูงเนื่องมาจากการละลายของน้ำแข็ง จากขั้วโลก หลังจากนั้นระดับน้ำทะเลจะเริ่ม ลดระดับลงเรื่อย ๆ จนเข้าสู่ยุคโฮโลซีน (Holocene) ประมาณ 10,000 ปีที่ผ่านมา ซึ่งในช่วงนี้เริ่มมีการทับถมของตะกอนเกิดขึ้น เป็นพื้นที่ชายฝั่ง และกลายเป็นแหล่งที่อยู่ของ ปลากระบอก เช่น ป่าชายเลน ดังนั้นอาจกล่าว ได้ว่าประชากรปลากระบอกในอ่าวไทยน่าจะมี การขยายขนาดเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของแหล่ง ที่อยู่

4. แนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากการที่มีความแตกต่างของโครงสร้าง ประชากรปลากระบอกแสดงให้เห็นว่าประชากร ในแต่ละจังหวัดมีรูปแบบของความหลากหลาย ทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันดังนั้นแนวทาง ในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถทำได้โดยการใช้แม่พันธุ์ของแต่ละพื้นที่ ปล่อยปลาลงสู่ธรรมชาติเพื่อขยายพันธุ์ภายใน ประชากรเดียวกันเพื่อคงไว้ซึ่งความหลากหลาย ทางพันธุกรรมเอาไว้ และจากผลการทดลอง ที่พบว่า ประชากรปลากระบอกในฝั่งอ่าวไทย กำลังมีการขยายขนาดประชากรอยู่นั้นวิธีที่ สามารถจัดการคือการรักษาถิ่นที่อยู่ตาม ธรรมชาติเอาไว้โดยการไม่ทำลายแหล่งที่อยู่ หรืออาจจัดการโดยการเพิ่มขนาดของแหล่ง ที่อยู่ เช่น การเพิ่มพื้นที่ป่าชายเลนให้มากขึ้น เพื่อรองรับการขยายขนาดประชากร และ

ไม่ควรจับปลาตัวเมียที่กำลังวางไข่เนื่องจากเป็นการขัดขวางการขยายขนาดประชากรสำหรับการนำแม่พันธุ์เพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงหรือใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ควรใช้แม่พันธุ์จากจังหวัดปัตตานี สงขลา และระยอง เนื่องจากมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ทำให้สามารถคัดเลือกแฮปโลไทป์ที่เหมาะสมเพื่อนำมาปรับปรุงพันธุ์ได้มากที่สุด สำหรับจังหวัดสมุทรสงครามซึ่งพบว่ามีภาวะเสี่ยงเนื่องจากมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยที่สุดควรมีการจัดการเพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมเช่น การใช้แม่พันธุ์จากจังหวัดระยองซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงอีกทั้งไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับปลาระบอบอกในจังหวัดสมุทรสงครามมาปล่อยในแหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งจะทำให้เพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมได้

สรุป

1. ประชากรปลาระบอบอกในอ่าวไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง
2. ไม่มีความแตกต่างของโครงสร้างทางพันธุกรรมของปลาระบอบอกในอ่าวไทยตอนล่างและอ่าวไทยตอนบนแต่พบความแตกต่างของโครงสร้างทางพันธุกรรมเมื่อวิเคราะห์ในระดับจังหวัด
3. ประชากรปลาระบอบอกในอ่าวไทยกำลังมีการขยายขนาดประชากร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. (2555). สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2553. เอกสารฉบับที่ 12/2555. กรุงเทพฯ : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ปิยะเทพ อวาทกุล. (2553). *ปลาวัวประชากรปลาระบอบอกดำ (Chelon subviridis Valenciennes, 1836) ในอ่าวปากน้ำจังหวัดนครศรีธรรมราช*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขา วิทยาศาสตร์การประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Awise, J.C., Neigel, J.E. and Arnold, J. (1984). Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*. 20, 99 - 105.
- Ayala, F.J. (1982). *Population and Evolutionary Genetics : A Primer*. The Benjamin Cummings Pub. Co. Inc, California.
- Boore, J.L. (1999). Survey and summary animal mitochondria genome. *Nucleic acids research*. 27(8), 1767 - 1780.

- Bowen, B. and Grant, W. (1997). Phylogeography of the sardines (*Sardinops* spp.) : Assessing Biogeographic models and population histories in temperate upwelling zones. **Evolution**. 51, 1601 - 1610.
- Douzery, E. and Randi, E. (1997). The mitochondrial control region of Cervidae evolutionary patterns and phylogenetic content. **Molecular Biology and Evolution**. 14, 1154 - 1166.
- 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. **Molecular Ecology Resources**. 10, 564 - 567.
- Fu, F.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**. 147, 915 - 925.
- Ghivizzani, S., MacKay, L.D., Madsen, C.S., Laipis, P.J. and Hauswirth, W.W. (1993). Transcribed heteroplasmic repeats sequences in the porcine mitochondrial DNA D-loop region. **Journal of Molecular Evolution**. 37, 36 - 47.
- Guo, E., Li, X., Liu, Y., Cheng, Y. and Wu, C.X. (2011). Genetic variation and population structure of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) inferred from mitochondrial control region. **Molecular Biology Reports**. doi 10.1007/s11033 - 011 - 0882 - 3.
- Harpending, R.C. (1994). Signature of ancient population growth in a low - resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. **Human Biology**. 66, 591 - 600.
- Huang, X. and Madan, A. (1999). CAP3 : a DNA sequence assembly program. **Genome Research**. 9, 868 - 877.
- Kong, X.Y., Li, Y. L. and Kong, W.S.J. (2010). Genetic variation and evolutionary demography of *Fenneropenaeus chinensis* populations, as revealed by the analysis of mitochondrial control region sequences. **Genetics and Molecular Biology**. 33(2), 379 - 389.
- 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.
- Lewontin, R.C.(1974). **The genetic basis of evolutionary change.** Columbia University Press, New York. 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. **Biochemical Systematics and Ecology.** 37, 556 - 566.
- Livi, S., Sola, L. and Crosetti, D. (2011). Phylogeographic relationships among worldwide populations of the cosmopolitan marine species, the striped gray mullet (*Mugil cephalus*), investigated by partial cytochrome b gene sequences. **Biochemical Systematics and Ecology.** 39, 121 - 131.
- Nei, M. (1987). **Molecular Evolutionary Genetics.** New York : Columbia University Press. Ramirez - Soriano A., Ramos - Onsins, S.E., Rozas, J.F. and Navarro, A. (2008). Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. **Genetics.** 179, 555 - 567.
- Roldan, M.I., Perrotta, M., Cortey, R.G. and Pla, C. (2000). Molecular and morphologic approaches to discrimination of variability patterns in chub mackerel, *Scomber japonicus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.** 253, 63 - 74.
- Rogers, A.R. (1995). Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. **Evolution.** 49, 608 - 615.
- Shih, H., Saher, N. U., Kamrani, E., Ng, P.K., Lai, Y. and Liu, M. (2015). Population genetics of the fiddler crab *Uca sindensis* (Alcock, 1900) (Crustacea : Brachyura : Ocypodidae) from the Arabian Sea. **Zoological Studies.** 54, 1 doi 10.1186/s40555 - 014 - 0078 - 3.

- Sinsakul, S. (2000). Late Quaternary geology of the Lower Central Plain, Thailand. *Journal of Southeast Asian. Earth Science*. 18, 415 - 426.
- Slatkin, M. (1987). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*. 39(1), 53 - 65.
- Supmee, V., Ngernsiri L., Swatdipong A., Wonnapijij, P., Sangthong, D. and Sangthong, P. (2012). A single population of Thai vinegar crab (*Episesarma mederi*) living in the Gulf of Thailand. In **Proceeding of the 38th Congress on Science and Technology of Thailand (STT38)**. 17 - 19 October 2012. Chiang Mai, Thailand.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123, 585 - 595.
- Tudela, S., Garcya-Marynn, J.L. and Pla, C. (1999). Genetic structure of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*, in the north - west Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 234, 95 - 109.
- 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. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 371, 121 - 129.
- Yanagi, T. and Takao, T. (1998). Seasonal variation of three dimensional circulations in the Gulf of Thailand. *La mer*. 36, 43 - 55.