

โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของปลาตะกรับ
(*Scatophagus argus*) ในภาคใต้ของประเทศไทย

POPULATION GENETIC STRUCTURE AND DEMOGRAPHIC HISTORY OF SPOTTED
SCAT (*Scatophagus argus*) IN SOUTHERN OF THAILAND

วีระเกียรติ ทรัพย์มี

สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย จ.นครศรีธรรมราช 80110

Verakiat Supmee

Department of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of technology Srivijaya,

Nakhon Si Thammarat 80110

audy422r@yahoo.com

บทคัดย่อ

ศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของปลาตะกรับ (*Scatophagus argus*) ในภาคใต้ของประเทศไทย โดยวิเคราะห์จากความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียบริเวณคอนโทรลรีเจียนขนาด 611 คู่เบส เก็บตัวอย่างจากชายฝั่งทะเลภาคใต้ฝั่งตะวันออกจำนวน 3 จังหวัดคือปัตตานี สงขลา และนครศรีธรรมราช และฝั่งตะวันตกจำนวน 3 จังหวัด คือ จังหวัดสตูล กระบี่ และพังงา จำนวน 100 ตัว พบว่ามีแฮพลไทป์ทั้งหมด 56 แฮพลไทป์ ประกอบด้วย shared haplotype 6 แฮพลไทป์ และ rare haplotype 50 แฮพลไทป์ ค่า haplotype diversity และ nucleotide diversity มีค่า 0.933 และ 0.011 ตามลำดับ จากการทดสอบ neutrality test พบว่าค่า Tajima's *D* และ Fu' *F_s* มีค่า -1.710 และ -25.005 และมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเบี่ยงเบนไปจากค่าคาดหวังตาม neutral evolution ในทิศทางที่แสดงว่าประชากรปลาตะกรับในภาคใต้เคยมีการขยายขนาดประชากร การทดสอบ mismatch distribution พบว่าประชากรน่าจะมีการขยายขนาดมาประมาณ 270,000 ปีที่ผ่านมาในยุคไพลสโตซีน การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรพบว่ามี ความแตกต่างระหว่างประชากรปลาตะกรับจากฝั่งทะเลตะวันออกและฝั่งทะเลตะวันตก ซึ่งน่าจะแสดงให้เห็นว่ามีปัจจัยที่ขัดขวางการผสมพันธุ์ระหว่างถิ่นอาศัย 2 บริเวณดังกล่าวจนทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมขึ้น ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการจัดการปลาตะกรับในเขตภาคใต้ได้

คำสำคัญ : คอนโทรลรีเจียน โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร ประวัติประชากร ปลาตะกรับ

ABSTRACT

Population genetic structure and demographic history of the Spotted scat (*Scatophagus argus*) in Southern of Thailand was investigated. Intraspecific variation was determined from partial sequences of mtDNA CR with a size of 611 bp. Sequences of 100 individuals from Eastern coast (Pattani, Songkhla and Nakhon Si Thammarat provinces) and Western coast (Satun, Krabi and Phang Nga province) were analyzed. A total of 56 haplotypes, consisting of 6 shared and 50 rare haplotypes, were identified. Estimated values of haplotype diversity and nucleotide diversity were 0.933 and 0.011, respectively. The results of neutrality tests, both Tajima's *D* and Fu's *F_s* statistics, yielded negative values (-1.710 and -25.005, respectively), which were statistically significant deviation from the neutrality, indicating that the *S. argus* in Southern of Thailand had experienced population expansion. Mismatch distribution analysis indicated that a possible expansion that may occur 270,000 years ago during the Pleistocene glaciations period. The AMOVA analysis also revealed genetic differentiation of *S. argus* between the Eastern and Western coast populations, suggesting the existence of a barrier to reproductive strategy between these two area. This study are necessary information contributing to efficient strategies to conserve this species in Southern of Thailand.

Keywords: Control region, Population genetic structure, Demographic history, Spotted scat

บทนำ

ปลาตะกรับ (*Scatophagus argus*) เป็นปลาน้ำกร่อยที่นิยมบริโภคในภาคใต้ โดยนำมาแกงเห็ดหรือแกงส้ม นอกจากนั้นยังสามารถนำมาปรับเลี้ยงในน้ำจืดเพื่อเลี้ยงเป็นปลาสวยงามได้ ปัจจุบันพบว่าปริมาณปลาตะกรับในแหล่งน้ำธรรมชาติมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากการจับจนเกินกำลังการผลิตและความเสื่อมโทรมของแหล่งน้ำ จึงเริ่มมี

การตระหนักและมีการศึกษาเกี่ยวกับปลาตะกรับมากขึ้น เช่น การเพาะพันธุ์ การอนุบาล และการเพาะเลี้ยง รวมถึงการรณรงค์ให้มีการอนุรักษ์แหล่งที่อยู่ของปลาตะกรับ ซึ่งจำเป็นต้องใช้ความรู้ทางวิชาการหลายสาขามาบูรณาการร่วมกัน ข้อมูลทางพันธุกรรมเป็นข้อมูลที่สำคัญในการวางแผนจัดการ โดยเฉพาะข้อมูลทางพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากร แต่พบว่าการศึกษาดังกล่าว

ในปลาตะกรับยังไม่เคยมีมาก่อน วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของปลาตะกรับในภาคใต้ของประเทศไทยโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียบริเวณคอนโทรลรีเจียน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอัตราการกลายพันธุ์สูง จึงเหมาะสมในการนำมาศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในประชากร นอกจากนี้ยังมีการถ่ายทอดพันธุกรรมทางแม่ ซึ่งสามารถใช้ประชากรจำนวนน้อยเพื่อการศึกษาได้ อีกทั้งไม่เกิดรีคอมบิเนชัน ทำให้ศึกษาแบบแผนการถ่ายทอดได้โดยตรง (Boore, 1999) ผลการศึกษานี้สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปเป็นแนวทางในการจัดการประชากรปลาตะกรับในธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืนซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรม

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ เก็บตัวอย่างปลาตะกรับในภาคใต้จากทะเลฝั่งตะวันออก ได้แก่ จังหวัดปัตตานี สงขลา และนครศรีธรรมราช และทะเลฝั่งตะวันตก ได้แก่ จังหวัดสตูล กระบี่ และพังงา รวมทั้งหมดจำนวน 100 ตัว (ภาพที่ 1, ตารางที่ 1) จากนั้นนำเนื้อเยื่อน้ำหนักประมาณ 30 มิลลิกรัม มาสกัด genomic DNA ด้วยชุดสกัด Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN, BIOTECH CORP.) ตามวิธีและขั้นตอนของบริษัท



ภาพที่ 1 แหล่งเก็บตัวอย่างปลาตะกรับ ตามแนวชายฝั่งภาคใต้ และกลุ่มพันธุกรรมจากข้อมูลไมโทคอนเดรียบริเวณคอนโทรลรีเจียนแยกเป็นรายจังหวัด

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ใช้ไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณคอนโทรลรีเจียน คือ SACR_H1 5'- TCA AAG AGA AGG GAT TTT AAC CC 3' และ SACR_L1 5'- GAC CAA ACT TTT GTG CTT ACG GA 3' เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดพีซีอาร์ ประกอบด้วย 10X Taq buffer 5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 7.5 ไมโครลิตร, 2 mM dNTPs mix 4 ไมโครลิตร, 10 μ M primer forward 2 ไมโครลิตร, 10 μ M primer reverse 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (ThermoSCIENTIFIC, USA) 0.5 ไมโครลิตร (2.5 unit), DNA template 5 ไมโครลิตร (50-100 ng) และ ultrapure water 24 ไมโครลิตร รวมปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่อง Mastercycler, Eppendorf (Germany) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที

อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 จำนวน 35
รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส
นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบ
ผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสใน
เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ นำผลผลิตที่ได้ทำให้
บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR Purification Mini Kit
(FAVORGEN, BIOTECH CORP.) ตามที่บริษัท
แนะนำ แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วย
บริการ (1ST Base Laboratory, (Malaysia))

3. การจัดการข้อมูลและการวิเคราะห์ ความหลากหลายทางพันธุกรรม

3.1 การจัดการข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์

เชื่อมต่อข้อมูลชิ้นส่วนลำดับ
นิวคลีโอไทด์ส่วน 5' และ 3' ของแต่ละตัวอย่าง
ด้วยโปรแกรม CAP3 software (Huang and
Madan. 1999) ทำการ alignment ด้วย
โปรแกรม ClustalW version 2.0.12 (Larkin
et al., 2007) แล้วปรับด้วยสายตาอีกครั้ง

3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลาย ทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ความหลากหลายทาง
พันธุกรรมโดยหาค่า nucleotide diversity (π ;
Nei, 1987), haplotype diversity (h ; Nei,
1987) และค่า mean number of nucleotide
differences ระหว่างแฮปโลไทป์ทั้งหมดด้วย
โปรแกรม DnaSP version 5.00 (Librado and
Rozas. 2009)

4. การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ ประชากร

4.1 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร วิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์

ประชากรด้วยวิธี analysis of molecular
variance (AMOVA) เพื่อเปรียบเทียบระดับ
ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและ
ระหว่างประชากรโดยใช้โปรแกรม 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 การ
วิเคราะห์แบบแรกแบ่งประชากรเป็น 6 กลุ่ม
ตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง (single region)
ได้แก่ จังหวัดปัตตานี สงขลา นครศรีธรรมราช
สตูล กระบี่ และพังงา การวิเคราะห์แบบที่สอง
แบ่งกลุ่มประชากรตามสภาพภูมิศาสตร์ชายฝั่ง
ที่แบ่งแยกด้วยคาบสมุทรมาเลย์ ได้แก่ ทะเลฝั่ง
ตะวันออกประกอบด้วย จังหวัดปัตตานี สงขลา
และนครศรีธรรมราช และทะเลฝั่งตะวันตก
ประกอบด้วย จังหวัดสตูล กระบี่ และพังงา

4.2 ระยะห่างทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ระยะห่างทาง
พันธุกรรมระหว่างประชากรด้วยวิธี pairwise
 F_{ST} ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดย
ใช้โปรแกรม 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 evolution 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 สร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogeny)

สร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogeny) ของแต่ละแฮพลไทป์โดยใช้ Neighbor-joining ด้วยวิธี kimura-2-parameter ทำ 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007)

5.5 ทหาระยะเวลาในการขยายขนาดประชากร

หาเวลาในการขยายขนาดประชากร (t) โดยใช้สูตร $t = \tau/2\mu$ เมื่อ τ คือ expansion time และ $2\mu = \mu \times \text{generation time} \times \text{number of bases}$ เมื่อค่า μ คือค่า mutation rate และมีค่าเท่ากับ 3.6% per million year (Henriques et al., 2014)

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาตะกรับแต่ละตัวมีลำดับเบสตั้งแต่ 587 – 590 คู่เบส มีตำแหน่ง align sites 531 ตำแหน่ง แบ่งเป็น monomorphic sites 517 ตำแหน่ง polymorphic sites 73 ตำแหน่ง (singleton variable site 31 ตำแหน่ง และ parsimony variable site 42 ตำแหน่ง) มีแฮพลไทป์ทั้งหมด 56 แฮพลไทป์ ประกอบไปด้วยแฮพลไทป์ที่เป็น shared haplotype จำนวน 6 แฮพลไทป์โดยแบ่งเป็นแฮพลไทป์ที่เป็น shared haplotype ระหว่างประชากร 5 แฮพลไทป์และ shared haplotype ภายในประชากร 1 แฮพลไทป์ โดยแฮพลไทป์ H04 เป็นแฮพลไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกจังหวัดใน

ฝั่งทะเลตะวันตก และแฮพลไทป์ H41 เป็น แฮพลไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกจังหวัดในฝั่งทะเล ตะวันออก (ตารางที่ 2) ทุกกลุ่มประชากรมี rare haplotype รวมจำนวน 50 แฮพลไทป์ โดย จังหวัดกระบี่และพังงามี rare haplotype มาก ที่สุด 14 แฮพลไทป์ สำหรับค่า haplotype diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.100 – 0.717 ส่วน ค่า nucleotide diversity มีค่าอยู่ในช่วง

0.007 – 0.013 โดยค่า haplotype diversity ของประชากรทั้งหมดมีค่า 0.933 ± 0.017 และค่า nucleotide diversity ของประชากร ทั้งหมดมีค่า 0.011 ± 0.000 สำหรับค่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้แก่ จำนวน แฮพลไทป์, จำนวน polymorphic sites, haplotype diversity (h) และ nucleotide diversity (π) แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียบริเวณคอนโทรลรีเจียน ในปลา ตะกรับที่อาศัยตามแนวชายฝั่งภาคใต้

Locality	Code	No.	No. haplotypes	No. polymorphic sites	Haplotype diversity (h) (mean $\pm$ SD)	Nucleotide diversity (π) (mean $\pm$ SD)
Satun	ST	18	12	21	0.895 ± 0.065	0.007 ± 0.001
Krabi	KB	17	17	32	1.000 ± 0.020	0.010 ± 0.000
Phang Nga	PN	16	15	28	0.992 ± 0.025	0.008 ± 0.001
Pattani	PT	17	10	19	0.794 ± 0.103	0.008 ± 0.001
Songkhla	SK	16	6	25	0.717 ± 0.099	0.013 ± 0.004
Nakhon Si Thammarat	NS	16	5	25	0.700 ± 0.080	0.010 ± 0.004
Total		100	56	73	0.933 ± 0.017	0.011 ± 0.000

ตารางที่ 2 การกระจายของรูปแบบไมโทคอนเดรียแฮปโลไทป์ และกลุ่มพันธุกรรม ในปลาตะกรับ จากแต่ละจังหวัดตลอดแนวชายฝั่งภาคใต้

Haplotype	ST	KB	PN	PT	SK	NS	Clade	Total
H01	1	-	-	-	-	-	I	1
H02	1	-	-	-	-	-	I	1
H03	1	-	-	-	-	-	II	1
H04	6	1	1	-	-	-	I	8
H05	3	-	-	-	-	-	II	3
H06	1	-	-	-	-	-	I	1
H07	1	-	-	-	-	-	I	1
H08	1	1	-	-	-	-	II	2
H09	1	-	-	-	-	-	I	1
H10	1	-	-	-	-	-	I	1
H11	1	-	-	-	-	-	I	1
H12	-	1	-	-	-	-	I	1
H13	-	1	-	-	-	-	II	1
H14	-	1	-	-	-	-	II	1
H15	-	1	2	-	-	-	I	3
H16	-	1	-	-	-	-	I	1
H17	-	1	-	-	-	-	I	1
H18	-	1	-	-	-	-	I	1
H19	-	1	-	-	-	-	II	1
H20	-	1	-	-	-	-	II	1
H21	-	1	-	-	-	-	I	1
H22	-	1	-	-	-	-	II	1
H23	-	1	-	-	-	-	II	1
H24	-	1	-	-	-	-	I	1
H25	-	1	-	-	-	-	II	1
H26	-	1	-	-	-	-	I	1

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Haplotype	ST	KB	PN	PT	SK	NS	Clade	Total
H27	-	-	1	-	-	-	II	1
H28	-	-	1	-	-	-	I	1
H29	-	-	1	-	-	-	I	1
H30	-	-	1	-	-	-	I	1
H31	-	-	1	-	-	-	I	1
H32	-	-	1	-	-	-	II	1
H33	-	-	1	-	-	-	II	1
H34	-	-	1	-	-	-	I	1
H35	-	-	1	-	-	-	I	1
H36	-	-	1	-	-	-	I	1
H37	-	-	1	-	-	-	I	1
H38	-	-	1	-	-	-	I	1
H39	-	-	1	-	-	-	I	1
H40	-	-	1	-	-	-	II	1
H41	-	-	-	8	8	6	II	22
H42	-	-	-	1	-	-	II	1
H43	-	-	-	1	-	-	II	1
H44	-	-	-	1	-	-	II	1
H45	-	-	-	1	-	-	II	1
H46	-	-	-	1	-	-	II	1
H47	-	-	-	1	-	-	II	1
H48	-	-	-	1	-	-	II	1
H49	-	-	-	1	-	-	II	1
H50	-	-	-	-	1	-	II	1
H51	-	-	-	-	4	8	II	12
H52	-	-	-	-	1	-	II	1
H53	-	-	-	-	1	-	II	1

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Haplotype	ST	KB	PN	PT	SK	NS	Clade	Total
H54	-	-	-	-	1	-	II	1
H55	-	-	-	-	-	1	II	1
H56	-	-	-	-	-	1	II	1
Total	18	17	17	16	16	16		56

หมายเหตุ : อักษรย่อคือจังหวัดที่เก็บตัวอย่างซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 1

2. โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรพบว่ามีความแตกต่างของโครงสร้างทางพันธุกรรมเมื่อวิเคราะห์จากประชากรรวมทั้งหมด (single region) โดยมีค่า $\Phi_{ST} = 0.199$ ($p = 0.000$) ประชากรมีความแปรปรวนภายในกลุ่ม 80.06 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) เมื่อวิเคราะห์โดยแบ่งกลุ่มประชากรเป็นฝั่งทะเลตะวันตกและตะวันออกพบว่ามีความแตกต่างกันโดยมีค่า $\Phi_{CT} = 0.261$ และมีค่า ($p = 0.031$) ประชากรมีความแปรปรวนภายใน 71.68 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ผลการวิเคราะห์ค่า pairwise F_{ST} พบว่าประชากรของทุกกลุ่มประชากรมีความแตกต่างกันยกเว้นประชากรระหว่างจังหวัดสตูลกับกระบี่, จังหวัดสตูลกับพังงา, จังหวัดกระบี่กับพังงา และจังหวัดสงขลากับนครศรีธรรมราช ที่ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างประชากร และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มปลาตะกรับด้วยวิธี AMOVA

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	p-value
1) Single region					
Among populations	5	71.047	0.687 Va	19.94	$\Phi_{ST} = 0.199^*$
Within populations	94	259.323	2.758 Vb	80.06	
Total	99	330.370	3.446		
2) Gulf of Thailand and Andaman sea					
Among groups	1	54.469	1.006 Va	26.16	$\Phi_{CT} = 0.261^*$

Among populations within groups	4	16.578	0.083 Vb	2.16	$\Phi_{SC} = 0.029^*$
Within populations	94	259.323	2.758 Vc	71.68	$\Phi_{ST} = 0.283^*$
Total	99	330.370	3.848		

หมายเหตุ : * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มของปลาตะกรับ จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 611 คู่เบส ของไมโทคอนเดรียบริเวณคอนโทรลรีเจียน

	ST	KB	PN	PT	SK	NS
ST	-					
KB	-0.006	-				
PN	-0.020	0.147	-			
PT	0.395*	0.286*	0.404*	-		
SK	0.269*	0.179*	0.286*	0.089*	-	
NS	0.269*	0.167*	0.287*	0.095*	-0.030	-

หมายเหตุ : * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), อักษรย่อคือจังหวัดที่เก็บตัวอย่างตามตารางที่ 1

3. ประวัติประชากร

จากการทดสอบการเบี่ยงเบนไปจาก neutral population พบว่าค่า D statistic มีค่า -1.710 ($p = 0.011$) และค่า F_s statistic มีค่า -25.005 ($p = 0.000$) ซึ่งเบี่ยงเบนไปจาก neutral population การทดสอบ mismatch distribution พบว่าสอดคล้องกับ sudden expansion model โดยมีค่า SSD เท่ากับ 0.007 ($p=0.285$) และค่า Harpending Raggedness index เท่ากับ 0.018 ($p=0.382$)

ค่าพารามิเตอร์ θ_1 มีค่ามากกว่า θ_0 ในทุกจังหวัดแสดงว่าประชากรกำลังมีการขยายขนาดประชากร (ตารางที่ 5) เมื่อคำนวณระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรพบว่าการขยายขนาดมาประมาณ 270,000 ปีที่ผ่านมา ความสัมพันธ์ของแฮพลไทป์ (MSN) พบว่าไม่มีการแบ่งกลุ่มตามสภาพภูมิศาสตร์อย่างชัดเจน แต่แบ่งกลุ่มได้ตาม common haplotype เป็น 2 เครด ได้แก่ เครดที่หนึ่งมีลักษณะเป็น star-like network มีแฮพลไทป์ H04 ซึ่งมีสมาชิก

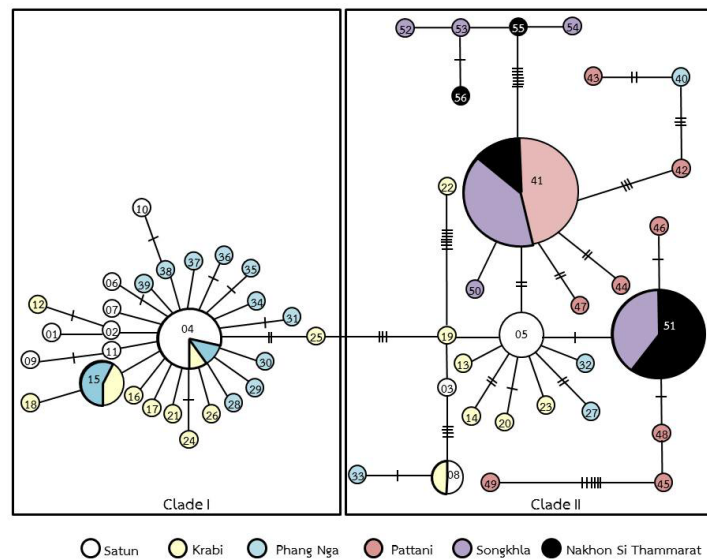
จากจังหวัดสตูล กระบี่ และพังงาเป็น common haplotype และมีการเชื่อมต่อกับแฮพลไทป์อื่นที่เป็นสมาชิกจากจังหวัดในฝั่งทะเลอันดามันทั้งหมดด้วยการกลายพันธุ์ 1-2 step เคลดที่สองมีลักษณะเป็น long genealogy มีแฮพลไทป์ H41 ซึ่งมีสมาชิกมาจากจังหวัดปัตตานี สงขลา และนครศรีธรรมราชเป็น

common haplotype และมีการเชื่อมต่อกับแฮพลไทป์อื่นที่เป็นสมาชิกจากจังหวัดในฝั่งทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามันด้วยการกลายพันธุ์หลาย step (ภาพที่ 2, ตารางที่ 2) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้เป็นสองเคลดเช่นเดียวกับแผนผัง MSN (ภาพที่ 3, ตารางที่ 2)

ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากรและการประมาณช่วงเวลาที่เกิดการขยายขนาดประชากรของปลาตะกรับ ที่อาศัยตลอดแนวชายฝั่งภาคใต้ โดยอาศัยข้อมูลไมโทคอนเดรียบริเวณคอนโทรลรีเจียน

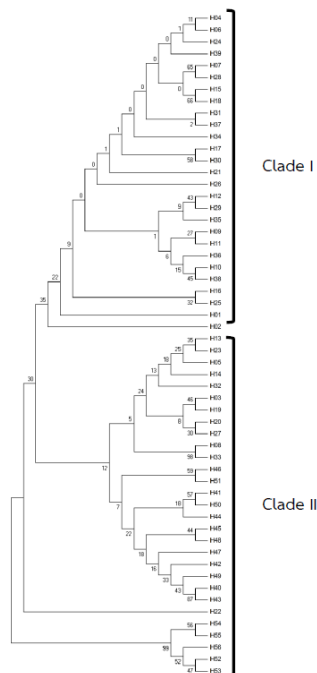
Locality	Tajima's D	Fu's FS	τ	θ_0	θ_1	SSD	Raggedness	Expansion time (year ago)
ST	-1.282*	-3.469*	5.128	0.117	7.496	0.002	0.011	233,133
KB	-1.417	-12.967*	3.355	3.039	161.250	0.011	0.023	152,527
PN	-1.797*	-11.168*	2.953	0.000	99999.000	0.044	0.099	134,251
PT	-0.305	-1.396	6.312	1.077	9.189	0.037	0.083	286,961
SK	-0.480	3.653	20.917	0.000	3.197	0.125	0.239	950,945
NS	-0.634	5.743	4.238	0.001	2.710	0.184	0.476	192,671
Total	-1.710*	-25.005*	5.980	0.010	17.214	0.007	0.018	271,867

หมายเหตุ : * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), อักษรย่อคือจังหวัดที่เก็บตัวอย่างตามตารางที่ 1



ภาพที่ 2 แอโพลไทป์เน็ตเวิร์คของปลาตะกรับ ที่สุ่มขึ้นมาศึกษาตลอดชายฝั่งภาคใต้ สร้างขึ้นโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 611 คู่เบส ของไมโทคอนเดรียบริเวณคอนโทรลรีเจียน

หมายเหตุ : ขนาดวงกลมแสดงตามสัดส่วนของจำนวนสมาชิกในแต่ละแอโพลไทป์, หมายเลขในวงกลมคือชื่อแอโพลไทป์, เส้นที่เชื่อมระหว่างแอโพลไทป์และเส้นที่ขีดคั่นคือจำนวนครั้งของการเกิด mutation step



ภาพที่ 3 แผนภาพวิวัฒนาการของแอโพลไทป์ที่พบในปลาตะกรับ สร้างขึ้นด้วยวิธีการ Neighbor-joining โดยอาศัยข้อมูลไมโทคอนเดรียบริเวณคอนโทรลรีเจียน

อภิปรายผลการทดลอง

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากแฮปโลไทป์จำนวน 56 แฮปโลไทป์พบว่า เป็น rare haplotype 50 แฮปโลไทป์แสดงว่าปลาตะกรับในภาคใต้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและมีปลาตะกรับเพศเมียที่มีความสามารถในการขยายพันธุ์เป็นจำนวนมากจึงทำให้มีจำนวนแฮปโลไทป์ที่มีความแตกต่างกันเป็นจำนวนมาก (Lewontin. 1974) และ rare haplotype ที่พบ เป็นแฮปโลไทป์ที่พบเฉพาะในจังหวัดซึ่งเรียกว่า private allele โดยสามารถใช้ private allele ระบุแหล่งที่มาของสายพันธุ์หรือแหล่งทางพันธุกรรมได้ (Xu et al. 2009) การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่พบจำนวน rare haplotype จำนวนมากในสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง whiskered velvet shrimp (Chu et al., 2012), เพรียงหิน (Tsang et al. 2008) และปลากระบอก (จุฑามาศ ศุภพันธ์. 2558) เป็นต้น ทุกประชากรมีความสัมพันธ์ของค่า haplotype diversity และ nucleotide diversity เหมือนกัน คือมีค่า haplotype diversity มากกว่า nucleotide diversity สาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์และการสะสมแฮปโลไทป์แบบใหม่อย่างรวดเร็ว ซึ่งรูปแบบดังกล่าวสามารถพบได้ในประชากรที่กำลังมีการขยายขนาด (Watterson. 1984) และพบได้ในสัตว์ทะเลหลายชนิดเช่น ปู lined shore crab (*Pachygrapsus crassipes*) (Cassone and Boulding. 2006), กุ้ง fleshy shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) (Kong et al., 2010) และปลา *Mugil cephalus* (Liu et

al., 2009) เป็นต้น ผลการศึกษาค้นพบว่าของปลาตะกรับจากฝั่งทะเลอันดามันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าฝั่งอ่าวไทยในทุกจังหวัด ซึ่งสอดคล้องกับสภาพของแหล่งที่อยู่บริเวณฝั่งทะเลอันดามันมีความสมบูรณ์ของแหล่งที่อยู่มากกว่าฝั่งอ่าวไทย (Plathong and Plathong. 2008) จึงส่งผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาตะกรับด้วย

2. โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรพบว่าประชากรปลาตะกรับในภาคใต้ระหว่างประชากรฝั่งตะวันออกและฝั่งตะวันตกมีความแตกต่างทางพันธุกรรมแสดงว่าปัจจัยทางภูมิศาสตร์ของภาคใต้ระหว่างทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามันที่ถูกแบ่งแยกด้วยคาบสมุทรมลายู มีผลในการขัดขวางการผสมพันธุ์ระหว่างประชากรซึ่งเป็นการขัดขวางการแลกเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างประชากรทั้งสองฝั่งทะเล ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรสัตว์น้ำในทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามันสามารถพบได้ เช่น ในกุ้ง shovel-nosed lobster (*Thenus indicus*) (Iamsuwansuk and Denduangboripant. 2011), หอย Asian moon scallop (*Amusium pleuronectes*) (Mahidol et al., 2007) และม้าน้ำ spotted seahorse (*Hippocampus kuda*) (Panithanarak et al., 2010) ผลจากการวิเคราะห์ pairwise F_{ST} พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรในเขตทะเลอันดามันระหว่างจังหวัดสตูล กระบี่ และพังงาไม่มีความแตกต่างกัน แสดงว่ามีการผสมพันธุ์กันระหว่างปลาตะกรับจากทั้ง 3 จังหวัด ซึ่ง

สอดคล้องกับตำแหน่งที่ตั้งของถิ่นอาศัยซึ่งอยู่ในเขตทะเลเดียวกัน จึงทำให้ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร แต่พบว่าในฝั่งทะเลอ่าวไทยระหว่างจังหวัดสงขลาและนครศรีธรรมราชซึ่งอยู่ในฝั่งทะเลเดียวกันมีความแตกต่างระหว่างประชากรเกิดขึ้นซึ่งน่าจะเกิดจากสภาพทางภูมิศาสตร์ของถิ่นอาศัย เช่น ระยะทางระหว่างถิ่นอาศัย กระแสน้ำภายในและระหว่างถิ่นอาศัย หรืออาจมีปัจจัยอื่นที่ทำให้การผสมพันธุ์ระหว่างประชากรเกิดขึ้นได้อย่างจำกัดจนทำให้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรขึ้น

3. ประวัติประชากร

การศึกษาครั้งนี้พบว่าประชากรปลาตะกรับในภาคใต้กำลังมีการขยายขนาดประชากรอย่างรวดเร็ว จากผลการทดสอบ neutrality test ทั้งวิธี Tajima's D test และ Fu's F_s test มีค่าติดลบ แสดงว่าประชากรมีการเบี่ยงเบนไปจากสมดุล (neutral state) ในส่วนของค่า Tajima's D ที่มีค่าติดลบแสดงว่าประชากรน่าจะมีการคัดเลือกโดยการคัดการกลายพันธุ์ที่ไม่เหมาะสมทิ้งไป (purifying selection) หรืออาจเกิดการขยายขนาดของประชากรมาก่อน (Yang, 2006) ส่วนค่า Fu's F_s ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการขยายขนาดของประชากรที่เหมาะสมกับเครื่องหมายพันธุกรรมที่เป็น non-recombination genetic data (Ramirez-Soriano et al., 2008) มีค่าติดลบด้วยเช่นกันจึงเป็นการยืนยันว่าประชากรปลาตะกรับน่าจะเคยมีการขยายขนาดมาก่อน สอดคล้องกับค่า SSD ที่ยอมรับสมมติฐาน

sudden expansion model และยังสอดคล้องกับค่า θ_1 ซึ่งมีค่ามากกว่า θ_0 ในทุกกลุ่มประชากร แสดงว่าประชากรกำลังมีการขยายขนาดจากขนาดเล็กสู่ขนาดใหญ่ โดยมีการขยายขนาดประชากรมาประมาณ 270,000 – 130,000 ปีที่ผ่านมา จากแผนผัง MSN พบว่า ไม่สามารถแบ่งกลุ่มประชากรตามสภาพภูมิศาสตร์ได้อย่างชัดเจน แต่สามารถแบ่งกลุ่มตามแอโพลไทป์เป็น 2 เคลด ได้แก่ เคลดที่หนึ่งประกอบไปด้วยสมาชิกแอโพลไทป์ทั้งหมดที่มาจากทะเลอันดามัน ซึ่งมีลักษณะเป็น star-like network แสดงว่าประชากรน่าจะมีการขยายขนาดมาเมื่อไม่นานมานี้ ส่วนเคลดที่สองประกอบไปด้วยสมาชิกแอโพลไทป์ส่วนใหญ่ที่มาจากทั้งทะเลอันดามันและทะเลอ่าวไทย ซึ่งมีลักษณะเป็นแบบ long genealogy ซึ่งแสดงว่าประชากรน่าจะมีการขยายขนาดมานาน สอดคล้องกับการคำนวณระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรและค่าพารามิเตอร์ τ (ตารางที่ 5) ที่พบว่าประชากรปลาตะกรับฝั่งทะเลอ่าวไทยมีการขยายขนาดมานานกว่าทะเลอันดามัน เมื่อพิจารณาจากระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรพบว่า การขยายขนาดน่าจะสัมพันธ์กับการกำเนิดชายฝั่งของประเทศไทยที่เริ่มกำเนิดในยุคไพลสโตซีน (Pleistocene) ประมาณ 1,000,000–100,000 ปีที่ผ่านมา โดยในช่วงนี้ระดับน้ำทะเลจะท่วมสูงเนื่องมาจากการละลายของน้ำแข็งจากขั้วโลกหลังจากนั้น ระดับน้ำทะเลจะเริ่มลดระดับลงเรื่อย ๆ จนเข้าสู่ยุคโฮโลซีน (Holocene) ประมาณ 10,000 ปีที่ผ่านมา และในช่วงนี้จะเริ่มมีการทับถมของตะกอนเกิดขึ้นเป็นพื้นที่ชายฝั่งและกลายเป็น

แหล่งที่อยู่ของสัตว์ทะเลชายฝั่ง (Sinsakul. 2000) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าประชากรปลาตะกรับน่าจะมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของแหล่งที่อยู่ในช่วงเวลาดังกล่าว โดยมีหลายรายงานที่พบว่ามีการขยายขนาดของประชากรสัตว์ทะเลอีกหลายชนิดและหลายพื้นที่ เช่น ปูม้า (*Portunus trituberculatus*) ในชายฝั่งประเทศจีน (Guo. 2011) และกุ้งมังกร (*Austropotamobius italicus*) ในคาบสมุทรไอบีเรีย (Pedraza-Lara et al. 2010) เป็นต้น

4. แนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากผลการศึกษาที่พบว่ามีความแตกต่างของโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรระหว่างปลาตะกรับในฝั่งทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามัน ดังนั้นแนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมทำได้โดยการวางแผนการจัดการแยกระหว่างฝั่งทะเล เช่น การปล่อยพันธุ์สู่ธรรมชาติโดยการใช้พ่อแม่พันธุ์ในฝั่งทะเลเดียวกันปล่อยลงสู่แหล่งน้ำเพื่อคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมและหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนทางพันธุกรรม นอกจากนี้ควรรักษากินที่อยู่ตามธรรมชาติโดยการไม่ทำลาย อีกทั้งยังต้องมีมาตรการในการเพิ่มขนาดของแหล่งที่อยู่ และไม่ควรจับปลาตัวเมียที่กำลังวางไข่เนื่องจากเป็นการขัดขวางการเพิ่มจำนวนประชากร หากมีการเพาะเลี้ยงหรือการปรับปรุงสายพันธุ์ ควรมีการสร้างประชากรพ่อแม่พันธุ์ให้มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับในธรรมชาติโดยอาจมีการผสมระหว่างประชากรหรือนำประชากรจากธรรมชาติเข้ามาผสมเพื่อให้ได้ประชากรพ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพทาง

พันธุกรรมที่สมบูรณ์และมีศักยภาพที่ยั่งยืนในการเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ดี การศึกษาครั้งนี้พบว่าประชากรปลาตะกรับในฝั่งทะเลอ่าวไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยกว่าฝั่งทะเลอันดามัน ดังนั้นจึงควรมีมาตรการจัดการที่เข้มข้นมากกว่า อย่างไรก็ตามในการพิจารณาแนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมควรมีการใช้ข้อมูลจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอื่น ๆ เช่น เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งมีอัตราการกลายสูงกว่าเพื่อทราบถึงสถานะปัจจุบันของประชากร ว่ามีแนวโน้มเพิ่มหรือลดขนาดของประชากรควบคู่กันไปด้วย

สรุป

1. มีความแตกต่างของโครงสร้างทางพันธุกรรมของปลาตะกรับในภาคใต้ของประเทศไทยระหว่างทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามัน
2. ประชากรปลาตะกรับในภาคใต้ของประเทศไทยกำลังมีการขยายขนาดประชากร

กิตติกรรมประกาศ

เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ส่วนหนึ่งได้จากทุนวิจัยจากเงินวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย เรื่องโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากรของปูแป้น (*Varuna litterata*) ในประเทศไทย โดยใช้เงินในส่วนของคุณค่าตอบแทนนักวิจัย

เอกสารอ้างอิง

จุฬามาศ ศุภพันธ์. (2558). โครงสร้าง

พันธุศาสตร์ประชากรของปลากระบอก (*Liza subviridis*) ในอ่าวไทย และแนวทางในการอนุรักษ์. **วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 10(1), 157-175.

Boore, J.L. (1999). Survey and summary animal mitochondria genome. **Nucleic acids research**. 27(8), 1767-1780.

Cassone, B.J. and Boulding, E.G. (2006). Genetic structure and phylogeography of The lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes*, along the northeastern and western Pacific coasts. **Marine Biology**. 149, 213-226.

Chu, T.J., Wang, D., Huang, H.L., Lin, F.J. and Tzeng, T.D. (2012). Population structure and historical demography of the whiskered velvet shrimp (*Metapenaeopsis barbata*) off China and Taiwan inferred from the mitochondrial control region. **Zoological Studies**. 51, 99-107.

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.

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.
- Henriques, R., Potts, W.M., Santos, C.V., Sauer, W.H.H. and Shaw, P.W. (2014). Population Connectivity and Phylogeography of a Coastal Fish, *Atractoscion aequidens* (Sciaenidae), across the Benguela Current Region: Evidence of an Ancient Vicariant Event. **PLOS ONE**. 9(2), 1-11.
- Huang, X. and Madan, A. (1999). CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**. 9, 868-877.
- Iamsuwansuk, A. and Denduangboripant, J. (2011). Phylogenetic study of shovel-nosed lobster *Thenus indicus* in Thailand. In **The 37th Congress on Science and Technology of Thailand**. 10-12 October 2011. Bangkok, Thailand.
- 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.

- Nei, M. (1987). **Molecular Evolutionary Genetics**. New York : Columbia University Press.
- Mahidol, C., Na-Nakorn, U., Sukmanomon, S., Taniguchi, N. and Nguyen, T.T.T. (2007). Mitochondrial DNA diversity of the Asian moon scallop, *Amusium pleuronectes* (Pectinidae), in Thailand. **Marine Biotechnology**. 9, 352-359.
- Panithanarak, T., Karuwancharoen, R., Na-Nakorn, U. and Nguyen, T.T.T. (2010). Population genetics of the spotted seahorse (*Hippocampus kuda*) in Thai waters: implications for conservation. **Zoological Studies**. 49, 564-576.
- Pedraza-Lara, C., Alda, F., Carranza, S. and Doadrio, I. (2010). Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius italicus italicus* (Faxon, 1914). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 57, 327-342.
- Plathong, S. and Plathong, J. (2008). **The environmental setting of mangroves in peninsular Thailand**. [Online]. <http://www.sc.psu.ac.th/Units/Cbipt>, June 5, 2011.
- 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.
- Sinsakul, S. (2000). Late Quaternary geology of the Lower Central Plain, Thailand. *Journal of Southeast Asian. Earth Science*. 18, 415-426.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**. 123, 585-595.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. 24, 1596-1599.

- Tsang, L.M., Chan, B.K.K., Wu, T.H.,
Ng, W.C., Chatterjee, T.,
Williams, G.A., Chu, K.H. (2008)
Population differentiation in
the barnacle *Chthamalus*
malayensis: Postglacial
colonization and recent
connectivity across the Pacific
and Indian Oceans, **Marine
Ecology Progress Series**. 364,
107–118.
- Watterson, G.A. (1984). Allele
frequencies after a bottleneck.
Theoretical Population Biology.
26, 387-407.
- Xu, Q., Liu, R. and Liu, Y. (2009).
Genetic population structure of
the swimming crab, *Portunus*
trituberculatus in the East
China Sea based on mtDNA 16S
rRNA sequences. **Journal of
Experimental Marine Biology
and Ecology**. 371, 121-129.
- Yang, Z. (2006). **Computational
molecular evolution**. New York:
Oxford University Press