ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรปลายี่สกเทศของไทยที่มาจากการเพาะเลี้ยง ปรับปรุงพันธุ์ และแหล่งน้ำธรรมชาติ

Genetic variation among cultured, selectively bred and natural populations of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822), in Thailand

พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข[1]* ศรีจรรยา เข็มกลัด[1] วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์[1] ศรีรัตน์ สอดศุข[1] พลชาติ ผิวเณร[1] และ ทองอยู่ อุดเลิศ[2]

Panom K. Sodsuk[1]*, Srijanya Khemklad[1], Witsanuporn Rattanatriwong[1], Srirat Sodsuk[1], Ponlachart Pewnain[1] and Thongyoo Utlert[2]

[1]สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ ปทุมธานี 12120

[2]สำนักงานประมงจังหวัดอุตรดิตถ์ อุตรดิตถ์ 53000

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

[2]Uttaradit Province Fisheries Office, Uttaradit 53000, Thailand

**Corresponding author: panomks@yahoo.com*

บทคัดย่อ

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรปลายี่สกเทศของไทย ที่มาจากการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์ ได้แก่ ประชากรจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดกาฬสินธุ์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำอุตรดิตถ์ 4 ประชากร (P_0, F_1, F_2 และ F_3) และประชากรจากธรรมชาติ ได้แก่ แม่น้ำมูล จังหวัดอุบลราชธานี บึงสีไฟ จังหวัดพิจิตร และแม่น้ำเมย จังหวัดตาก โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 8 ตำแหน่ง ได้ข้อมูลความแปรปรวนหรือความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งประกอบด้วย ค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่งของ จำนวนแอลลีลที่ปรากฏ (A_a = 2.1250 – 3.2500), effective number of alleles (A_e = 1.6342 – 2.2075), allelic richness (A_r = 2.0696 – 2.7714), ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o = 0.3183 – 0.5303) และค่าคาดคะเนเฮเทอโรไซโกซิตี (H_e = 0.3209 – 0.5031) ปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมของทุกประชากรอยู่ในระดับเดียวกัน หรือไม่แตกต่างกันในทุกประชากร (P>0.05) และทุกประชากรไม่เบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (P_{HWE}>0.05) ค่า effective population size (N_e) ที่ประเมินในแต่ละประชากรอยู่ระหว่าง 1.5 – 109.5 โดยค่าต่ำสุดอยู่ที่ประชากรจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดกาฬสินธุ์ ซึ่งสมควรได้รับการเอาใจใส่ดูแลอย่างเคร่งครัด การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากรระบุว่าประชากรทั้งหมดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยมีความแตกต่างระหว่างประชากรที่อยู่ภายในกลุ่มเดียวกันนี้ และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างในทุกคู่ประชากร พบว่า ประชากรจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดกาฬสินธุ์ แม่น้ำมูล บึงสีไฟ และแม่น้ำเมย ไม่มีความแตกต่างกัน (P_{Fst}>0.0007, Bonferroni correction) และยังสนับสนุนว่าประชากรเหล่านี้อยู่ในกลุ่มที่สืบทอดหรือมีความใกล้ชิดกับประชากรที่นำเข้าในช่วงปี 2511–2512 นอกจากนี้ จากการ

วิเคราะห์โครงสร้างความสัมพันธ์ระหว่างประชากรที่พบว่า ประชากร P_0, F_1, F_2 และ F_3 ในโปรแกรมการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำอุตรดิตถ์ มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากกว่ากับประชากรอื่น เป็นการยืนยันต้นกำเนิดของประชากรดังกล่าวว่ามาจากประชากรเดียวกันที่นำเข้าในช่วงปี 2541 ผลการศึกษาโดยการเปรียบเทียบระหว่างรุ่นประชากร ด้วยข้อมูลทางพันธุกรรมจากการศึกษาครั้งนี้ และข้อมูลลักษณะการเจริญเติบโตที่มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ ระบุว่า การปรับปรุงพันธุ์ปลายี่สกเทศโดยการคัดเลือกแบบหมู่ของ ศพก.อุตรดิตถ์ ตั้งแต่รุ่น P_0 ถึง F_3 มีผลให้ปลายี่สกเทศรุ่น F_2 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นมากกว่ารุ่นที่ผ่านมา ในขณะที่พันธุกรรมของประชากรเริ่มมีความแตกต่างออกไปจากรุ่นพ่อแม่ (P_0) ในรุ่น F_3 จึงแนะนำว่าควรให้ความสนใจในเรื่องการบริหารจัดการพันธุกรรมของประชากรพ่อแม่พันธุ์ให้มากขึ้นหลังจากการคัดเลือกผ่านรุ่น F_3 ไปแล้ว

Abstract

Genetic variation based on microsatellite markers was analysed among cultured, selectively bred and natural populations of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) in Thailand. Eight populations were used in the analysis which include a cultured population from Kalasin Inland Fisheries Research and Development Center, four populations (P_0, F_1, F_2 and F_3) from a selective breeding program of Uttaradit Aquaculture Genetics Research and Development Center and the other three natural populations from Mun River (Ubon Ratchathani Province), Bueng Si Fai (Phichit Province) and Moei River (Tak Province). With eight microsateliite loci screened, the genetic variabilities including per locus averages of number of alleles (A_a = 2.1250 – 3.2500), effective number of alleles (A_e = 1.6342 – 2.2075), allelic richness (A_r = 2.0696 – 2.7714), observed heterozygosity (H_o = 0.3183 – 0.5303) and expected heterozygosity (H_e = 0.3209 – 0.5031) were obtained, and were not significantly different among all the eight populations (P>0.05). Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were not found in any of the populations (P_{HWE}>0.05). Estimated effective population sizes (N_e) were 1.5 – 109.5, of which the Kalasin Inland Fisheries Research and Development Center population was of the lowest N_e, so, particular attention should be paid to this population. Population differences analyses implied that the eight populations generally were in a single group, with genetic differences between the populations within this group. It was found from further analyses in each pair of populations that the populations of Kalasin Center, Mun River, Bueng Si Fai and Moei River were not different from each other (P_{Fst}>0.0007, Bonferroni correction). This finding also supported that these populations are related to those introduced to Thailand in 1968-1969. Another relative analysis of genetic structure, resulting in a close relationship among the P_0, F_1, F_2 and F_3 populations of the Uttaradit Center, confirmed that the P_0, F_1, F_2 and F_3 populations originated from the population introduced to Thailand in 1998. Results from the between-generations comparisons of P_0, F_1, F_2 and F_3 based on the population genetic data in this study and growth

performance from the previous study showed that mass selective breeding by the Uttaradit Center could make better growth appear in the F_2 generation, whereas the population genetic differentiation would begin to be affected in the F_3 generation. Consequently, a recommendation is that much attention on genetic management should be paid to the brood-stocks after the F_3 selectively bred generation has been achieved.

คำสำคัญ : ปลายี่สกเทศ ความแปรปรวนทางพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์

Key words: Rohu (*Labeo rohita*), genetic variation, microsatellite

บทนำ

ปลายี่สกเทศ หรือปลาโรฮู่ rohu, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) (ชวลิต และคณะ, 2540; Khan and Jhingran, 1975) เป็นปลาน้ำจืดที่มีแหล่งกำเนิดในลุ่มแม่น้ำ Ganges และสาขาย่อยต่าง ๆ ทางตอนเหนือของประเทศอินเดีย รวมถึงแม่น้ำสายต่างๆ ที่อยู่ในประเทศปากีสถาน บังคลาเทศ เนปาล และพม่า ปลายี่สกเทศเป็นหนึ่งในกลุ่มปลา carps สามชนิดหลักของอินเดีย (three Indian major carps) ซึ่งประกอบด้วยปลาอีก 2 ชนิด คือ ปลากระโห้เทศ catla, *Catla catla* และปลานวลจันทร์เทศ mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Jhingran and Pullin, 1985) ปลายี่สกเทศถูกนำเข้าจากประเทศอินเดียตั้งแต่ปี พ.ศ. 2511 – 2512 จำนวน 266 ตัว (Duangswasdi and Pupipat, 1982) เนื่องจากเป็นปลาที่มีลักษณะเด่น คือ มีขนาดใหญ่ เจริญเติบโตได้ดีทั้งในบ่อและในแหล่งน้ำขนาดใหญ่ ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี มีอัตรารอดตายสูง เนื้อมีรสชาติดีใกล้เคียงกับปลายี่สกไทย จึงได้รับความนิยมสูง และอยู่ในความสนใจของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างมาก จึงจัดว่าปลายี่สกเทศเป็นปลาน้ำจืดอีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อสังคมและเศรษฐกิจของประเทศ (อภิชาต และคณะ, 2546)

หลังจากการนำเข้าในช่วงปี พ.ศ. 2511 – 2512 แล้ว ในปี 2541 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำได้นำเข้าพันธุ์ปลายี่สกเทศจากประเทศอินเดียอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งไม่สามารถยืนยันจำนวนนำเข้าที่แน่นอน แต่เชื่อว่าน่าจะมากกว่า 50 คู่ หรือ 50 ตัวในแต่ละเพศ โดยนำไปทำการเพาะเลี้ยง ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำอุตรดิตถ์ ต่อมาศูนย์ฯ แห่งนี้ได้วางแผนดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ปลายี่สกเทศโดยการคัดเลือกแบบหมู่ (mass selection) เพื่อให้มีการเจริญเติบโตดี มีความแข็งแรง ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมมากยิ่งขึ้น ซึ่งจากรายงานเมื่อปี 2552 ได้ดำเนินการจนได้พันธุ์ปลาที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้วถึง 3 รุ่น (วิศณุพร และคณะ, 2552) อย่างไรก็ตาม นอกเหนือจากลักษณะปรากฏ หรือลักษณะที่แสดงออกภายนอก (trait performance) ของพันธุ์ เช่น การเจริญเติบโต และความทนทานหรืออ่อนแอต่อสภาพแวดล้อม (ซึ่งแสดงออกโดยอัตรารอด) ดังกล่าวแล้วนั้น ข้อมูลที่ระบุความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากร (เช่น ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี และจำนวนแอลลีล) และความแตกต่างระหว่างประชากร (เช่น ค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างทางพันธุกรรม หรือ inbreeding coefficients) จะเป็นข้อมูลอีกด้านหนึ่งที่ระบุคุณภาพของสายพันธุ์ได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น เพราะข้อมูลความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม จะสื่อถึงศักยภาพในการวิวัฒนาการของ

ประชากร โดยค่าเฮเทอโรไซโกซิตีซึ่งสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการคัดเลือกทั้งโดยมนุษย์และการคัดเลือกตามธรรมชาติ จะมีความสำคัญต่อการปรับตัวในระยะสั้น ในขณะที่ความหลากหลายของแอลลีลจะเกี่ยวข้องกับความอยู่รอดในระยะยาว (Allendorf, 1986) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประชากรขนาดเล็กอย่างเช่นประชากรโรงเพาะฟัก การลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรมอาจส่งผลกระทบต่อความอยู่รอดของประชากรในอนาคตได้ (Frankham *et al*., 2002) ดังนั้น การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรปลายี่สกเทศที่ผ่านการคัดเลือกแต่ละรุ่น ซึ่งจะทำให้ทราบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมมีการเปลี่ยนแปลงจากการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์หรือไม่อย่างไรนั้น จะสามารถสื่อถึงศักยภาพของประชากรในการอยู่รอดได้ในอนาคต ทั้งนี้ สมควรดำเนินการในประชากรที่ไม่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ ทั้งในประชากรเพาะเลี้ยงและประชากรธรรมชาติควบคู่ไปด้วยเช่นกัน ด้วยเพราะว่ามีผลการศึกษาในกุ้งกุลาดำก่อนหน้านี้ (พนม และคณะ, 2548) ที่ระบุว่า ประชากรจะมีคุณภาพทางพันธุกรรมที่ดี และมีศักยภาพเพียงพอสำหรับการเป็นประชากรพ่อแม่พันธุ์เริ่มต้นที่ดีต่อไปนั้น จะต้องมีปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงพอสมควร โดยอย่างน้อยที่สุดไม่ควรต่ำกว่า หรืออยู่ในระดับเดียวกันกับค่าที่ปรากฏในประชากรธรรมชาติ

การศึกษาวิเคราะห์เพื่อประเมินความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากร สมควรดำเนินการโดยใช้เทคนิคเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ เพราะไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการกลายสูงและถ่ายทอดแบบข่มร่วม (co-dominant) ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์พันธุกรรม (ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ) ได้ที่จำนวนหลายตำแหน่ง โดยในแต่ละตำแหน่งมีความหลากหลายของจำนวนแอลลีลสูง (Queller *et al*., 1993) ประกอบกับปัจจุบันได้มีการพัฒนาไพรเมอร์ ที่สามารถใช้ศึกษาวิเคราะห์ความหลากรูปแบบทางพันธุกรรม (genotypic polymorphism) ของไมโครแซทเทลไลท์ในปลายี่สกเทศไว้มากกว่า 30 คู่ (Das *et al*., 2005; Patel *et al*., 2009) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ข้อมูลความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในประชากรปลายี่สกเทศในประเทศไทยได้เป็นอย่างดี เป็นที่ทราบและยอมรับโดยทั่วกันว่าข้อมูลดังกล่าว มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการบริหารจัดการสายพันธุ์ การคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ ตลอดจนการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในประชากรธรรมชาติ (Norris *et al*., 1999; Kim *et al*., 2004; Lui and Cordes, 2004)

ด้วยเหตุผลดังกล่าว สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ โดยกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมโมเลกุลสัตว์น้ำ จึงเห็นสมควรศึกษาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ เพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรปลายี่สกเทศ ที่ผ่านการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ควบคู่ไปกับประชากรที่ไม่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ และประชากรในแหล่งน้ำธรรมชาติ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปใช้เพื่อระบุคุณภาพและศักยภาพของประชากรหรือสายพันธุ์ที่สมบูรณ์ สามารถบริหารจัดการพ่อแม่พันธุ์และดำรงรักษาพันธุ์ตามหลักพันธุศาสตร์ที่ดีต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา การเก็บตัวอย่าง และสกัดดีเอ็นเอ

การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างปลายี่สกเทศ

จาก 8 ประชากร เป็นประชากรเพาะเลี้ยง และผ่านการปรับปรุงพันธุ์ 5 ประชากร และประชากรจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 3 ประชากร (Table 1) ประชากรเพาะเลี้ยง 2 ประชากรเป็นปลาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดกาฬสินธุ์ (ศพจ.กาฬสินธุ์) และประชากรรุ่น P_0 (ยังไม่ผ่านการคัดเลือก) ของศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำอุตรดิตถ์ (ศพก.อุตรดิตถ์) ประชากรที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ 3 ประชากร ได้แก่ ประชากรรุ่น F_1, F_2 และ F_3 ซึ่งผ่านการคัดเลือกแบบหมู่ (mass selection) โดย ศพก.อุตรดิตถ์ ส่วนอีก 3 ประชากรจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ได้แก่ แม่น้ำมูล โดยซื้อจากตลาดสด จังหวัดอุบลราชธานี บึงสีไฟ จังหวัดพิจิตร และแม่น้ำเมย โดยซื้อจากตลาดในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ข้อมูลรายละเอียดและพันธุ์ประวัติของแต่ละประชากรตามที่รายงานใน Table 1

เก็บตัวอย่างครีบจากปลายี่สกเทศ 8 ประชากร (Table 1) แยกใส่ในหลอด (microtube) ที่มี 95% ethanol บรรจุอยู่ 1 หลอด/ตัวอย่าง ไม่ให้ปะปนกัน เก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างครีบ โดยประยุกต์จากวิธีการของ Boom *et al*. (1990), Höss and Pääbo (1993), Höss (1994) และ Kemp *et al*. (2006) โดยใช้ฟีนอลคลอโรฟอร์มและใช้ silica ร่วมกับ extraction buffer ในการสกัด นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปผ่านขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพ และวัดปริมาณดีเอ็นเอ ตามวิธีการที่ พนม และคณะ

Table 1 Information of each stock, sources and number of individuals used

Sample stock/population	Stock/population information	Source/station	No. of inds
1. The Uttaradit Aquaculture Genetics Research and Development Center cultured stock. The P_0 population in mass-selective breeding program	This cultured stock was originally produced by the Uttaradit Aquaculture Genetics Research and Development Center with a number of fish introduced from India in 1998. After growing up the fish stock for a while, the Uttaradit Center operated a mass-selective breeding program for the fish better growth. This cultured stock was then used as the broodstock and became the P_0 population of the breeding program.	Uttaradit Aquaculture Genetics Research and Development Center	50
2. The F_1 population in mass-selective breeding program	This population was the F_1 generation in mass-selective breeding program which was operated for better growth by the Uttaradit Aquaculture Genetics Center. Originally, the F_1 population came from the population introduced from India in 1998.	Uttaradit Aquaculture Genetics Research and Development Center	50
3. The F_2 population in mass-selective breeding program	This population was the F_2 generation in the mass-selective breeding program of the Uttaradit Center. Originally, the F_2 population came from the population introduced from India in 1998.	Uttaradit Aquaculture Genetics Research and Development Center	50
4. The F_3 population in mass-selective breeding program	This population was the F_3 generation in the mass-selective breeding program of the Uttaradit Center. Originally, the F_3 population came from the population introduced from India in 1998.	Uttaradit Aquaculture Genetics Research and Development Center	100
5. The Kalasin Inland Fisheries Research and Development Center cultured stock	This cultured stock was the broodstock of Kalasin Inland Fisheries Research and Development Center. Presumably, the fish stock should have been originated from the fish introduced	Kalasin Inland Fisheries Research and Development Center	10

Table 1 Continued.

Sample stock/population	Stock/population information	Source/station	No. of inds
	from India in 1968-1969. This was because the introduced population was grown up and distributed to many places by the Department of Fisheries (DOF) long time ago.		
6. The Mun River natural population	This sample population was the fish caught from the Mun River and sold in fish-market in Ubon Ratchathani Province. The fish sold in the market were in large sizes but small number and not available every day. It was reasonable to believe that the Mun River population came from the fish introduced from India in 1968-1969. This was because after the fish introduction and the population had grown up, the DOF released quite number of the fish in some north-east reservoirs. A few years later, number of the fish were then found in many natural waters. (Duangswasdi and Pupipat, 1982)	Fish-market in Ubon Ratchathani Province	8
7. The Bueng Si Fai natural population	This natural population was originated from the cultured stock of Phichit Inland Fisheries Research and Development Center. The Phichit Center released the rohu, as well as other cultured species, to the Bueng Si Fai many years ago. The Center still release some of the fish into this natural water, due to some particular occasions. Like the cultured stock of the Kalasin Center and the Mun River natural population, the rohu population of Bueng Si Fai should, reasonably and originally, came from the fish introduced from India in 1968-1969.	Bueng Si Fai, Phichit Province	30
8. The Moei River (Thailand-Myanmar border) natural population	This sample population was the fish caught from the Moie River and sold in fish-market in Mae Sot, Tak Province. Like the Mun River population, the fish sold in the market were in large sizes but small number and not available every day. Reasonably, the rohu population of Moie River (Thailand-Myanmar border) should be close to the populations introduced from India in 1968-1969. It was realized that both natural and manipulated disseminations of rohu from the original habitats were found in other countries nearby and finding of this fish in Pakistan, India, Nepal, Bangladesh to Myanmar was also reported. (Khan and Jhingran, 1975; Duangswasdi and Pupipat, 1982; Jhingran and Pullin, 1985) Unsurprisingly, the rohu has been found living in the Moie River nowadays.	Market in Mae Sot, Tak Province	14

(2552) ได้รายงานไว้

การวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้มีการพัฒนาไว้แล้ว (Das *et al*., 2005; Patel *et al*., 2009) ตามที่ระบุใน Table 2 เพื่อวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 8 ตำแหน่ง โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (10 µl) ประกอบด้วย ดีเอ็นเอเริ่มต้น 10 ng, ไพรเมอร์

อย่างละ 0.5 μM, 1x PCR buffer (Promega), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.2U *Taq* DNA polymerase (Promega) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ รอบที่ 1 ที่ 94 °C 5 นาที, รอบที่ 2-30 ที่ 94 °C 30 วินาที ที่ T_A °C (Table 2) 30 วินาที และที่ 72 °C 1 นาที และรอบสุดท้ายที่ 72 °C 5 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis บน denaturing polyacrylamide gel 4.5% ในบัฟเฟอร์ TBE ที่ระดับกระแสไฟฟ้า 70 วัตต์ 1 ชั่วโมง และที่ 40 วัตต์ต่ออีก 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลมาย้อมด้วย silver nitrate และอ่านผลโดยเทียบขนาดกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน M13 sequence ladder

การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลพันธุกรรมที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในรูปของค่าความผันแปรทางพันธุกรรมต่างๆ ได้แก่ ค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (per locus average) ของแอลลีลที่ประกอบด้วย averaged number of alleles (A_a), effective number of alleles (A_e) และ allelic richness (A_r) และรวมถึงค่าเฮเทอโรไซโกซิตี ทั้งค่าสังเกต (observed heterozygosity, H_o) และค่าคาดคะเน (expected heterozygosity, H_e) และทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) รวมทุกตำแหน่งที่สำรวจในแต่ละประชากร ด้วยวิธี Chi-square test (Smouse *et al*., 1983) ตรวจวิเคราะห์ null allele ในทุกตำแหน่งของทุกประชากร โดยปรับจีโนไทป์ ณ ตำแหน่งและประชากรที่ตรวจพบ null allele และทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กทั้งก่อนและหลังการปรับจีโนไทป์ คำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของ Nei (1978) พร้อมทั้งวิเคราะห์โครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรด้วยวิธี 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) นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยค่า A_a, A_e, A_r, H_o และ H_e ที่วิเคราะห์ได้ ตามวิธีของ Sokal and Rohlf (1981) และ Ward *et al*. (1994) โดยใช้โปรแกรม SPSS (SPSS Inc., 1999) และประเมินค่า effective population size (N_e) ในแต่ละประชากร โดยใช้โปรแกรม LDNE (Waples and Do, 2008)

วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยวิธี analysis of molecular variance (AMOVA) โดยตรวจสอบจากค่า F-statistics (inbreeding coefficients หรือ fixation indexes) ซึ่งคำนวณจากค่า variance components (V) แล้วทดสอบโดยการวิเคราะห์ค่า *P* ในทุกระดับและทุกคู่ประชากรของการตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญของค่า *P* ที่ 0.02 (Fu, 1997; Alonso and Armour, 2001; Excoffier *et al*., 2006; Holsinger, 2012) สำหรับการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างจากประชากรที่ทราบประวัติ หรือมีประวัติที่น่าจะมาจากประชากรเริ่มต้นเดียวกันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด (Table 1) กำหนดได้เป็น 2 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มประชากรที่น่าจะสืบทอดหรือใกล้เคียงกับประชากรจากการนำเข้าในช่วงแรก (2511-2512) ได้แก่ ประชากรจาก ศพจ.กาฬสินธุ์ แม่น้ำมูล บึงสีไฟ และแม่น้ำเมย และ (2) กลุ่มประชากรที่สืบทอดจากประชากรนำเข้าในปี 2541 ได้แก่ ประชากรรุ่น P_0, F_1, F_2 และ F_3 ในโปรแกรมการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ของ ศพก.อุตรดิตถ์ ดังนั้นในขั้นตอนการวิเคราะห์จึงมีการกำหนดกลุ่ม

ประชากรดังกล่าว แล้วตรวจสอบความแตกต่างในทุกระดับ ได้แก่ ความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มประชากร (F_{ct} และ V_a) ระหว่างประชากรภายในกลุ่ม (F_{sc} และ V_b) ระหว่างประชากรภายในประชากรทั้งหมด (F_{st} และ V_c) และระหว่างประชากรทุกคู่ โดยใช้โปรแกรม Arlequin version 3.1 (Excoffier *et al*., 2006)

ในกรณีของการเปรียบเทียบความแตกต่างเป็นคู่ๆ ซึ่งมีการวิเคราะห์ซ้ำ ดำเนินการภายใต้ระดับนัยสำคัญของค่า *P* ที่ได้รับการปรับโดยใช้ Bonferroni correction เพื่อความถูกต้องสำหรับการทดสอบแบบ multiple tests (Rice, 1989)

Table 2 Eight microsatellite loci, primers and details used in this study

Locus	GenBank accession no.	Primer sequences (5'-3')	Annealing temp. (T_A °C)	Allele size (bp)	No. of alleles found
Lr3	AJ507520	F: ATCTGGCTGCCTATTCACC	58	150-158	3
		R: CATCGGCGACTGCACTGGA			
Lr10	AJ507523	F: GATCTTCAGCGCCAGCGTG	60	250-252	2
		R: GAGGACCTGCCCAGCATG			
Lr12	AJ507524	F: CACCGCTGCTGTCCATCA	58	159-165	4
		R: AGGTCGGCCAGATACACG			
Lr14b	AJ831434	F: TCACATGGGAACAACAAACC	58	168-174	3
		R: CCGCCGCTTACCCATCAC			
Lr20	AJ831435	F: GCCCGCTGCCGTCTGAC	58	144-146	2
		R: CAATAACTCAGCATGTGGAG			
Lr21	AJ831436	F: GATCAGAGGGTCAATGTGG	58	148-166	4
		R: CAGCAGAGTACTATGGAAGA			
Lr28	AM231177	F: TTCACGGACAGATTTGACCCAG	60	155-175	4
		R: AGTCTTTTCAGGAGATTAGCAG			
Lr29	AM231178	F: ACGTAAAGGTCACAAGCTGAAG	60	168-172	3
		R: AGCACGGTGTTTGTGTGCGAG			

ผลการทดลองและวิจารณ์

ข้อมูลความความแปรปรวนทางพันธุกรรม ผลการเปรียบเทียบปริมาณความแปรปรวนระหว่างประชากร ผลการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก และค่า effective population size (N_e)

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิคเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ที่จำนวน 8 ตำแหน่ง ในประชากรปลายี่สกเทศ 8 ประชากร (Table 1) ได้ข้อมูลความแปรปรวนทางพันธุกรรมของทั้ง 8 ประชากร พร้อมทั้งผลการเปรียบเทียบปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ผลการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก และค่า effective population size (N_e) ตามที่แสดงใน Table 3

ข้อมูลความแปรปรวนทางพันธุกรรม ซึ่งประกอบด้วยค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่งของ จำนวนแอลลีลที่ปรากฏ (A_a), effective number of alleles (A_e), allelic richness (A_r), ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o) และค่าคาดคะเนเฮเทอโรไซโกซิตี (H_e) ได้แก่ A_a = 2.1250 – 3.2500, A_e = 1.6342 – 2.2075, A_r = 2.0696 – 2.7714, H_o = 0.3183 – 0.5303 และ H_e = 0.3209 – 0.5031 ตามลำดับ ผลการเปรียบเทียบปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยค่าดังกล่าว พบว่า

ทุกค่าไม่แสดงนัยสำคัญในความแตกต่างระหว่างประชากร (P>0.05) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ ปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมของทุกประชากรอยู่ในระดับเดียวกัน หรือไม่แตกต่างกันในทุกประชากร ผลการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (ทั้งก่อนและหลังการปรับจีโนไทป์เนื่องจาก null allele) ปรากฏว่า ไม่มีการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (P_{HWE}>0.05) ไม่ว่าที่ประชากรใดๆ ทั้งสิ้น ส่วนค่า N_e ที่ประเมินในแต่ละประชากรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.5 – 109.5 ประชากรที่พบว่ามีค่า N_e ต่ำ ได้แก่ ประชากรเพาะเลี้ยงของ ศพจ.กาฬสินธุ์ (N_e = 1.5) และประชากรจากแม่น้ำเมย (N_e = 8.0) สำหรับการศึกษาครั้งนี้ แม้ว่าจะมีข้อจำกัดด้านจำนวนตัวอย่างอยู่บ้างในบางประชากร (8, 10 และ 14 ตัวอย่าง ในประชากรจากแม่น้ำมูล ศพจ. กาฬสินธุ์ และแม่น้ำเมย ตามลำดับ) แต่ผลการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ได้ระบุว่าทุกประชากรไม่มีการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ซึ่งนอกจากจะแสดงว่าไม่มีความแตกต่างระหว่าง H_o และ H_e ในทุกประชากรแล้ว ด้วยจำนวนตัวอย่างที่มีอยู่ยังสามารถแสดงถึงคุณสมบัติของประชากรที่อยู่ในสมดุล (ฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก) และแสดงถึงความเป็นหนึ่งเดียวกัน (homogeneity) ของตัวอย่างในแต่ละประชากร ซึ่งเป็นคุณสมบัติของการเป็นตัวแทนประชากรที่ดี ถึงแม้ตัวอย่างจะมีจำนวนเพียง 8-14 ตัวอย่างก็ตาม

ปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมในปลายี่สกเทศที่วิเคราะห์ได้ครั้งนี้ นอกจากจะไม่แตกต่างกันในทุกประชากรแล้ว ยังอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Alam *et al*. (2009)

Table 3 Per locus averages of genetic variabilities (A_a, A_e, A_r, H_o, H_e) in each of the 8 populations. *P* values show results of the among populations comparisons of the genetic variation. P_{HWE} values show results of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) tests overall of the 8 loci screened and the effective population sizes (N_e) estimated in each population.

Genetic variation	P_0	F_1	F_2	F_3	Kalasin center	Mun River	Bueng Si Fai	Moei River	*P*
Inds	50	50	50	100	10	8	30	14	
A_a	3.2500	3.1250	3.0000	3.2500	2.3750	2.1250	2.7500	2.5000	0.0660
	(0.2500)	(0.2266)	(0.2673)	(0.2500)	(0.4199)	(0.3504)	(0.2500)	(0.3273)	
A_e	2.1483	2.0551	2.1258	2.2075	1.6342	1.6955	1.8593	1.6809	0.5700
	(0.1771)	(0.2848)	(0.3357)	(0.2765)	(0.2200)	(0.2147)	(0.1987)	(0.2166)	
A_r	2.7714	2.5859	2.5756	2.7609	2.2286	2.0696	2.4583	2.2370	0.5430
	(0.2012)	(0.2687)	(0.2620)	(0.2036)	(0.3797)	(0.3317)	(0.2178)	(0.3208)	
H_o	0.5303	0.4334	0.4675	0.5222	0.3906	0.3423	0.4317	0.3183	0.6950
	(0.0692)	(0.0796)	(0.0786)	(0.0630)	(0.1294)	(0.1166)	(0.0835)	(0.0803)	
H_e	0.5031	0.4523	0.4603	0.5055	0.3209	0.3496	0.4291	0.3424	0.5580
	(0.0507)	(0.0725)	(0.0718)	(0.0544)	(0.0997)	(0.1037)	(0.0605)	(0.0907)	
P_{HWE}	0.2542	0.1306	0.1375	0.3466	0.2393	0.2937	0.0625	0.2375	-
N_e	63.8	109.5	50.3	51.1	1.5	60.5	69.0	8.0	-
95% CI	20.2-inf	26.1-inf	17.5-inf	24.6-152.6	0.6-78.8	24.8-inf	11.2-inf	2.1-406	

Values in parentheses are standard errors (±SE)

A_r values calculated using the smallest individual number of all populations (8)

P > 0.05 : no significant differences among the amount of population variations (A_a, A_e, A_r, H_o, H_e)

P_{HWE} > 0.05 : no significant differences between H_o and H_e under Hardy-Weinberg equilibrium

(A_a = 2.75 – 3.5, H_o = 0.38 – 0.46, H_e = 0.49 – 0.50) โดยได้ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 4 ตำแหน่ง (Lr3, Lr12, Lr14b, Lr21) ที่ถูกใช้ในการศึกษานี้ด้วยเช่นกัน (Table 2) มาศึกษาในประชากรปลายี่สกเทศจากแม่น้ำสายหลัก 3 สายของบังคลาเทศ ซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มประเทศที่เป็นแหล่งกำเนิดของปลาชนิดนี้ (Khan and Jhingran, 1975; Jhingran and Pullin, 1985) จากการศึกษาของ Alam *et al*. (2009) พบว่า ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปลายี่สกเทศในบังคลาเทศมีปริมาณค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับประชากรในอินเดีย เนื่องจากผลกระทบจากขนาดของประชากรเริ่มต้น (founder effect) หรือประชากรพ่อแม่พันธุ์ (effective population size, N_e) ที่มีขนาดเล็กลงมากโดยทันที จึงทำให้เกิด genetic drift ขึ้น (Allendorf, 1986) ในการศึกษาครั้งนี้ ผลการประเมินค่า N_e ของประชากรจากแม่น้ำเมย (ซึ่งเป็นแม่น้ำสายย่อยของแม่น้ำสาละวินในพม่า และเป็นพรมแดนธรรมชาติกั้นระหว่างไทยกับพม่า ที่ จ.ตาก) ระบุขนาดของประชากรพ่อแม่พันธุ์ที่มีจำนวนเพียง 8 ตัวเท่านั้น (N_e = 8.0) จึงน่าจะเป็นการสนับสนุนความเป็นไปได้ของการเกิด genetic drift ที่อาจเกิดกับประชากรแม่น้ำ (riverine population) ในประเทศพม่า เช่นเดียวกันกับที่เกิดในประชากรแม่น้ำของบังคลาเทศ (Alam *et al*., 2009) ภายใต้สภาพแวดล้อมที่คล้ายคลึงกัน ทั้งในด้านภูมิประเทศและการเป็นถิ่นกำเนิดของปลาชนิดเดียวกัน (Khan and Jhingran, 1975; Jhingran and Pullin, 1985)

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็นที่เข้าใจดีว่าประชากรพ่อแม่พันธุ์ควรมีจำนวนมากพอ หรือมีค่า N_e สูงพอสมควร เพื่อป้องกันและหลีกเลี่ยงการผสมเลือดชิด จากความสัมพันธ์ระหว่าง N_e กับอัตราการเกิดเลือดชิดที่แสดงโดย Tave (1993) ระบุชัดเจนว่า หาก N_e เท่ากับ 50 อัตราการเกิดเลือดชิดเกือบไม่มีเลย สอดคล้องกับ Kapuscinski and Miller (2007) ที่แนะนำว่า ประชากรพ่อแม่พันธุ์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควรมีค่า N_e ไม่ต่ำกว่า 50 สำหรับผลการประเมินค่า N_e ในประชากรที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงในการศึกษาครั้งนี้ ส่วนใหญ่มีค่า N_e มากกว่า 50 ยกเว้นประชากร ศพจ.กาฬสินธุ์ ที่มีค่า N_e เพียง 1.5 เท่านั้น จากข้อมูลพันธุ์ประวัติ (Table 1) ปลายี่สกเทศประชากรนี้มาจากการเพาะเลี้ยงและกระจายพันธุ์โดยกรมประมงเมื่อนานมาแล้ว โดยน่าจะเริ่มจากประชากรที่นำเข้าจากอินเดียตั้งแต่ในช่วงแรก (พ.ศ. 2511-2512) ดังนั้นจึงเป็นไปได้อย่างยิ่งที่ปลายี่สกเทศประชากรนี้จะสืบทอดมาจากการเพาะพันธุ์โดยใช้พ่อแม่จำนวนน้อยสืบต่อกันมาหลายรุ่น โดยที่จำนวนพ่อแม่พันธุ์ได้ลดลงเรื่อย ๆ ในการเพาะพันธุ์แต่ละรุ่น จนอาจเหลือเพียงไม่กี่ตัวที่เป็นพ่อแม่พันธุ์ของประชากรรุ่นปัจจุบัน

แม้ว่าผลการศึกษาในครั้งนี้จะระบุว่าปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรปลายี่สกเทศจากโรงเพาะฟัก (ประชากรเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์) ไม่มีความแตกต่างจากประชากรในธรรมชาติ และยังอยู่ในระดับเดียวกับที่มีการศึกษาไว้ในประชากรธรรมชาติของบังคลาเทศ (Alam *et al*., 2009) ซึ่งในด้านหนึ่งอาจสะท้อนให้เห็นถึงคุณภาพทางพันธุกรรมในเชิงบวกของประชากรโรงเพาะฟักในการเป็นพ่อแม่พันธุ์ (พนมและคณะ, 2548) แต่สำหรับประชากรของ ศพจ.กาฬสินธุ์ น่าจะเป็นข้อยกเว้นเนื่องจากประเมินค่า N_e ได้ต่ำมาก และถึงแม้ว่าในความเป็นจริง N_e ของประชากรในอุดมคติที่ได้จากการประเมินมักจะต่ำกว่าขนาดของประชากรพ่อแม่พันธุ์จริง (Kapuscinski and Miller, 2007) แต่ด้วยค่า N_e ที่ต่ำมากเพียง 1.5 จึงสมควรอย่างยิ่งที่ประชากรปลายี่สกเทศของ ศพจ.กาฬสินธุ์ จะต้องได้รับการเอาใจใส่ดูแลภายใต้การบริหารจัดการอย่างเคร่งครัด เพราะค่า N_e ที่ต่ำมากเป็นดัชนีที่สำคัญตัวหนึ่งที่

สะท้อนให้เห็นถึงศักยภาพทางพันธุกรรมของประชากร และประสิทธิภาพในการเป็นพ่อแม่พันธุ์ในระยะยาว ซึ่งอาจจะกำลังตกต่ำลงเนื่องจากการผสมเลือดชิด (inbreeding depression) จากการใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อยมากในการผลิตประชากรพ่อแม่พันธุ์ในรุ่นต่อๆ มา ในกรณีการบริหารจัดการประชากรของ ศพจ.กาฬสินธุ์ สามารถดำเนินการได้โดยนำเข้าพ่อแม่พันธุ์ปลายี่สกเทศจากต่างประชากรเข้ามาเพิ่มเติมในโรงเพาะฟัก ซึ่งในที่นี้ผลการวิเคราะห์ด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมระบุว่าทุกประชากรมีศักยภาพทัดเทียมกัน แต่หากพิจารณาเปรียบเทียบจากองค์ประกอบข้อมูลในแต่ละประชากรโดยละเอียดแล้ว พบว่าประชากรที่น่าสนใจมากที่สุดน่าจะได้แก่ประชากร F_3 ของ ศพก.อุตรดิตถ์ เนื่องจากเป็นประชากรโรงเพาะฟักที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์แล้ว 3 รุ่น และสืบทอดจากประชากรนำเข้าที่ต่างกัน (Table 1) โดยปรากฏค่า F_{st} ระหว่างคู่ประชากร (Table 4) และปริมาณความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยค่า A_a, A_e, A_r, H_o, H_e (Table 3) อยู่ในระดับที่สูงในภาพรวม แม้ว่าผลการทดสอบทางสถิติจะไม่แสดงนัยสำคัญในความแตกต่างก็ตาม

Table 4 Nei (1978)'s genetic distances (below diagonal) and F_{st} between each two of the populations (above diagonal)

Population	P_0	F_1	F_2	F_3	Kalasin Center	Mun River	Bueng Si Fai	Moei River
P_0		0.0062	0.0124	0.0265	0.0592	0.0174	0.0501	0.0434
F_1	0.0088		0.0073	0.0256	0.0636	0.0166	0.0570	0.0306
F_2	0.0184	0.0128		0.0206	0.0519	0.0168	0.0487	0.0313
F_3	0.0339	0.0319	0.0251		0.0800	0.0346	0.0390	0.0306
Kalasin Center	0.0712	0.0718	0.0630	0.1027		0.0382	0.0420	0.0853
Mun River	0.0439	0.0394	0.0436	0.0663	0.0349		0.0513	0.0216
Bueng Si Fai	0.0559	0.0606	0.0506	0.0538	0.0455	0.0577		0.0206
Moei River	0.0458	0.0347	0.0356	0.0532	0.0616	0.0343	0.0211	

ความสัมพันธ์ และความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

Figure 1 เป็นการแสดงโครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรปลายี่สกเทศ 8 ประชากร ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ข้อมูลค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของ Nei (1978) (Table 4, below diagonal) ซึ่งปรากฏชัดเจนว่า ประชากร P_0, F_1, F_2 และ F_3 ได้เกาะกลุ่มอยู่ด้วยกัน แสดงว่า ประชากรทั้ง 4 มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันภายในกลุ่มมากกว่าความสัมพันธ์กับประชากรอื่นๆ ภายใต้การกำหนดกลุ่มประชากรที่ควรจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันแยกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มประชากรที่น่าจะมาจากการนำเข้าในช่วงปี 2511-2512 (ศพจ.กาฬสินธุ์ แม่น้ำมูล บึงสีไฟ และแม่น้ำเมย) และกลุ่มประชากรจากการนำเข้าในปี 2541 (P_0, F_1, F_2 และ F_3) แล้ววิเคราะห์ค่า variance components และความแตกต่างทางพันธุกรรม 3 ระดับ คือ ความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มประชากร (F_{ct} และ V_a) ระหว่างประชากรภายในกลุ่ม (F_{sc} และ V_b) และระหว่างประชากรภายในประชากรทั้งหมด (F_{st} และ V_c) ปรากฏผล

ตามที่แสดงไว้ใน Table 5 ค่า variance components ใน Table 5 ระบุว่าปริมาณความแตกต่างที่ปรากฏเกือบทั้งหมดเป็นความแตกต่างระหว่างประชากรภายในประชากรทั้งหมด (V_c = 95.83%) ซึ่งตรงกับค่า *P*-values ที่แสดงผลการวิเคราะห์ทั้งหมด โดยระบุว่าไม่มีนัยสำคัญในความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มประชากรที่กำหนด (P_{Fct}>0.02) แต่มีนัยสำคัญในความแตกต่างระหว่างประชากรภายในกลุ่มที่กำหนด (P_{Fsc}<0.02) และในประชากรทั้งหมด (P_{Fst}<0.02) แสดงว่า ประชากรทั้งหมดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือไม่แบ่งกลุ่มกัน แต่มีความแตกต่างระหว่างประชากรที่อยู่ภายในกลุ่มเดียวกันนี้ และเมื่อวิเคราะห์แต่ละคู่ประชากร (Table 6) พบว่าความแตกต่างดังกล่าว มีทั้งระหว่างคู่ประชากรที่ได้กำหนดความสัมพันธ์ไว้ในกลุ่มเดียวกัน (P_0 กับ F_3) และต่างกลุ่มกัน (บึงสีไฟ กับ P_0 และ บึงสีไฟ กับ F_1) (P_{Fst}<0.0007, Bonferroni correction)

นอกจากนี้ การวิเคราะห์ความแตกต่างโดยค่า F_{st} ในทุกคู่ประชากร (Table 4, above

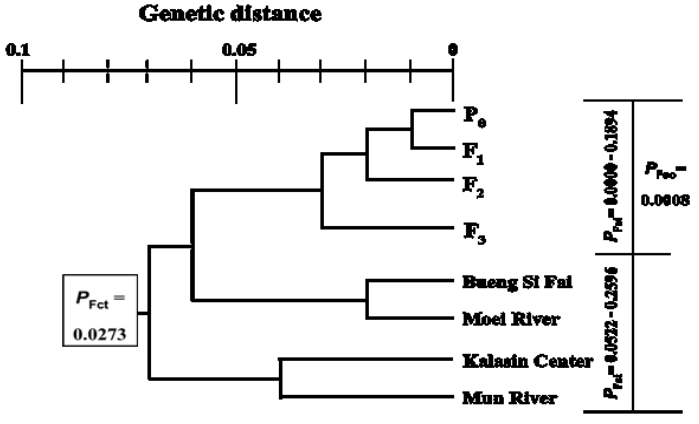

Figure 1 Phylogenetic dendrogram of 8 rohu populations constructed by UPGMA using Nei (1978)'s genetic distances. The P_{Fct}, P_{Fsc} and P_{Fst} are the ones shown in Tables 5 and 6. (P_{Fct}>0.02: no significant differences found among the groups determined, P_{Fsc}<0.02: significant differences found within the groups determined, and P_{Fst}<0.0007: significant differences found between two of the populations)

Table 5 Variance components (V: V_a, V_b and V_c), F-statistics (F_{ct}, F_{sc}, and F_{st}) and the *P* values showing differences among groups (P_{Fct}), between populations within groups (P_{Fsc}) and within total populations (P_{Fst})

Variance components	V_a	V_b	V_c	$V = V_a+V_b+V_c$
	0.0444 = 1.97%	0.0494 = 2.20%	2.1575 = 95.83%	2.2513 = 100%
F-statistics	$F_{ct} = V_a/V$	$F_{sc} = V_b/(V_b+V_c)$	$F_{st} = (V_a+V_b)/V$	
	0.0197	0.0224	0.0417	
P-values	P_{Fct}	P_{Fsc}	P_{Fst}	
	0.0273	0.0008	0.0000	

P<0.02: having significant difference (Fu, 1997; Excoffier *et al*., 2006)

diagonal) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ (P_{Fst}) ตาม Table 6 ระบุว่าไม่มีความแตกต่างในทุกคู่ประชากรของ ศพจ.กาฬสินธุ์ แม่น้ำมูล บึงสีไฟ และแม่น้ำเมย (P_{Fst}>0.0007, Bonferroni correction) ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวสอดคล้องและสนับสนุนสมมุติฐานตามที่ได้ให้ข้อมูลไว้ (Table 1) ว่าประชากร ศพจ. กาฬสินธุ์ แม่น้ำมูล บึงสีไฟ และแม่น้ำเมย อยู่ในกลุ่มที่สืบทอดหรือมีความใกล้ชิดกับประชากรที่นำเข้าในช่วงปี 2511-2512 และจากผลการศึกษาใน Figure 1 ซึ่งระบุความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอย่างใกล้ชิดระหว่างประชากร P_0, F_1, F_2 และ F_3 มากกว่ากับประชากรอื่น เป็นการยืนยันต้นกำเนิดของประชากร P_0, F_1, F_2 และ F_3 ว่ามาจากประชากรเดียวกันที่นำเข้าในช่วงปี 2541

Table 6 Results of the between each pair of population differences shown by the P_{Fst} (above diagonal) and the symbols '+' or '-' (below diagonal), under Bonferroni correction (P_{Fst} = 0.02/28 tests = 0.0007)

Population	P_0	F_1	F_2	F_3	Kalasin Center	Mun River	Bueng Si Fai	Moei River
P_0		0.1771	0.0596	0.0000	0.0147	0.2147	0.0000	0.0188
F_1	−		0.1894	0.0033	0.0204	0.2498	0.0000	0.0735
F_2	−	−		0.0074	0.0294	0.2743	0.0025	0.0735
F_3	+	−	−		0.0114	0.0710	0.0025	0.0367
Kalasin Center	−	−	−	−		0.2596	0.0727	0.0522
Mun River	−	−	−	−	−		0.0710	0.3461
Bueng Si Fai	+	+	−	−	−	−		0.1910
Moei River	−	−	−	−	−	−	−	

P_{Fst}<0.0007 and '+' showing significant difference

P_{Fst}>0.0007 and '−' showing non-significant difference

ความแตกต่างระหว่างรุ่นประชากรปลายี่สกเทศในโปรแกรมการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์

สำหรับปลายี่สกเทศเฉพาะประชากรที่อยู่ในโปรแกรมการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ของ ศพก.อุตรดิตถ์ คือ P_0, F_1, F_2 และ F_3 จากผลการวิเคราะห์ที่แสดงใน Table 6 พบว่า ระหว่างคู่ประชากรรุ่น P_0 กับ F_3 เพียงคู่เดียวที่ปรากฏว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ (P_{Fst}<0.0007, Bonferroni correction) ในขณะที่การแสดงออกโดยลักษณะการเจริญเติบโตที่รายงานโดย วิศณุพร และคณะ (2552) จากการศึกษาในประชากรเดียวกัน พบว่า การเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นทั้งโดยน้ำหนักและความยาวของประชากรรุ่น F_2 และ F_3 แม้จะไม่แสดงนัยสำคัญในความแตกต่างซึ่งกันและกัน แต่ทั้งสองรุ่นแสดงการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นมากกว่ารุ่น P_0 และ F_1 ทั้งโดยน้ำหนักและความยาว ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าภายใต้โปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ปลายี่สกเทศโดยการคัดเลือกแบบหมู่ของ ศพก.อุตรดิตถ์ ตั้งแต่รุ่น P_0 ถึง F_3 มีผลให้ปลายี่สกเทศมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นทั้งโดยน้ำหนักและความยาว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างรุ่นแล้วจะเริ่มปรากฏให้เห็นความแตกต่างของการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นในรุ่น F_2 ในขณะที่พันธุกรรมของประชากรเริ่มปรากฏว่ามีความแตกต่างออกไปจากรุ่นพ่อแม่ (P_0) ในรุ่น F_3

อย่างไรก็ดี ผลจากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของความถี่แอลลีลที่ทุกตำแหน่งในทุกประชากร ตั้งแต่รุ่น P_0 จนถึง F_3 ได้แสดงให้เห็นถึง

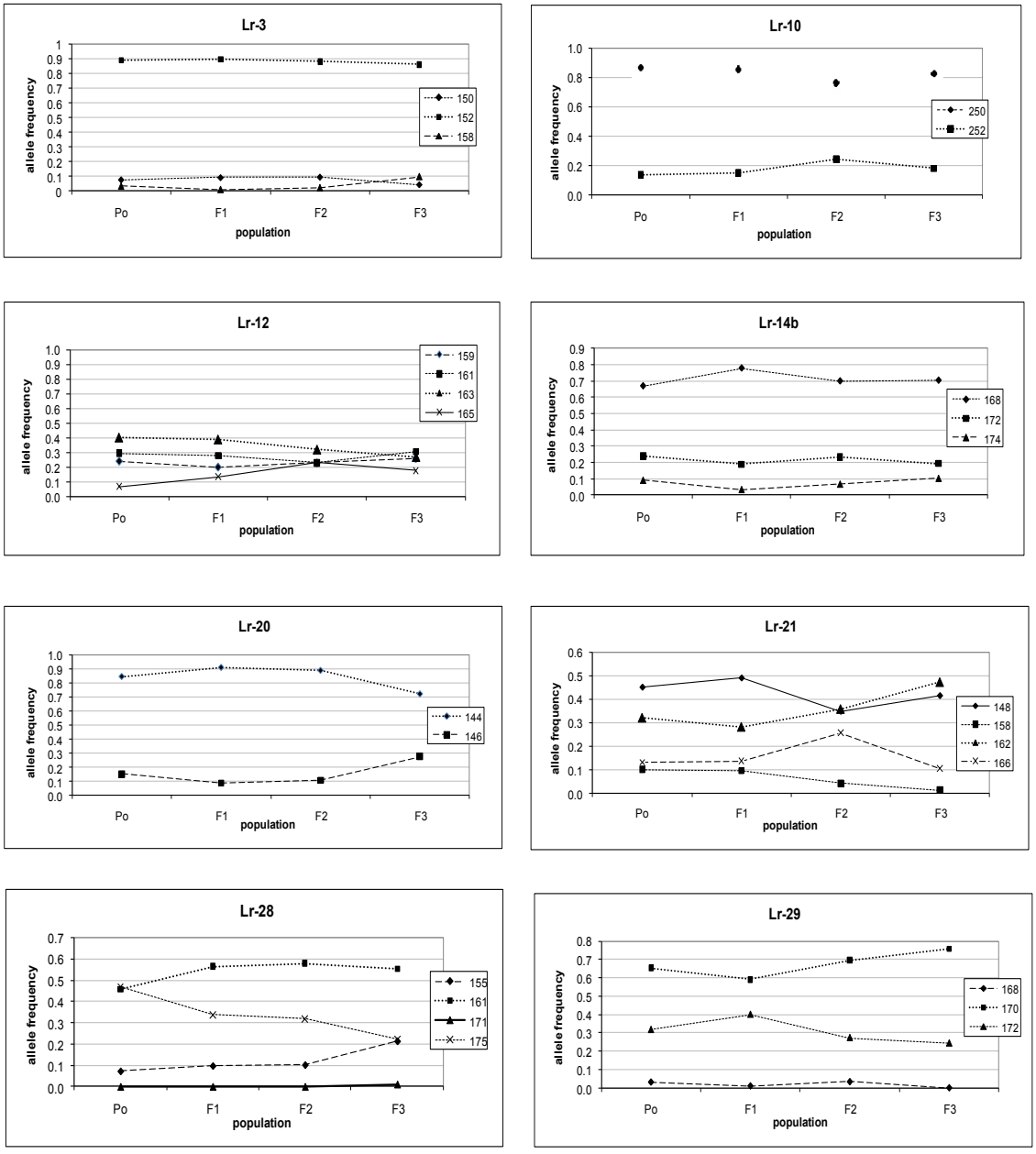

Figure 2 Changes of allele frequencies at each of the 8 microsatellite loci (Lr3, Lr10, Lr12, Lr14b, Lr20, Lr21, Lr28 and Lr29) in the P_0, F_1, F_2, and F_3 populations. The numbers shown in a marker-line box of each subfigure are allelic base pairs.

การเปลี่ยนแปลงของความถี่แอลลีลโดยรวมทั้งในทางเพิ่มขึ้น และลดลง (Figure 2) และจากการทดสอบ genotypic linkage disequilibrium (ไม่ได้แสดงผล) พบความไม่สมดุลของการเชื่อมโยงจีโนไทป์ระหว่างตำแหน่งในทุกประชากร หรืออีกนัยหนึ่ง การกระจายตัวของจีโนไทป์ไม่เป็นอิสระต่อกัน

แสดงว่าการคัดเลือกมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมโดยการไปเพิ่มในบางจีโนไทป์ และทำให้บางจีโนไทป์ลดลงด้วยในขณะเดียวกัน จึงทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงความถี่ของบางแอลลีลในทางเพิ่มขึ้น และบางแอลลีลในทางลดลง (Figure 2) อีกทั้งผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ประชากร (Table 6) มีความสอดคล้องและยืนยันการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว โดยได้ปรากฏนัยสำคัญในพันธุกรรมที่แตกต่างออกมาในรุ่น F_3

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจากการคัดเลือกดังกล่าว เกิดขึ้นภายใต้การเพาะพันธุ์โดยใช้จำนวนพ่อแม่ในแต่ละรุ่นอยู่ระหว่าง 50 – 73 คู่ (P_0, F_1, F_2 และ F_3 จำนวน 50, 50, 73 และ 50 คู่ ตามลำดับ) จำนวนพ่อแม่ซึ่งไม่น้อยกว่า 50 นี้สอดคล้องกับค่า N_e ที่ประเมินได้ (Table 3) ประกอบกับจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างรุ่น ไม่ปรากฏผลให้เห็นว่ามีความแตกต่างกัน หรือมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จึงแสดงว่าการใช้พ่อแม่พันธุ์ในจำนวนที่ไม่น้อยกว่า 50 ดังกล่าว น่าจะช่วยป้องกันการเกิดเลือดชิด (Tave,1993; Kapuscinski and Miller, 2007) ซึ่งเป็นต้นเหตุสำคัญของการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรโรงเพาะฟัก ได้ดีในระดับหนึ่ง

อย่างไรก็ตาม ภายใต้โปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ดังกล่าว โดยเฉพาะเมื่อการคัดเลือกผ่านรุ่น F_3 ไปแล้ว แนะนำว่าควรให้การเอาใจใส่ต่อศักยภาพทางพันธุกรรมของประชากรพ่อแม่พันธุ์เป็นพิเศษ โดยควรวางแนวทางในการจัดการพ่อแม่พันธุ์อย่างเคร่งครัด เพื่อป้องกันและรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ผ่านการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์มาแล้วถึง 3 รุ่นนี้ไว้ให้คงอยู่นานที่สุด ซึ่งในกรณีนี้สามารถดำเนินการได้โดยคงค่า N_e หรือจำนวนพ่อแม่ปลาที่ใช้ในการเพาะพันธุ์ไว้ให้สูงไม่น้อยกว่า 50 คู่ ในอัตราส่วน เพศผู้:เพศเมีย = 1:1 แยกผสมเป็นคู่และเลี้ยงลูกปลาแยกครอบครัว เมื่อต้องการเพาะพันธุ์ให้สุ่มปลาจากแต่ละครอบครัวมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในจำนวนเท่าๆ กัน (อุทัยรัตน์, 2538; Kapuscinski and Miller, 2007) นอกจากนี้ควรมีการตรวจวัดปริมาณความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรพ่อแม่พันธุ์รุ่นต่อๆ มา พร้อมทั้งเฝ้าสังเกตและติดตามเก็บข้อมูลลักษณะสำคัญต่างๆ ที่แสดงออกด้านการเพาะเลี้ยง เช่น การเจริญเติบโต อัตรารอด ฯลฯ ควบคู่กันไปด้วยอย่างใกล้ชิด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดกาฬสินธุ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างครีบปลายี่สกเทศ คุณอุดม ติดไชย หัวหน้าด่านตรวจสัตว์น้ำจังหวัดตาก และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพิจิตร ที่ช่วยเก็บตัวอย่างครีบปลายี่สกเทศในภาคสนาม ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมโมเลกุลสัตว์น้ำ สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้เสร็จสมบูรณ์ งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากกรมประมง ในส่วนกิจกรรมพัฒนาการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์ภายใต้โครงการ “เปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ในประชากรปลายี่สกเทศรุ่นต่างๆ ที่ได้จากการคัดเลือกแบบหมู่” รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 54-0600-54063

เอกสารอ้างอิง

ชวลิต วิทยานนท์ จรัสธาดา กรรณสูต และ จารุจินต์

นภีตะภัฏ (2540) ความหลากชนิดของปลาน้ำจืดในประเทศไทย. สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม กรุงเทพฯ.

พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข ศรีรัตน์ สอดศุข ธนัญช์ สังกรธนกิจ พลชาติ ผิวเณร และ ภูวนัย ชัยศรี (2552) ความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างระหว่างประชากรในปูม้าจากแหล่งธรรมชาติของไทยโดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์และการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโต. เอกสารวิชาการฉบับที่ 10/2552 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข สุภัทรา อุไรวรรณ์ และศรีรัตน์ สอดศุข (2548) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายในกระบวนการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 5/2548 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์ สุภัทรา อุไรวรรณ์ สมนึก คงทรัตน์ โสภิต แก้วชนะ ทองอยู่ อุดเลิศ และศรีจรรยา สุขมโนมนต์ (2552) การคัดเลือกแบบหมู่เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของปลายี่สกเทศ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 7/2552 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อภิชาต เติมวิชชาการ ชวลิต วิทยานนท์ ยู่อี้ เกตเพชร ประเทศ ซอรักษ์ และ ประเสริฐ ภราดรพานิชกุล (2546) สัตว์น้ำต่างถิ่นในประเทศไทย. เอกสารเผยแพร่สำนักบริหารจัดการด้านการประมง ร่วมกับสถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อุทัยรัตน์ ณ นคร (2538) พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม.

Alam MS, Jahan M, Hossain MM and Islam MS (2009) Population genetic structure of three major river populations of Rohu, *Labeo rohita* (Cyprinidae: Cyprinoformes) using microsatellite DNA markers. Genes & Genomics 31: 43–51.

Allendorf FW (1986) Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. Zoo Biol 5: 181–190.

Alonso S and Armour JAL (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 CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME and Van der Noordaa J (1990) Rapid and simple methods for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 28: 495–503.

Das P, Barat A, Meher PK, Ray PP and Majumdar D (2005) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Labeo rohita* and their cross-species amplification in related species. Mol Ecol Notes 5: 231–233.

Duangswasdi S and Pupipat T (1982) Summary on life history of introduced fish species. Technical Paper No 7 National Inland Fisheries Institute, Freshwater Fisheries Division, Department of Fisheries (in Thai).

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, http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3 (30 September 2013).

Frankham R, Ballou JD and Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge.

Fu YX (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 Fstatistics. J Hered 86: 485–486.

Holsinger KE (2012) Tajima's *D*, Fu's F_s, Fay and Wu's *H*, and Zeng et al.'s *E*, http://darwin.eeb.uconn.edu/eeb348/lecture-notes/molevol-tajima.pdf (30 September 2013).

Höss M (1994) More about the silica method. Ancient DNA Newsl 2: 10–12.

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

Jhingran VG and Pullin RSV (1985) A Hatchery Manual for the Common, Chinese and Indian Major Carps. ICLARM Contribution No 252. The Asian Development Bank and the International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.

Kapuscinski AR and Miller LM (2007) Genetic Guidelines for Fisheries Management. 2nd ed. University of Minnesota Sea Grant Program, University of Minnesota, USA, http://www.seagrant.umn.edu/downloads/f22.pdf (30 September 2013).

Kemp BM, Monroe C and Smith DG (2006) Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. J Archaeol Sci 33: 1680–1689.

Khan HA and Jhingran VG (1975) Synopsis of biological data on Rohu *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). FAO Fisheries Synopsis No 111. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Kim JE, Withler RE, Ritland C. and Cheng KM (2004) Genetic variation within and between domesticated Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, strains and their progenitor populations. Environ Biol Fish 69: 371–378.

Lui ZJ and Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238: 1–37.

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583–590.

Norris AT, Bradley DG and Cunningham EP (1999) Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. Aquaculture 180: 247–264.

Patel A, Das P, Swain SK, Meher PK, Jayasankar P and Sarangi N (2009) Development of 21 new microsatellite markers in *Labeo rohita* (rohu). Anim Genet 40: 251–254.

Queller DC, Strassmann JE and Hughes CR (1993) Microsatellites and kinship. Tree 8: 285–288.

Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43: 223–225.

Smouse PE, Neel JV 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.

Sokal RR and Rohlf FJ (1981) Biometry. 2nd ed. WH Freeman, San Francisco.

SPSS Inc (1999) SPSS Base 10.0 for Windows User's Guide. SPSS Inc, Chicago, IL.

Tave D (1993) Genetics for Fish Hatchery Managers. 2nd ed, Kluwer Academic Publishers, Boston.

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.

Waples RS and Do C (2008) LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. Mol Ecol Resour 8: 753–756.

Ward RD, Woodwark M and Skibinski DOF (1994) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fishes. J Fish Biol 44: 213–232.

Yeh FC, Yang R and Boyle T (1999) POPGENE Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, http://ualberta.ca/~fyeh/ (30 September 2013).