

ระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมประชากรปลาเลียหินในลำน้ำย่าง (ลำน้ำสาขาแม่น้ำน่าน) กรณีศึกษาน้ำตกศิลาเพชร จ.น่าน

Genetic Variation of *Garra cambodgiensis* at Yang River (Tributary of Nan River): A Case Study of Silaphet Waterfall, Nan Province

ชาวลีชัย ใจสุข¹, พัชรา นิธิโรจน์ภักดี^{2*}, อมรชัย ล้อทองคำ¹ และ เจนจิรา ลานแก้ว¹

Chaowalee Jaisuk¹, Patchara Nithirojpkadee^{2*}, Amornchai Lothongkham¹ and Janejira Lankaew¹

Received: 17 March 2020, Revised: 2 September 2020, Accepted: 16 September 2020

บทคัดย่อ

การศึกษาระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปลาเลียหินในลำน้ำย่างเกิดจากข้อสังเกตที่พบปลาเลียหินในน้ำตกศิลาเพชรมีขนาดเล็กกว่าลำน้ำอื่นและคาดว่าเป็นผลจากพันธุกรรมเนื่องจากประชากรที่อยู่ในพื้นที่จำกัดอาจมีประชากรขนาดเล็กส่งผลให้เกิดเลือดชิดอาจจะแสดงออกมาในลักษณะของการถดถอยทางพันธุกรรมซึ่งการมีขนาดตัวที่เล็กของปลาเป็นลักษณะหนึ่งที่น่าจะสะท้อนถึงการมีเลือดชิดในประชากร การศึกษานี้จึงวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเลียหินจาก 3 จุดรวบรวมตัวอย่าง ได้แก่ น้ำตกศิลาเพชร บ้านคอนมูล และบ้านยู ซึ่งเป็นเส้นทางที่ลำน้ำย่างไหลผ่านก่อนบรรจบกับแม่น้ำน่าน โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ 5 ตำแหน่ง ผลการศึกษาพบความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในของปลาทั้ง 3 กลุ่มไม่ต่างกัน ($p > 0.05$) ค่า Effective population size (N_e) ของทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่างมีขนาดใหญ่และไม่พบสถานะคอขวดในทุกกลุ่ม พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่าง (ค่า Global $F_{ST} = 0.01189$; AMOVA, $p = 0.01466$) ระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุดระหว่างน้ำตกศิลาเพชรกับบ้านคอนมูล มีค่าเท่ากับ 0.241 เช่นเดียวกับค่า pairwise F_{ST} พบความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างนี้ ผลการจัดกลุ่มและการถ่ายเทยีนพบสมาชิกของทั้ง 3 กลุ่มมีการปะปนในระดับพันธุกรรมและไม่แยกออกจากกัน พบความสัมพันธ์ระหว่างความต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรกับระดับ

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา วิทยาเขตน่าน ตำบลฝายแก้ว อำเภอภูเพียง จังหวัดน่าน 55000

¹ Faculty of Science and Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Lanna, Nan Campus, Fai Kaeo, Phu Phiang, Nan 55000, Thailand.

² คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี ตำบลพลวง อำเภอเขาชะเมา จันทบุรี 22210

² Faculty of Argo-Industrial Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-Ok, Chanthaburi Campus, Pluang, Khao Khitchakut, Chanthaburi 22210, Thailand.

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): patchara_ni@rmutto.ac.th

เครือข่ายแม่น้ำ (stream tree) $R^2 = 0.728$ แสดงถึงอิทธิพลของโครงข่ายแหล่งน้ำมีผลต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรม

คำสำคัญ: ปลาเลียหิน, พันธุกรรม, ไมโครแซทเทลไลท์, ลำน้ำย่าง, แม่น้ำน่าน

ABSTRACT

The question of this research derived from personal observation on the distinctively smaller size of *Garra cambodgiensis* at Silaphet Waterfall compared to those in other rivers. We hypothesized that the phenotype might be caused by the genetic effects. The small population size and absence of gene flow can lead to inbreeding and reduction in genetic diversity. Small body size of fish is one sign of inbreeding. Therefore, this study aimed to assess the genetic variation of *G. cambodgiensis* from three sites: Silaphet Waterfall, Donmoon, and Yuu in the Yang River, Nan province by using five polymorphic microsatellite loci. The genetic diversity of *G. cambodgiensis* from 3 sites was not significantly different ($p > 0.05$). The Effective population size (N_e) in three samples was large and there was no evidence for recent bottleneck events in these populations. The genetic differentiation, the Analysis of Molecular variance (AMOVA) was Fixation index = 0.01189 ($p = 0.01466$). The genetic distance was the highest (0.241) between Silaphet and Donmoon. According to the pairwise F_{ST} , the Silaphet was significantly different from Donmoon. The cluster and gene flow analysis found that the admix genetic and 3 samples were not distinguished. Pattern of genetic differentiation can be explained by the contemporary stream network $R^2 = 0.728$. We discuss the results on the hydrological complexity that may imprint upon patterns of genetic variation of *G. cambodgiensis* in the Yang River.

Key words: *Garra cambodgiensis*, genetic, microsatellite, Yang River, Nan River

บทนำ

น้ำตกศิลาเพชรเป็นบริเวณที่ต่อมาจากต้นน้ำอย่างซึ่งเป็นลำน้ำสาขาหนึ่งของแม่น้ำน่านมีสภาพเป็นแก่ง น้ำไหลแรง มีโขดหินขนาดใหญ่ บริเวณโดยรอบเป็นพื้นที่ป่า บริเวณนี้จึงจัดเป็นแหล่งท่องเที่ยวที่ได้รับความนิยม นอกจากนั้นในทางนิเวศน้ำตกศิลาเพชรเป็นแหล่งอาศัยของปลาท้องถิ่นหลากหลายชนิด สำหรับการศึกษาที่มีความสนใจพันธุกรรมปลาเลียหิน (*Garra cambodgiensis*) เนื่องจากเป็นปลาที่มีการแพร่กระจายกว้างพบได้ในทุกลำน้ำสาขาของ

แม่น้ำน่าน Jaisuk *et al.* (2015) คาดว่าเป็นผลมาจากการชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปลาเลียหินที่มีฤดูผสมพันธุ์วางไข่ในช่วงฤดูน้ำหลาก พ่อแม่พันธุ์จะถูกน้ำพัดมารวมกันในบางบริเวณที่เหมาะสมต่อการวางไข่ เช่น บริเวณลำห้วย หรือนาข้าวและประกอบกับไข่ของปลาชนิดนี้เป็นไข่ครึ่งจมครึ่งลอยดังนั้นหลังจากที่ไข่ได้รับการปฏิสนธิแล้วไข่จึงมีโอกาที่จะถูกพัดพาไปกับกระแสน้ำ สำหรับกรณีศึกษาปลาเลียหินบริเวณน้ำตกศิลาเพชรในลำน้ำย่างสืบเนื่องมาจากการดำเนินงานเพาะพันธุ์ปลาเลียหินในปี พ.ศ. 2557

ได้นำพ่อ แม่พันธุ์ปลาเลียหินจากบริเวณน้ำตกศิลาเพชรมาเป็นพ่อ แม่พันธุ์ในการเพาะพันธุ์เพื่อปล่อยลูกพันธุ์ลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ พบข้อสังเกตที่พ่อ แม่พันธุ์ปลาเลียหินในบริเวณดังกล่าวมีขนาดเล็กโดยมีความยาวเฉลี่ย 3-5 เซนติเมตร ในขณะที่พ่อ แม่พันธุ์ปลาเลียหินในลำน้ำอื่นมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 6-9 เซนติเมตร และพบลักษณะปลาที่มีลำตัวคดงอจำนวนหนึ่ง ซึ่งลักษณะตามที่กล่าวมาในเบื้องต้นเป็นลักษณะที่อาจเป็นผลมาจากระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมเนื่องจากการที่ประชากรมีขนาดเล็กมีความเป็นไปได้ที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำซึ่งส่งผลให้เกิดเลือดชิดในประชากรนั้นๆ ปลาในบริเวณน้ำตกศิลาเพชรถูกจำกัดพื้นที่การแพร่กระจายเนื่องจากมีสิ่งกีดขวางเป็นน้ำตกและฝายกั้นน้ำ ดังผลจากการศึกษาอื่นๆ เช่น Yamamoto *et al.* (2004) ปลา White-spotted charr (*Salvelinus leucomanis*) ในแม่น้ำบริเวณที่มีเขื่อนความสูงตั้งแต่ 2-23 เมตร กั้นระหว่างลำน้ำเป็นเวลานานอย่างน้อย 8-36 ปี พบว่าระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมประชากรบริเวณเหนือเขื่อนมีค่าต่ำกว่าประชากรใต้เขื่อนเป็นผลมาจากประชากรเหนือเขื่อนถูกจำกัด การถ่ายเทยีน เช่นเดียวกับ Leclerc *et al.* (2008) ปลา *Perca flavescens* ใน Saint Lawrence River ประเทศแคนาดาที่พบว่าการมีเขื่อนขวางกั้นลำน้ำส่งผลต่อโครงสร้างพันธุกรรมของประชากร เช่นเดียวกับรายงานของ Jaisuk and Senanan (2018a) ที่ได้ศึกษาผลของสิ่งกีดขวางต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปลาเลียหิน (*G. cambodgiensis*) บริเวณลำน้ำปับ อ.บ่อเกลือ จ.น่าน พบว่ากลุ่มตัวอย่างปลาเลียหินที่อยู่เหนือน้ำตกสะปัน ซึ่งเป็นน้ำตกที่มีความสูง 10 เมตร มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างต่ำและมีความต่างทางพันธุกรรมจากปลา เลียหินที่อยู่ในบริเวณใต้น้ำตก ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวแสดงผลของการมีสิ่งกีดขวางจำกัดการเคลื่อนที่และโอกาสการ

แลกเปลี่ยนพันธุกรรมกับกลุ่มประชากรอื่น ส่งผลต่อระดับพันธุกรรมที่ค่อนข้างต่ำและเกิดความต่างทางพันธุกรรมระหว่างปลาที่อยู่เหนือและใต้อสิ่งกีดขวาง นอกจากนั้น Neville *et al.* (2009) พบว่าคุณภาพของแหล่งที่อยู่และขนาดของพื้นที่มีผลต่อการพบความต่างของค่าเฉลี่ยความหลากหลายของอัลลีล (allelic richness; A_i) และ gene diversity (H_e) ของปลาเทร้า ในแม่น้ำ Boise และ Payette, Idaho, ประเทศสหรัฐอเมริกา

ดังนั้นเพื่ออธิบายถึงการพบลักษณะปรากฏในปลาเลียหินบริเวณน้ำตกศิลาเพชร การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปลาเลียหินในบริเวณน้ำตกและบริเวณอื่นๆ ในลำน้ำอย่าง โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์พันธุศาสตร์ประชากรเพื่อทราบถึงระดับพันธุกรรมและข้อมูลระดับพันธุกรรม (Jaisuk and Senanan, 2018b; Neville *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2004) ซึ่งเป็นประโยชน์ในวางแผนการอนุรักษ์พันธุกรรมและการเพาะพันธุ์ปลาเลียหินเพื่อปล่อยลูกพันธุ์คืนสู่แหล่งน้ำโดยไม่ส่งผลกระทบต่อระดับพันธุกรรมของประชากรธรรมชาติ

วิธีดำเนินการวิจัย

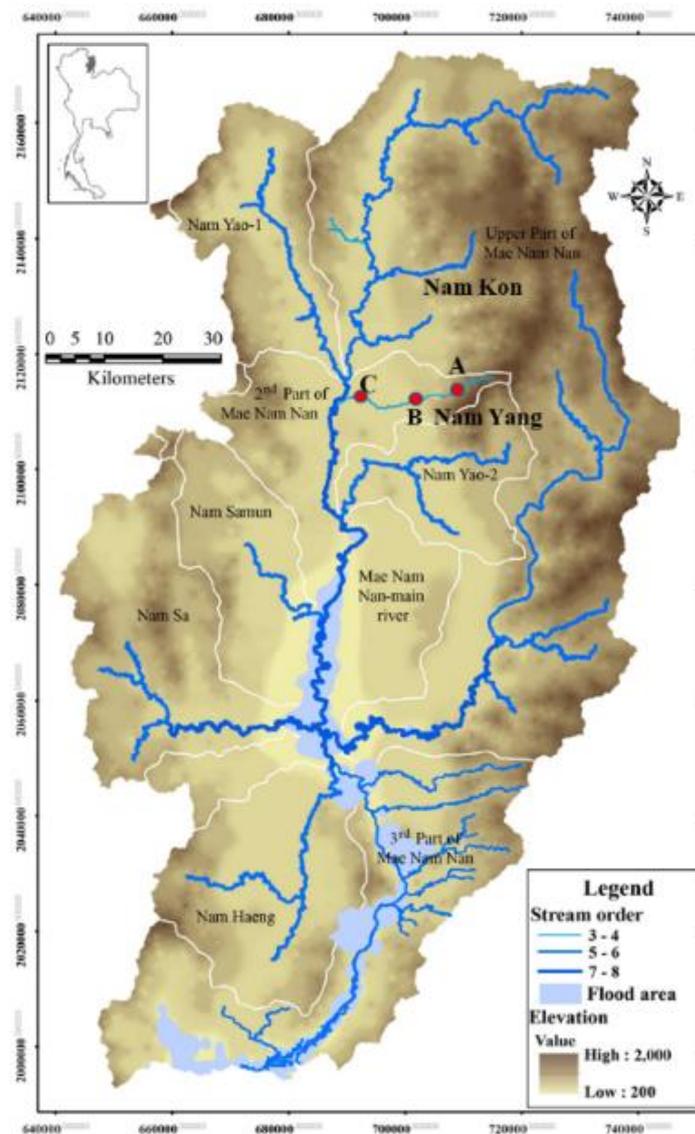
1. การเก็บตัวอย่างภาคสนาม

รวบรวมตัวอย่างปลาเลียหินบริเวณน้ำตกศิลาเพชรและตลอดลำน้ำอย่างได้แก่ น้ำตกศิลาเพชร บ้านดอนมูล บ้านผู้ รวมเป็นระยะทาง 15 กิโลเมตร (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) จับปลาด้วยแหและเมื่อได้ตัวอย่างปลาใช้ผ้าขนหนูชุบน้ำจับตัวปลาเพื่อไม่ให้คื่น สลับปลาด้วยน้ำมันกานพลูแล้วจึงตัดครีบบางปลาขนาด 0.5 เซนติเมตร หลังจากตัดครีบบางทาบยาโพวิโดน ไอโอดีนก่อนปล่อยคืนสู่แหล่งน้ำในบริเวณ

เดิม เก็บรักษาตัวอย่างคริบหางในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 1 จุดรวบรวมตัวอย่างปลาเลียหิน (*Garra cambodgiensis*) ในลำน้ำย่าง

จุดรวบรวม ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง (ตัว)	สภาพพื้นที่/สภาพลำน้ำ	พิกัดจุดรวบรวมตัวอย่าง (UTM)	
			X (ทางตะวันออก)	Y (ทางเหนือ)
น้ำตกศิลาเพชร (A)	42	พื้นที่ป่า/น้ำตกลักษณะเป็นแก่ง น้ำไหลเชี่ยว	705554	2112381
บ้านคอนมูล (B)	32	พื้นที่เกษตรกรรม/ลำน้ำไหลเอื่อย	702881	2111623
บ้านยู (C)	26	พื้นที่เกษตรกรรม/ลำน้ำไหลเอื่อย	693331	2111732



ภาพที่ 1 จุดรวบรวมตัวอย่างปลาเลียหิน (*Garra cambodgiensis*) ในลำน้ำย่าง

น้ำตกศิลาเพชร (A) บ้านคอนมูล (B) บ้านยู (C) ระยะทางระหว่าง A-B=3 กม., A-C=15 กม., B-C=12 กม.

2. การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Salt extraction คัดแปลงจากวิธีของ Aljanabi and Martinez (1997) วัดปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1% ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอน (BIO-RAD SubcellGT, Italy) และผ่านกระแสไฟฟ้า 70 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสีย้อมดีเอ็นเอ (FluoroVue Nucleic Acid Gel Stain, SMOBIO, Malaysia) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) โดยเครื่อง Thermal cycle (BioRad, MJ Mini Cycler, Italy) ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่งที่ได้มีการติดแถบสีฟลูออเรสเซนต์ ได้แก่ GC203 (Jaisuk *et al.*, 2014a), HOLN (Kirchner *et al.*, 2014), Gar3, Gar6 และ Gar13 (Su *et al.*, 2013) (ตารางที่ 2) สารละลายพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร), ใช้สารละลายพีซีอาร์ (i-taq PCR Master mix Solution, iNtRON BIOTECHNOLOGY, Gyeonggi-do, เกาหลีใต้) 5 ไมโครลิตรไพรเมอร์ Forward และ Reverse อย่างละ 0.2 ไมโครโมล วัฏจักรประกอบด้วย 1. อุณหภูมิที่

ให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน (pre denaturation) 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ 2. อุณหภูมิที่ทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน (denaturation) 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 3. อุณหภูมิที่ไพรเมอร์มาเกาะกับสายดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับทุกไพรเมอร์ (annealing temperature; T_a) 54 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ 4. อุณหภูมิที่ Taq Polymerase ซ่อมสายดีเอ็นเอให้สมบูรณ์เป็นดีเอ็นเอเส้นใหม่ (extension temperature) 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (ข้อ 2-4 จำนวน 40 รอบ) และ 5. อุณหภูมิซ่อมสายดีเอ็นเอให้สมบูรณ์ (final extension) 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยนำสารละลายพีซีอาร์มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสผ่าน polyacrylamide gel 6 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมชนิดแนวตั้ง (Mini PROTEAN®Tetra Cell, BIO-RAD) นำส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์จีโนไทป์ (First BASE Laboratories Sdn Bhd, Selangor, มาเลเซีย) หลังจากนั้นนำข้อมูลจีโนไทป์มาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม GeneMapper software version 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, อเมริกา)

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ และ annealing temperature (T_a) ของไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง

ชื่อตำแหน่ง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'----> 3'	T_a (°C)	อ้างอิง
GC203	F : GTTCTCCAGGTGTGGATTTCTC R : AACATACACTCACAGTTTGGCCT	54	(Jaisuk <i>et al.</i> , 2014a)
HOLN	F : ACTGCGCTCGTACCCTATG R : CAGCAGCCGGTAAATAGCTG	54	(Kirchner <i>et al.</i> , 2014)
Gar3	F : ATTACTGATGCTCCCG R : GTTGCTGCTCTTGTCC	54	(Su <i>et al.</i> , 2013)
Gar6	F : GCTTTACCTCCATCGC R : GTCACCTCCACCAACCC	54	

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อตำแหน่ง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'----> 3'	T _a (°C)	อ้างอิง
Gar13	F : ACTCACGCAGACTCGC R : GACTACAGAAATAGGGTT	54	

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรจากค่าจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (A) ค่าเสตเทอโรไซโกซิติ (ค่าเสตเทอโรไซโกซิติจากการสังเกต: H_o ค่าเสตเทอโรไซโกซิติจากการคาดหมาย: H_e) และค่า Fixation index (F_{is}) โดยโปรแกรม GenAEx version 6.1 (Peakall and Smouse, 2006) ค่า allelic richness (A_r) จากโปรแกรม FSTAT version 2.9.4 (Goudet, 2003) ทดสอบการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก โดยการประเมินค่า exact p-value ด้วยวิธี markov chain ตามวิธีของ Guo and Thompson (1992) ด้วยโปรแกรม GENEPOP version 4 (Rousset, 2008) ปรับระดับความน่าจะเป็น (p -value) วิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple test) ด้วย Bonferroni correction (Rice, 1989) ใช้โปรแกรม NeEstimator version 2.01 (Do *et al.*, 2014) ประเมินจำนวน effective population size (N_e) ทดสอบสถานะคอขวดในกลุ่มตัวอย่างด้วยโปรแกรม Bottleneck version 1.2.02 (Piry *et al.*, 1999) ทดสอบความแตกต่างของระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการทดสอบ Mann-Whitney U

ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเทียบกับความแปรปรวนภายในประชากร ทดสอบค่าสถิติ Φ_{ST} ระหว่างคู่ตัวอย่าง โดยโปรแกรม ARLEQUIN version 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โปรแกรม GenAEx version 6.1 (Peakall and Smouse, 2006) ค่า Genetic differentiation (pairwise F_{ST}) ทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลีล

ของแต่ละประชากร โดย Exact test ตามวิธีของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization = 1000, Batches = 1000, Iterations per batch = 1000) จากโปรแกรม GENEPOP version 4 (Rousset, 2008) และปรับระดับความน่าจะเป็น (p -value) Bonferroni correction (Rice, 1989) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความต่างทางพันธุกรรม (F_{ST}) กับระดับเครือข่ายแม่น้ำด้วยโปรแกรม STREAMTREE (Kalinowski *et al.*, 2008) และวิเคราะห์การจัดกลุ่มและการถ่ายเทยีนด้วยโปรแกรม Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) จากนั้นหาค่าสัมประสิทธิ์การเป็นสมาชิกของแต่ละตัวอย่างในแต่ละกลุ่มโดยโปรแกรม Pophelper R version 1.0.10 (Francis, 2017)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ความหลากหลายภายในประชากรของกลุ่มตัวอย่าง

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 5 ตำแหน่ง มีสถานะหลากหลายรูปแบบในทุกประชากรโดยมีค่าเฉลี่ยต่ำสุดถึงสูงสุด ดังนี้ จำนวนตัวอย่างเฉลี่ย (N) มีค่าอยู่ระหว่าง 25.20±0.37 (บ้านยู) - 41.80±0.20 (น้ำตกศิลาเพชร) ความหลากหลายทางพันธุกรรมมีค่าเฉลี่ยดังนี้ จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (A) มีค่าอยู่ระหว่าง 11.80±1.02 (บ้านยู) - 12.60±0.60 (น้ำตกศิลาเพชร) อัลลีล, ค่า effective number of alleles (A_e) มีค่าอยู่ระหว่าง 6.77±0.83 (บ้านคอนมุด) - 7.63±0.64 (น้ำตกศิลาเพชร) อัลลีล, ค่า allelic richness (A_r) มีค่าอยู่ระหว่าง 11.24±0.95 (น้ำตกศิลาเพชร) -

11.69±2.04 (บ้านยู) อัลลีล, ค่าเฮตเทอโรไซโกซิติ์จากการสังเกต (H_0) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.56±0.05 (บ้านคอนมุด) - 0.70±0.03 (น้ำตกศิลาเพชร) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิติ์จากการคาดหมาย (H_c) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.84±0.02 (บ้านคอนมุด) - 0.87±0.01 (น้ำตกศิลาเพชร) กลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 จุดเก็บตัวอย่างมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มตัวอย่าง ไม่ต่างกัน ($p>0.05$) มีค่าเฉลี่ยความหลากหลายทางพันธุกรรมของทั้ง 3 กลุ่มมีค่าเป็น A เท่ากับ 12.33±0.57 ค่า A_c เท่ากับ 7.14±0.40 ค่า A_r เท่ากับ 10.54±3.40 ค่า H_0 เท่ากับ 0.63±0.04 และค่า H_c เท่ากับ 0.85±0.01 (ตารางที่ 3)

เครื่องหมายพันธุกรรม 4 ตำแหน่งมีการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในบางกลุ่มตัวอย่าง โดยพบในกลุ่มตัวอย่างน้ำตกศิลาเพชรที่ตำแหน่ง Gar6 กลุ่มตัวอย่างบ้านคอนมุดที่ตำแหน่ง Gar6, GC203 และ HOLN และกลุ่มบ้านยูที่ตำแหน่ง Gar13 การออกจากสมดุลที่ทุกตำแหน่งมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิติ์จากการคาดหมาย (H_c) มากกว่าค่าเฮตเทอโรไซโกซิติ์จากการสังเกต (H_0) (heterozygosity deficit) ซึ่งแสดงถึงในกลุ่มประชากรมีค่าเฮตเทอโรไซโกตน้อยกว่าที่ควรจะเป็นและจากค่า Fixation index (F_{is}) ที่มีค่าเฉลี่ยเป็นบวก ($F_{is}=0.26±0.04$) แสดงถึงการรวมกันของประชากรที่มีความถี่อัลลีลต่างกัน (Wahlund effect) (Hedrick, 2011) นอกจากนี้การประเมินจำนวน effective population size (N_e) พบว่าทุกกลุ่มตัวอย่างมี N_e ขนาดใหญ่ (ค่าสูงสุดอยู่ในระดับ infinity) และไม่พบการมีสถานะคอขวดในทุกกลุ่มตัวอย่าง

การพบปลาเลียหินในบริเวณน้ำตกศิลาเพชรและบริเวณอื่นๆ ของลำน้ำย่างมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงอาจเป็นผลมาจากในบริเวณน้ำตกมีปลาเลียหินอาศัยชุกชุมการที่ปลาอยู่อาศัยอย่างชุกชุมเป็นผลสืบเนื่องมาจากแหล่งที่อยู่มีคุณภาพที่ดีมีความ

อุดมสมบูรณ์ด้วยสภาพพื้นที่โดยรอบน้ำตกศิลาเพชรเป็นพื้นที่ป่ามีร่มเงาของต้นไม้ใหญ่ มีโขดหินสลับซับซ้อนเหมาะต่อการเป็นแหล่งอาศัยของปลาลำธารอย่างปลาเลียหิน ดังการศึกษาของ Neville *et al.* (2009) ที่พบว่าขนาดและคุณภาพของแหล่งที่อยู่มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ปลาเทร้า (Lahontan cutthroat trout) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า A_r และ H_c เพิ่มขึ้นเมื่อขนาดแหล่งที่อยู่ใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นผลมาจากชีววิทยาของปลาเลียหินที่มีการผสมพันธุ์วางไข่ในฤดูฝนโดยเฉพาะในฤดูน้ำหลากปริมาณน้ำสูงกว่าแนวฝายกั้นลำน้ำย่างจึงมีโอกาที่พ่อ แม่พันธุ์ปลาเลียหินจะสามารถข้ามผ่านฝายน้ำย่างไปยังบริเวณที่เหมาะสมต่อการวางไข่ เช่นพื้นที่นาข้าวหรือลำห้วยที่มีน้ำไหลรินเนื่องด้วยไข่ปลาเลียหินเป็นไข่ครึ่งจมครึ่งลอยอาจถูกกระแสน้ำพัดพาไข่หรือตัวอ่อนให้แพร่กระจายไปได้ทั่วตลอดลำน้ำ (Jaisuk *et al.*, 2014b) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Barson *et al.* (2009) ปริมาณน้ำในฤดูน้ำหลากเพิ่มโอกาสให้ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) ถูกพัดพาหรือว่ายน้ำข้ามผ่านสิ่งกีดขวางส่งผลให้ปลามีการแพร่กระจายไปได้ไกล

สำหรับการเปรียบเทียบกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเลียหินในบริเวณลำน้ำย่างกับปลาเลียหินในพื้นที่อื่นๆ พบว่าระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบมีค่าค่อนข้างสูงกว่าปลาเลียหินในบริเวณอื่นๆ ดังการศึกษาของ Jaisuk *et al.* (2014a) ปลาเลียหิน บริเวณห้วยก๊าะ อ.บ่อเกลือ จ.น่าน จาก ไมโครแซทเทลไลท์ 3 ตำแหน่ง พบปลาเลียหินมี A เท่ากับ 4-7 อัลลีล, ค่า H_0 มีค่าอยู่ระหว่าง 0.750-0.893, ค่า H_c มีค่าอยู่ระหว่าง 0.715-0.827 Jaisuk *et al.* (2015) ปลาเลียหิน 5 แหล่งในพื้นที่ อ.บ่อเกลือ จ.น่าน จากไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 5 ตำแหน่ง พบว่าปลาเลียหินมีค่าเฉลี่ย A มีค่าอยู่ระหว่าง 5.80-8.00 อัลลีล, ค่า A_c มีค่าอยู่ระหว่าง

3.60-4.65, ค่า A_r มีค่าอยู่ระหว่าง 6.70-8.16, ค่า H_o มีค่าอยู่ระหว่าง 0.622-0.720 และค่า H_e มีค่าอยู่ระหว่าง 0.694-0.773 และ Jaisuk *et al.* (2014b) ปลาเลียหินจากบริเวณลำน้ำคอน อ.เขียงกลาง จ.น่าน จากไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง พบมีค่า A มีค่าอยู่ระหว่าง 6.00-10.40, ค่า A_r มีค่าอยู่ระหว่าง 5.90-8.66, ค่า A_e มีค่าอยู่ระหว่าง 3.91-6.66, ค่า H_o มีค่าอยู่ระหว่าง 0.56-0.67, ค่า H_e มีค่าอยู่ระหว่าง 0.73-0.83

การพบความหลากหลายทางพันธุกรรม มีจำนวน N_e ขนาดใหญ่และไม่มีปรากฏการณ์คอขวด

ในกลุ่มตัวอย่างปลาเลียหินในลำน้ำอย่างแต่ด้วยข้อสังเกตที่พบขนาดตัวปลาที่แม้จะเป็นตัวเต็มวัยแต่มีขนาดค่อนข้างเล็ก ดังนั้นในกรณีของการนำพ่อแม่พันธุ์ในลำน้ำอย่างไปวางแผนเพาะพันธุ์เพื่อปล่อยลูกพันธุ์คืนสู่แหล่งน้ำธรรมชาตินั้นอาจต้องพิจารณาข้อมูลทางพันธุกรรมร่วมกับลักษณะทางคุณภาพและทางปริมาณที่เหมาะสมต่อการเป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่องานฟื้นฟูประชากร

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยและค่า SD ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง ในกลุ่มตัวอย่างปลาเลียหินในลำน้ำอย่าง

กลุ่มตัวอย่าง		น้ำตกศิลาเพชร	บ้านดอนมูล	บ้านยู	ค่าเฉลี่ยรวม
ค่าเฉลี่ย	N	41.80±0.20	31.20±0.37	25.20±0.37	32.73±8.41
	A	12.60±0.60	12.60±1.40	11.80±1.02	12.33±0.46
	A_e	7.63±0.64	6.77±0.83	7.03±0.69	7.14±0.44
	A_r	11.24±0.95	11.67±3.44	11.69±2.04	11.53±0.25
	H_o	0.70±0.03	0.56±0.05	0.64±0.08	0.63±0.07
	H_e	0.87±0.01	0.84±0.02	0.85±0.02	0.85±0.02
	F_{is}	0.19±0.03	0.33±0.08	0.25±0.09	0.26±0.07

หมายเหตุ จำนวนตัวอย่าง (N) จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (A) ค่า effective number of alleles (A_e) ค่า allelic richness (A_r) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหมาย (H_e) และค่า Fixation index (F_{is})

2. ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

กลุ่มตัวอย่างปลาเลียหินทั้ง 3 กลุ่มมีความแตกต่างทางพันธุกรรม (ค่า Global $F_{ST} = 0.01189$; AMOVA, $p = 0.01466$) การทดสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม AMOVA พบว่า 1.19 เปอร์เซ็นต์ ของความแปรปรวนเกิดจากความแตกต่างระหว่างประชากร และ 98.81 เปอร์เซ็นต์ ของความแปรปรวนที่เกิดจากความแตกต่างระหว่างสมาชิกในประชากร สำหรับการทดสอบระยะห่างทาง

พันธุกรรม ของกลุ่มตัวอย่างมีค่าน้อยไปมากดังนี้ 0.130 (บ้านดอนมูล:บ้านยู) 0.139 (น้ำตกศิลาเพชร:บ้านยู) และ 0.241 (น้ำตกศิลาเพชร:บ้านดอนมูล) ผลความต่างระหว่างคู่ของกลุ่มตัวอย่าง 3 แหล่งด้วย pairwise F_{ST} พบกลุ่มตัวอย่างน้ำตกศิลาเพชรมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับกลุ่มตัวอย่างบ้านดอนมูล แต่ไม่ต่างจากกลุ่มตัวอย่างบ้านยู กลุ่มตัวอย่างบ้านดอนมูลและบ้านยูไม่ต่างกัน (ตารางที่ 4) ผลการวิเคราะห์การจัดกลุ่มและการถ่ายเทยีนของกลุ่ม

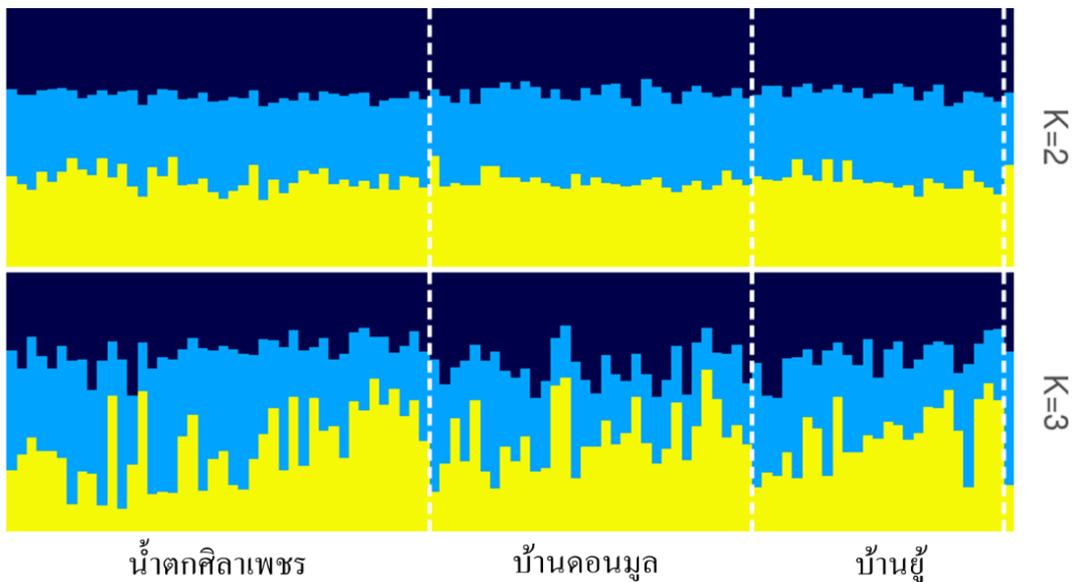
ตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มพบว่าสมาชิกของแต่ละกลุ่มตัวอย่างมีการปะปนในระดับพันธุกรรมและไม่แยกออกจากกัน แสดงถึงการถ่ายยีนระหว่างทั้ง 3 กลุ่ม โดยพิจารณาจากแถบสีแนวตั้งในแต่ละตัวอย่างของแต่ละกลุ่มจะประกอบด้วยพันธุกรรมของทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่างทั้งในการทดสอบการจัดกลุ่มเป็น 2 (K=2)

และ 3 (K=3) กลุ่ม (ภาพที่ 2) สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรกับระดับเครือข่ายแม่น้ำ (stream tree) ในกลุ่มตัวอย่างพบมีค่าความสัมพันธ์ $R^2 = 0.728$ แสดงถึงระดับเครือข่ายแม่น้ำมีผลต่อความต่างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างปลาเลียหินลำน้ำย่าง

ตารางที่ 4 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (ระยะทางระหว่างจุดรวบรวมตัวอย่าง) และค่า pairwise F_{ST} (อักษรตัวหนา)

	ศิลาเพชร	ดอนมุล	ยู
ศิลาเพชร	-	0.02192*	0.00431
ดอนมุล	0.241 (3 กม.)	-	0.00512
ยู	0.139 (15 กม.)	0.130 (12 กม.)	-

หมายเหตุ ค่า pairwise F_{ST} เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p \leq 0.017$ ซึ่งเป็นค่าความน่าจะเป็นที่ปรับสำหรับการใช้ข้อมูลวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple tests) ด้วย Bonferroni correction (0.05/3 โดยที่ 3 คือ จำนวนคู่เปรียบเทียบ) (Rice, 1989)



ภาพที่ 2 การจัดกลุ่มตัวอย่างและการถ่ายยีน

จากการพบกลุ่มตัวอย่างปลาเลียหินที่ศึกษานี้มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างประชากรน้อยและพบการปะปนในระดับพันธุกรรม ในขณะที่ค่าความต่างทางพันธุกรรม (F_{ST}) และระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่ามากที่สุดระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำตก

ศิลาเพชรกับบ้านดอนมุลด้วยระยะทางระหว่างกลุ่มตัวอย่าง 3 กิโลเมตร แต่กลุ่มตัวอย่างน้ำตกศิลาเพชรไม่ต่างจากกลุ่มตัวอย่างบ้านยูซึ่งมีระยะทาง 15 กิโลเมตร และบ้านดอนมุลไม่ต่างจากบ้านยูด้วยระยะทาง 12 กิโลเมตร

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเกิดขึ้นได้ด้วยปัจจัยสำคัญ 2 กระบวนการ คือ การขาดโอกาสถ่ายเทยีนระหว่างประชากร (gene flow) และการขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) (Frankham *et al.*, 2010) ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการพบความต่างพันธุกรรมระหว่างน้ำตกศิลาเพชรกับบ้านดอนมูลจากสภาพพื้นที่ บริเวณน้ำตกศิลาเพชรมีฝายจำนวน 3 ฝาย ประกอบด้วยฝายน้ำข้างมีความสูง 10 เมตรและอีก 2 ฝายเป็นฝายน้ำล้นสูง 3-5 เมตร ที่อาจเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการลดโอกาสการถ่ายเทยีนระหว่างประชากร ดังการศึกษาอื่นๆ ก่อนหน้านี้ที่พบว่าปลาเลียหินพื้นที่อำเภอเบตง จังหวัดน่าน กลุ่มตัวอย่างเหนือและใต้น้ำตกสะปันที่มีความสูง 10 เมตรมีระยะห่างทางพันธุกรรม 0.238 (Jaisuk and Senanan 2018a) เช่นเดียวกับ Yamamoto *et al.* (2004) ปลา White-spotted charr (*S. leucomanis*) ในแม่น้ำบริเวณ Southern Hokkaido, ประเทศญี่ปุ่น และ Leclerc *et al.* (2008) ปลา *P. flavescens* ใน Saint Lawrence River, ประเทศแคนาดา ทั้งนี้หากพิจารณาประกอบกับการพบการปะปนทางพันธุกรรมในระดับแต่ละตัวอย่าง (ภาพที่ 2) อาจกล่าวได้ว่า ประชากรปลาเลียหินในลำน้ำข้างยังไม่แยกออกจากกันในระดับพันธุกรรม

สำหรับการพบระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำตกศิลาเพชรและบ้านผู้ที่มีค่าน้อยและความต่างทางพันธุกรรมไม่มีนัยสำคัญทางสถิติด้วยระยะทางระหว่างน้ำตกศิลาเพชรถึงบ้านผู้มีระยะทาง 15 กิโลเมตรและตลอดระยะลำน้ำมีฝายน้ำล้นความสูง 3-5 เมตร จำนวน 6 ฝาย อาจเป็นผลมาจากการเพาะพันธุ์และปล่อยลูกพันธุ์คืนสู่ธรรมชาติเพื่อการอนุรักษ์และฟื้นฟูประชากรในลำน้ำก่อน ช่วง พ.ศ. 2556-2557 และ พ.ศ. 2559-2560 ได้นำพ่อ แม่พันธุ์ปลาเลียหินจากน้ำตกศิลาเพชรไปเพาะพันธุ์

รวมจำนวนลูกพันธุ์ที่เกิดจากพ่อ แม่พันธุ์ จากบริเวณน้ำตกศิลาเพชรที่ปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณลำน้ำก่อนมีประมาณ 500,000 ตัว ซึ่งลำน้ำก่อนเป็นลำน้ำสาขาหนึ่งของแม่น้ำน่านที่อยู่เหนือลำน้ำข้างและจตุรบรรพตตัวอย่างบริเวณบ้านผู้กับแม่น้ำน่านมีระยะทาง 8 กิโลเมตรซึ่งเมื่อพิจารณาโอกาสการแพร่กระจายของปลาเลียหินในฤดูน้ำหลากจึงมีโอกาสที่ปลาเลียหินจากลำน้ำก่อนแพร่กระจายมายังแม่น้ำน่านและแพร่กระจายมาถึงลำน้ำข้างบริเวณบ้านผู้ ดังที่พบได้จากการศึกษาของ Perez-Figueroa *et al.* (2015) ปลา Three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) ในลุ่มน้ำ Northwest Spain พบว่าปลาในบริเวณที่มีการเชื่อมต่อกับลำน้ำอื่น ๆ มีการปะปนทางพันธุกรรมมากกว่าบริเวณที่ไม่มีการเชื่อมต่อกับลำน้ำอื่น เช่นเดียวกับ Jaisuk and Senanan (2018b) พบปลาเลียหินจากลำน้ำมิดและลำน้ำก่อนมีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.003 ด้วยระยะทาง 22.48 กิโลเมตร

สรุป

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่พบได้ในกลุ่มตัวอย่างปลาเลียหินในลำน้ำข้างที่รวบรวมมาจาก 3 กลุ่มตัวอย่างได้แก่ น้ำตกศิลาเพชร บ้านดอนมูล และบ้านผู้ จากเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ สรุปได้ดังนี้ ประชากรปลาเลียหินในลำน้ำข้างมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง คาดว่าเป็นผลมาจากชีววิทยาของปลาเลียหินที่มีฤดูผสมพันธุ์วางไข่ในช่วงฤดูฝนซึ่งมีการไหลหลากของน้ำในลำน้ำข้างเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของพ่อ แม่พันธุ์และไข่ปลาที่เป็นไข่ครึ่งจมนครึ่งลอยจึงถูกพัดพาให้กระจายไปทั่วลำน้ำข้าง ถึงแม้ปลาเลียหินในลำน้ำข้างมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเหมาะสมต่อการเป็นแหล่งพันธุกรรมแต่ทั้งนี้ก็ต้องพิจารณาความเหมาะสมเนื่องจากปลาเลียหินในลำน้ำข้าง

โดยเฉพาะบริเวณน้ำตกศิลาเพชรมีขนาดตัวที่เล็กเมื่อเทียบกับลำน้ำอื่นๆ สำหรับการพบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรพบได้ในกลุ่มตัวอย่างจากน้ำตกศิลาเพชรกับบ้านคอนมุลคาดว่าอาจเป็นผลมาจากการฝายทำให้ประชากรถูกแบ่งออกจากกัน จากผลการศึกษานี้เป็นข้อมูลสำคัญที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของชีววิทยาของปลาและจำนวนประชากรมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร นอกจากนี้การพบสิ่งกีดขวางและระบบเครือข่ายลำน้ำมีผลต่อความต่างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างแสดงถึงข้อควรพิจารณาในการดำเนินงานที่มีผลต่อสภาพพื้นที่แหล่งน้ำอาจจะส่งผลถึงสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำได้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณเพื่อการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติอุปกรณ์ และครุภัณฑ์ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา และภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอ้างอิง

Aljanabi, S.M. and Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research** 25(2): 4692-4693.

Barson, N.J., Cable, J. and Van Oosterhout, C. 2009. Population genetic analysis of microsatellite variation of guppies (*Poecilia reticulata*) in Trinidad and Tobago: evidence for a dynamic source-sink metapopulation structure, founder

events and population bottlenecks.

Evolution Biology 22: 485-497.

Do, C., Waples, R.S., Peel, D., Macbeth, G.M., Tillett, B.J. and Ovenden, J.R. 2014. NeEstimator v2: reimplementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. **Molecular Ecology Resources** 14: 209-214.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** 1: 47-50.

Francis, R.M. 2017. POPHELPER: an R package and web app to analyse and visualize population structure. **Molecular Ecology Resources** 17(1): 27-32.

Frankham, R., Ballou, J.D. and Briscoe, D.A. 2010. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge, United Kingdom.

Goudet, J. 2003. **FSTAT (version 2.9.4), a program (for Windows 95 and above) to estimate and test population genetics parameters**. FSTAT. Available Source: <http://WWW.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>, January 14, 2021.

Guo, S.W. and Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics** 48: 361-372.

Hedrick, W.P. 2011. **Genetics of Populations**. Jones and Bartlett Publishers, USA.

- Jaisuk, C., Lothongkum, A., Keereelang, J. and Sriyam, S. 2014a. Development of microsatellite primers for genetic diversity assessment of local fishes in Nan river. **Rajabhat journal of Science, Humanities & Social Sciences** 15(2): 12-22. (in Thai)
- Jaisuk, C., Lothongkum, A. and Wongsongkram, M. 2014b. **Research Report on Evaluation of genetic variation of wild population *Garra cambodgiensis* in Kon River (tributary of Nan River) using microsatellite DNA markers for management and conservation.** Rajamangala university of technology Lanna, Nan. (in Thai)
- Jaisuk, C., Lothongkum, A. and Sriyam, S. 2015. **Research Report on Genetic diversity of wild population Stone lapping minnow (*Garra cambodgiensis*) in the Nan River watershed using microsatellite DNA markers.** Rajamangala university of technology Lanna, Nan. (in Thai)
- Jaisuk, C. and Senanan, W. 2018a. Effects of physical barriers on genetic variation of populations of Stonelapping minnow, *Garra cambodgiensis* (Tirant, 1883), in Wa River, Nan Province, Thailand. **Journal of fisheries and environment** 42: 53-65.
- Jaisuk, C. and Senanan, W. 2018b. Effects of landscape features on population genetic variation of a tropical stream fish, Stone lapping minnow, *Garra cambodgiensis*, in the upper Nan River drainage basin, northern Thailand. **PeerJ** 6: 1-29.
- Kalinowski, S.T., Meeuwig, M.H., Narum, S.R. and Taper, M.L. 2008. Stream trees: a statistical method for mapping genetic differences between populations of freshwater organisms to the sections of streams that connect them. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 65: 2752-2760.
- Kirchner, S., Weinmaier, T., Rattei, T., Sattmann, H. and Kruckenhauser, L. 2014. Characterization of 19 new microsatellite loci for the Omani barb *Garra barreimiae* from 454 sequences. **BMC Research Notes** 7: 1-6.
- Leclerc, E., Mailhot, Y., Mingelbier, M. and Bernatchez, L. 2008. The landscape genetics of yellow perch (*Perca flavescens*) in a large fluvial ecosystem. **Molecular Ecology** 17: 1702-1717.
- Neville, M.H., Dunham, J., Rosenberger, A., Umek, A. and Nelson, B. 2009. Influences of wildfire, Habitat Size, and Connectivity on Trout in Headwater Streams Revealed by Patterns of Genetic Diversity. **Transactions of the American Fisheries Society** 138: 1314-1327.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes** 6: 288-295.
- Pe' rez-Figueroa, A., Ferna' ndez, C., Amaro, R., Hermida, M. and San Miguel, E. 2015. Population structure and effective/census population size ratio in threatened three-

- spined stickleback populations from an isolated river basin in northwest Spain. **Genetica** 143: 403-411.
- Piry, S., Luikart, G. and Cornuet, J.M. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity** 90: 502-503.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics** 155: 945-959.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical test. **Evolution** 43(1): 223-225.
- Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources** 8: 103-106.
- Su, W.L., Liu, Z.Z., Wang, T.C., Zhen, Z., Liu, Y.A., Tang, Q.W. and Yang, Q.J. 2013. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the fish *Garra orientalis* (Oriental sucking barb). **Conservation Genetics Resource** 5: 231-233.
- Yamamoto, S., Morita, K., Koizumi, I. and Maekawa, K. 2004. Genetic differentiation of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) populations after habitat fragmentation: Spatial-temporal changes in gene frequencies. **Conservation Genetics** 5: 529-538.