



Research Article

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรปลาแขยงก (Mystus gulio)
จากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเพื่อการจัดการประชากรโรงเพาะฟัก
Genetic Variation of Long-Whiskered Catfish (*Mystus gulio*) Population Using
Microsatellite DNA for Hatchery Broodstock Management

เชาวลี ใจสุข^a, พัชรา นิธิโรจน์ภักดี^b, อโนชา กิริยากิจ^b, กิตพงษ์ สุวรรณเกตุ^b, ปิยชาติ ศรีศักดิ์^c และ กนกสนธิ์ ศิริรักษ์^d
Chaowalee Jaisuk^a, Patchara Nithirojpakdee^b, Anocha Kiriyaakit^b, Kitipong Suwannaket^b,
Piyachat Srisakda^c and Khanoksinee Sirirak^d

^a คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา วิทยาเขตน่าน อำเภอภูเพียง จังหวัดน่าน 55000

^a Faculty of Science and Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Lanna, Nan Campus, Phu Phiang, Nan 55000, Thailand.

^b คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี อำเภอเขาชะเมา จังหวัดจันทบุรี 22210

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

^c ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี 22120

^c Kung Krabaen Bay Royal Development Study Centre, Tha Mai, Chanthaburi 22120, Thailand.

^d คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์นนทบุรี อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

^d Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Nonthaburi Center, Mueang, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT

Article history:

Received: 2023-02-13

Revised: 2023-11-11

Accepted: 2023-12-01

Keywords:

Long - whiskered catfish;

Mystus gulio;

microsatellite;

genetic variation

Long-whiskered catfish (*Mystus gulio*) is attractive and promoted in aquaculture due to consumer demand, but there is a lack of fry. This study emphasizes on good management for offspring production to support aquaculture. Therefore, operations should possess sufficient population genetics information to effectively manage broodstock for producing the target offspring. Brood-stock samples were collected from a farm located in Chanthaburi province, Thailand. They were divided into two groups: male and female. Six microsatellite loci developed for *M. nemurus* were used to assess population genetic variation of *M. gulio* in the study. The results revealed that the markers could be used for cross-species studies with *M. gulio*. These microsatellites were polymorphisms. *M. gulio* males and females showed no significant difference in genetic diversity ($p > 0.05$), and the effective population size (N_e) was infinite. A bottleneck was detected in males, considering that N_e was exceeded. The results indicated that increasing broodstock numbers could enhance genetic diversity. Genetic differentiation between males and females showed significant values ($p < 0.05$). Consequently, maintaining genetic diversity level and phenotype of domesticated stock requires careful brood-stocks management to prevent inbreeding, genetic drift, and negative selection. Improvement of broodstock management practices will have a positive long-term impact of *M. gulio* production.

* Corresponding author.

E-mail address: patchara_ni@rmutto.ac.th

Cite this article as:

Jaisuk, C., Nithirojpakdee, P., Kiriyaakit, A., Suwannaket, K., Srisakda, P. and Sirirak, K. 2025. Genetic Variation of Long-Whiskered Catfish (*Mystus gulio*) Population Using Microsatellite DNA for Hatchery Broodstock Management. *Recent Science and Technology* 17(1): 257917.

บทคัดย่อ

ปลาแขยงก (Mystus gulio) ได้รับความสนใจและได้รับการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงมากขึ้นด้วยความต้องการของผู้บริโภคแต่ในขณะเดียวกันยังขาดแคลนลูกพันธุ์ การศึกษานี้ให้ความสำคัญต่อการผลิตลูกพันธุ์ที่ดีเพื่อส่งเสริมการเพาะเลี้ยง ซึ่งในการดำเนินงานควรมีข้อมูลทางพันธุศาสตร์ประชากรช่วยในการตัดสินใจวางแผนจัดการพ่อแม่พันธุ์โรงเพาะฟักเพื่อให้ลูกพันธุ์ที่ผลิตได้ตรงตามเป้าหมายของการดำเนินงาน จึงได้รวบรวมตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ปลาจากโรงเพาะฟักเอกชนในจังหวัดจันทบุรี 1 แหล่ง แยกปลาออกเป็น 2 กลุ่มคือ ปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย นำมาศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่พัฒนามาจากปลา *M. nemurus* ผลการศึกษาพบว่าเครื่องหมายที่เลือกสามารถใช้ศึกษาข้ามชนิดกับปลา *M. gulio* ได้และมีความหลากหลายรูปแบบ กลุ่มตัวอย่างปลาเพศผู้และเพศเมียมีความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่ต่างกัน ($p > 0.05$) พบการมีสภาวะคอขวดในปลาเพศผู้ ซึ่งเมื่อพิจารณาพร้อมกับจำนวน N_e ที่มีจำนวนมากเกินการประเมิน (Infinite) แสดงถึงปลาเพศผู้สามารถใช้เป็นพ่อพันธุ์ได้แต่ควรเพิ่มจำนวนประชากรพ่อแม่พันธุ์เพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม พบความต่างทางพันธุกรรมระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย ($p < 0.05$) ทั้งนี้เพื่อการรักษาระดับพันธุกรรมและลักษณะปรากฏของประชากรโรงเพาะฟักในการดำเนินงานต้องวางแผนจัดการพันธุกรรมพ่อแม่พันธุ์เพื่อป้องกันการเกิดเลือดชิด การขาดช่วงทางพันธุกรรมและการคัดเลือกทางลบ การปรับปรุงแนวทางปฏิบัติงานด้านการจัดการพ่อแม่พันธุ์จะส่งผลดีต่อการผลิตปลาแขยงกในระยะยาว

คำสำคัญ: ปลาแขยงก, ปลาอีกร, ไมโครแซทเทลไลท์, ความแปรปรวนทางพันธุกรรม

1. บทนำ

ปลาแขยงก หรือปลาอีกร long whiskered catfish (*Mystus gulio* Hamilton, 1822) สามารถพบได้บริเวณแม่น้ำสายใหญ่ ๆ ที่ติดต่อกับทะเลโดยเฉพาะบริเวณน้ำกร่อย ปลาชนิดนี้จัดเป็นปลาสองน้ำ เนื่องจากมีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำได้ถึง 0 - 30 ppt ปลาแขยงกจึงสามารถเลี้ยงได้ทั้งในพื้นที่น้ำจืดและน้ำกร่อย สามารถเลี้ยงได้หลายรูปแบบ เช่น เลี้ยงในกระชัง บ่อดิน เลี้ยงแบบเดี่ยว เลี้ยงร่วมกับสัตว์น้ำอื่น เช่น ปลานิล ปลากะพง กุ้งทะเล เพื่อช่วยในการเก็บเศษอาหารของกุ้งลดของเสียภายในบ่อและเพิ่มผลผลิตและมูลค่าในการเลี้ยงกุ้ง ปัจจุบันเกษตรกรมีการเลี้ยงปลาแขยงกในบ่อดินเพิ่มมากขึ้น จึงมีความต้องการพัฒนาแหล่งพันธุ์เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการลูกพันธุ์ของเกษตรกร ทั้งนี้การผลิตลูกพันธุ์ที่มีคุณภาพต้องเริ่มจากการสร้างประชากรโรงเพาะฟักที่ดี การนำประชากรปลาจากธรรมชาติมาปรับสภาพให้เป็นประชากรโรงเพาะฟัก (Domesticated) ซึ่งเมื่อสร้างประชากรตั้งต้นได้แล้วกระบวนการสำคัญต่อจากนั้นเป็นการรักษาคุณภาพของลักษณะที่พึงประสงค์โดยการจัดการพ่อแม่พันธุ์ (Broodstock management) จัดได้ว่าเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการปรับปรุงพันธุ์เป็นการวางแผนการผสมพันธุ์และการดำรงรักษาสายพันธุ์ที่เหมาะสมโดยควบคุมกิจกรรมในโรงเพาะฟักทั้งหมด เพื่อจัดการพันธุกรรมของประชากร/สายพันธุ์ ให้คงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับที่เหมาะสม อีกทั้งควบคุมการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมให้เป็นไปในทิศทางที่ดี ซึ่งจะส่งผลให้กระบวนการปรับปรุงพันธุ์ประสบผลสำเร็จและมี

ความก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุ์อย่างรวดเร็ว สามารถผลิตลูกพันธุ์ที่มีคุณภาพทั้งในด้านพันธุกรรมและลักษณะปรากฏ ซึ่งในการดำเนินงานด้านพันธุศาสตร์ประชากรหรือการศึกษาความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในประชากรโรงเพาะฟักหรือประชากรธรรมชาติเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์มีความเหมาะสมเนื่องจากการถ่ายทอดแบบซ่มร่วม มีความหลากหลายสูงจึงสามารถใช้ศึกษาประชากรที่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยได้ดี ดังการศึกษาของ Wachirachaiakarn and Na-Nakorn (2019) ได้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมประชากรปลาตุกรัสเซีย (*Clarias gariepinus*) จาก 4 โรงเพาะฟักด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง พบ 3 ประชากรที่มีสภาวะจำนวนโฮโมไซโกตที่เกิดขึ้นมากกว่าที่คาดหวัง (homozygote excess) ไม่พบการมีสภาวะคอขวด แต่พบว่ามีภาวะไม่อยู่ในสมดุลของรูปแบบจีโนไทป์ (genotype disequilibrium) ของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 ประชากร โดยรวมแล้วประชากรที่ศึกษาที่มีความหลากหลายต่ำ มีค่าเฮตเทอโรไซโกตระดับปานกลาง และพบกลุ่มตัวอย่างปลาตุกรัสเซีย จาก 4 โรงเพาะฟัก มีการแยกกลุ่มทางพันธุกรรมออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเป็นประโยชน์ในการวางแผนสร้างประชากรเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ปลาตุกรัสเซีย

ดังนั้น การสร้างข้อมูลพันธุกรรมในการศึกษานี้จะทำให้ทราบถึงสถานการณ์ทางพันธุกรรมประชากรปลาแขยงกในปัจจุบันเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการจัดการพ่อแม่พันธุ์ การดำเนินงานเพื่อวางแผนเพาะพันธุ์ การเลือกใช้แหล่งพันธุ์ที่เหมาะสม กระบวนการเหล่านี้จะช่วยป้องกัน

การถดถอยทางพันธุกรรมและเพื่อการติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในอนาคตได้

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างภาคสนาม

รวบรวมตัวอย่างครีบน้ำมันปูปลาแขยงจากโรงเพาะฟักเอกชน จ.จันทบุรี จำนวน 1 โรงเพาะฟักซึ่งเป็นฟาร์มเพาะพันธุ์ลูกปลาหลายชนิดรวมถึงปลาแขยง การเพาะพันธุ์จะคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์มาจากลูกปลาที่เลี้ยงในฟาร์มโดยใช้พ่อแม่พันธุ์อายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไปเพื่อความสมบูรณ์เพศและการจำแนกเพศที่ชัดเจน ในการเพาะพันธุ์ปลาแขยงจะเพาะในบ่อซีเมนต์ขนาด 2 x 3 เมตร อัตราส่วนเพศ 1 : 1 จำนวน 20 คู่ต่อบ่อ การศึกษานี้นำปลาแขยงมาแยกเป็น 2 กลุ่ม คือ พ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ โดยพิจารณาจากลักษณะภายนอกของปลา คือ ปลาแขยงเพศผู้มีติ่งเพศ (urogenital papillae) เป็นติ่งเรียวยาวแหลม มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมีย น้ำหนักประมาณ 10 - 15 กรัม ความยาวประมาณ 10 - 11 เซนติเมตร ขณะที่ปลาแขยงเพศเมียมีติ่งเพศมีลักษณะกลม มีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 20 - 30 กรัม ความยาวประมาณ 11 - 14 เซนติเมตร ได้ตัวอย่างเป็นปลาเพศผู้จำนวน 47 ตัวอย่าง และปลาเพศเมีย 48 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 95 ตัวอย่าง ในการตัดครีบน้ำมันจะใช้ผ้าชุบน้ำในการจับปลาเพื่อให้ปลานิ่งนำไปทำให้สลบด้วยน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อปลาสงบนิ่งแล้วจึงตัดครีบน้ำมันขนาด 0.5 เซนติเมตร เก็บรักษาตัวอย่างครีบน้ำมันในแอลกอฮอล์ 95 % หลังจากตัดครีบน้ำมันแล้วทาล้างด้วยยาโพวิโดน ไอโอดีนแล้วนำไปฟอกฟีนในถังน้ำสะอาดที่มีการให้อากาศและเมื่อปลาฟื้นตัวว่ายน้ำเป็นปกติจึงปล่อยคืนลงบ่อเลี้ยง

2.2 การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากครีบน้ำมันด้วยวิธี Salt extraction (Aljanabi and Martinez, 1997) วัดปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอิลีกโตรโฟรีซิสโดยอะกาโรสเจล 1% ด้วยเครื่องอิลีกโตรโฟรีซิสแบบนอน (BIO-RAD SubcellGT, Italy) และผ่านกระแสไฟฟ้า 70 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสีย้อมดีเอ็นเอ (FluoroVue Nucleic Acid Gel Stain, SMOBIO, Malaysia) เทียบปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณ

แน่นอน โดยดูความเข้มของการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่ย้อมติดด้วยสีย้อมภายใต้แสงยูวี ด้วยเครื่องถ่ายภาพและบันทึกภาพ (Gel Documentation System, BIO-RAD)

2.2.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) โดยเครื่อง Thermal cycle (BioRad, MJ Mini Cycler, Italy) ด้วยไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่ง MnRmCT6-2, MnRmE11-1 และ Mns432 (Usmani *et al.*, 2003) และ MnBp8-1-30, MnVj2-1-62 และ MnBp8-4-43b (Hoh *et al.*, 2008) (Table 1) ที่ได้มีการติดแถบสีฟลูออเรสเซนต์ สารละลายพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ใช้สารละลายพีซีอาร์ (i-taq PCR Master mix Solution, iNtRON BIOTECHNOLOGY, Gyeonggi-do, South Korea) 5 ไมโครลิตรไพรเมอร์ Forward และ Reverse อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์ วัฏจักรของการเพิ่มผลคูณหุ้มนี้นำไปด้วย 5 ขั้นตอน คือ อุณหภูมิที่ทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน (Denaturation) 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิที่ไพรเมอร์มาเกาะกับสายดีเอ็นเอตั้งต้น (Annealing temperature; Ta) ที่ตำแหน่ง MnBp8-4-43b Ta 50 องศาเซลเซียส, MnVj2-1-62 และ MnRmCT6-2 Ta 55 องศาเซลเซียส ตำแหน่ง Mns432, MnRmE11-1 และ MnBp8-1-30 Ta 60 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในช่วง Annealing temperature นาน 30 วินาที และอุณหภูมิที่ Taq Polymerase สามารถซ่อมสายดีเอ็นเอให้สมบูรณ์เป็นดีเอ็นเอเส้นใหม่ (Extension temperature) 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (Table 2) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยนำสารละลายพีซีอาร์มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิลีกโตรโฟรีซิสผ่านพอลิอะคริลามิเดเจล 6 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมชนิดแนวตั้ง (Mini PROTEAN®Tetra Cell, BIO-RAD) ผ่านกระแสไฟฟ้า 280 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสีย้อมดีเอ็นเอ (FluoroVue Nucleic Acid Gel Stain, SMOBIO, Malaysia) เทียบขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐานภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่องถ่ายภาพและบันทึกภาพ (Gel Documentation System, BIO-RAD) เพื่อตรวจการมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เครื่องหมาย

Table 1 Descriptions of primer sequences and annealing temperature (Ta) (°C) of microsatellite loci analyzed in this study.

	Locus name	Primer sequence 5'----> 3'	Expect allele size (bp)	Ta (°C)	Reference
1	MnRmCT6-2	F: TGCAGTCGACCTTAGCACAC R: GCATGGACATCACATCTCTC	198	55	Usmani <i>et al.</i> (2003)
2	MnRmE11-1	F: ATGTTGATGTTGTGGGATGC R: GCCCAAAAAGAAACATCTGG	204	60	
3	Mns432	F: AGTGCGTTAGTGTGAGTGCTTC R: GAACTTTTCCCCTCCCCTTTAT	150	60	
4	MnBp8-1-30	F: GGCTTATCTGTTGTTGTTG R: TGAATCTTTAGCCTGCTTTG	194	60	Hoh <i>et al.</i> (2008)
5	MnVj2-1-62	F: TTTGGCAGATACGACCAC R: TTCTTCCCCACTCCTCCT	131	55	
6	MnBp8-4-43b	F: CACGTGTGTAAGATAAATAG R: GCACTGAGAAATGTGAGAAA	317	50	

Table 2 Temperature profile of the polymerase chain reaction (PCR) used in this study.

Step	Temperature (°C)	Time	Cycle
1	94	2 minutes	1
2	94	30 seconds	Back to step 2 for 40 cycles
3	50, 55, 60	30 seconds	
4	72	30 seconds	
5	72	5 minutes	1

ไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งเบื้องต้นก่อนนำตัวอย่างมารวมกันเพื่อส่งวิเคราะห์ในลำดับต่อไป

ส่งตัวอย่างพีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้โดยวิธี Fragment analysis นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอและบันทึกข้อมูลจีโนไทป์ของตัวอย่างที่แต่ละตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ด้วยโปรแกรม Peak Scanner Software v1.0

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรโดยใช้การทดสอบต่อไปนี้ จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (Number of alleles per locus, A) ค่าเฮเทอโรไซโกซิติ (Heterozygosity) ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F- Coefficients) โดยใช้โปรแกรม GenAlEx version 6.1 (Peakall and

Smouse, 2006) คำนวณค่า Allelic Richness (A_r) โดยใช้โปรแกรม FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2001) เปรียบเทียบระดับความแตกต่างของความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่างโดยวิธี Mann–Whitney U จากค่า A_r เนื่องจากค่า A_r คือ จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่คำนวณโดยปรับตามจำนวนตัวอย่างที่เท่ากันในทุกประชากรที่มีการปรับค่าด้วยจำนวนตัวอย่างที่น้อยที่สุดในประชากร ดังนั้นจึงสามารถใช้ค่านี้ในการเปรียบเทียบความหลากหลายของอัลลีลในประชากรที่มีจำนวนตัวอย่างไม่เท่ากัน (Foulley and Olivier, 2006) ประเมินจำนวน Effective population size (N_e) โดยโปรแกรม NeEstimator version 2.01 (Do *et al.*, 2014) ตรวจสอบการมีสภาวะคอขวดในกลุ่มตัวอย่างโดยโปรแกรม Bottleneck version 1.2.02 (Piry *et al.*, 1999) ทดสอบการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี – ไวน์เบิร์กของความถี่จีโนไทป์ที่แต่ละตำแหน่ง

ภายในประชากร โดยการประเมินค่า exact p-value ด้วยวิธี markov chain ตามวิธีของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization = 1000, Batches = 1000, Iterations per batch = 1000) ในโปรแกรม GENEPOP version 4 (Rousset, 2008) และปรับระดับความน่าจะเป็น (p-value) สำหรับการใช้อนุโลมวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple tests) ด้วยวิธี Bonferroni correction (Rice, 1989) ทดสอบ Genotypic linkage disequilibrium ด้วย GENEPOP version 4 วิเคราะห์การมี Null allele โดยใช้โปรแกรม Micro Checker version 2.2.3 (Oosterhout *et al.*, 2004)

ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยใช้การทดสอบต่อไปนี้ Analysis of Molecular Variance (AMOVA) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างประชากรเมื่อเทียบกับความแปรปรวนภายในประชากร ทดสอบค่าสถิติ Φ_{ST} ระหว่างคู่ตัวอย่างด้วยโปรแกรม ARLEQUIN version 3.11 (Excoffier *et al.*, 2007) ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ใช้โปรแกรม GenAlEx version 6.1 (Peakall and Smouse, 2006) และทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic differentiation) โดยทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลีลของแต่ละประชากรโดย Exact test ตามวิธีของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization = 1000, Batches = 1000, Iterations per batch = 1000) โปรแกรม GENEPOP version 4 (Rousset, 2008) และปรับระดับความน่าจะเป็น (p-value) สำหรับการใช้อนุโลมวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple test) ด้วย Bonferroni correction (Rice, 1989)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 ความหลากหลายภายในประชากรของกลุ่มตัวอย่าง

ความหลากหลายรูปแบบของเครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 6 ตำแหน่ง ได้แก่ Mns432, MnRmE11-1, MnBp8-1-30, MnVj2-1-62, MnRmCT6-2 และ MnBp8-4-43b ที่พบได้จากกลุ่มตัวอย่างปลาแขยงกบ เพศผู้ 47 ตัวอย่างและเพศเมีย 48 ตัวอย่าง มีรายละเอียดดังนี้ ปลาแขยงกบเพศผู้ พบมีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (A) มีค่าอยู่ระหว่าง 3.00 - 17.00 อัลลีล (MnRmE11-1 - MnRmCT6-2) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.50 ± 4.55 อัลลีล ค่า Effective number of allele (A_e) 2.04 - 6.31 อัลลีล (MnRmE11-1 - MnBp8-1-30) เฉลี่ย 4.07 ± 1.51 อัลลีล ค่า Allelic richness (A_r) 2.98 - 17.62 อัลลีล (MnRmE11-1 - MnRmCT6-2) เฉลี่ย 10.59 ± 4.74 อัลลีล ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (Observed heterozygosity: H_o) 0.33 - 0.63 (MnRmE11-1, MnBp8-1-30, MnVj2-1-62 - Mns432) เฉลี่ย

0.40 ± 0.12 และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการคำนวณ (Expected heterozygosity: H_e) 0.51 - 0.84 (MnRmE11-1 - MnBp8-1-30) เฉลี่ย 0.72 ± 0.12 ในขณะที่ปลาแขยงกบ เพศเมีย พบมีค่า A 2.00 - 17.00 อัลลีล (MnRmE11-1 - MnRmCT6-2) เฉลี่ย 9.00 ± 4.77 อัลลีล ค่า A_e 1.97 - 4.80 อัลลีล (MnRmE11-1 - MnBp8-1-30) เฉลี่ย 3.36 ± 1.16 อัลลีล ค่า A_r 2.00 - 16.89 อัลลีล (MnRmE11-1 - MnRmCT6-2) เฉลี่ย 8.96 ± 4.74 อัลลีล ค่า H_o 0.23 - 0.67 (MnVj2-1-62 - Mns432) เฉลี่ย 0.44 ± 0.14 และค่า H_e 0.49 - 0.79 (MnRmE11-1 - MnBp8-1-30) เฉลี่ย 0.67 ± 0.05 โดยมีค่าเฉลี่ยโดยรวมของตัวอย่างทั้ง 95 ตัวอย่างมีค่า A 9.75 อัลลีล ค่า A_e 3.71 อัลลีล ค่า A_r 9.77 อัลลีล ค่า H_o 0.42 และค่า H_e 0.69 (Table 3) ไม่พบการมี Genotypic linkage disequilibrium และไม่พบ Null allele ในทุกตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ทั้งในปลาเพศผู้และเพศเมีย

จากดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่กล่าวมาข้างต้นพบว่ากลุ่มตัวอย่างปลาแขยงกบทั้งเพศผู้และเพศเมียมีความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่ต่างกัน ($p > 0.05$) การพบกลุ่มตัวอย่างที่มาจากโรงเพาะฟักมักจะมีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่ต่างกันซึ่งพบได้เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chailertit *et al.* (2020) รายงานว่าปลาดุกอูย (*Clarias macrocephalus*) จากโรงเพาะฟักศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพรและฟาร์มปลาสุภาพรณ์แหล่งละ 50 ตัว ที่เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 5 ตำแหน่ง พบประชากรปลาดุกอูยจากโรงเพาะฟักทั้ง 2 แหล่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่แตกต่างกัน โดยปลาดุกอูยจากโรงเพาะฟักศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพรมีค่าเฉลี่ย A เท่ากับ 5.00 ± 2.5495 อัลลีล ค่า A_e 3.20 ± 1.6654 อัลลีล ค่า H_o 0.47 ± 0.1096 และค่า H_e 0.62 ± 0.1761 ฟาร์มปลาสุภาพรณ์พบค่า A เท่ากับ 4.60 ± 2.7019 อัลลีล ค่า A_e 3.20 ± 1.5989 อัลลีล ค่า H_o 0.45 ± 0.1129 และค่า H_e 0.63 ± 0.1696 เช่นเดียวกับ Wachirachaikarna and Nanakorn (2019) ซึ่งทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมปลาดุกรัสเซียจาก 4 โรงเพาะฟักจาก จ. สกลนคร จ.หนองคาย จ.นครราชสีมา และจ.นครนายก จำนวน 50 ตัวอย่างต่อ 1 โรงเพาะฟัก ด้วยไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่ง พบปลาดุกรัสเซียจากทั้ง 4 โรงเพาะฟักมีจำนวน A มีค่าอยู่ระหว่าง 6.00 - 7.00 อัลลีล ค่า A_e 3.43 - 4.59 อัลลีล ค่า H_o 0.52 - 0.72 และ H_e 0.67 - 0.77 และรายงานของ Afanas'ev *et al.* (2006) ทำการศึกษาความหลากหลายของประชากรปลาแซลมอน (*Oncorhynchus keta*) จาก 5 โรงเพาะฟัก จำนวนทั้งหมด 250 ตัวอย่างด้วยไมโครแซทเทลไลต์ 8 ตำแหน่ง พบมีค่าเฉลี่ยอัลลีล A 8.21 อัลลีล

ค่า H_0 0.6271 และค่า H_0 0.6277 ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบในประชากรโรงเพาะฟักทั้งปลาตุ๊กตา ปลาตุ๊กตาเขียว และปลาแซลมอน (Chailertit *et al.*, 2020; Wachirachakarna and Na-Nakorn, 2019; Afanas'ev *et al.*, 2006) และเมื่อเปรียบเทียบกับในปลาสกุล *Mystus* ชนิดอื่น ดังการศึกษาของ Usmani *et al.* (2003) ศึกษาโครงสร้างประชากรของปลา *M. nemurus* ที่รวบรวมจาก 6 แหล่งประชากรธรรมชาติ (Perak, Kedah, Johor, UPM, Sarawak and Terengganu) ของประเทศมาเลเซีย ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 12 ตำแหน่ง พบปลา *M. nemurus* มีค่า A อยู่ระหว่าง 2 - 11 อัลลีล มีค่าเฉลี่ย 6.3 อัลลีล ค่า H_0 0.4350 - 0.5410 และ H_0 0.4418 - 0.5730 ในการศึกษาของ Hoh *et al.* (2008) ปลา *M. nemurus* จากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศมาเลเซีย 6 แหล่งรวมเป็น 90 ตัวอย่างด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 12 ตำแหน่ง พบ A มีค่าอยู่ระหว่าง 2 - 12 อัลลีล

นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบกับความหลากหลายที่พบระหว่างเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งเดียวกันที่การศึกษานี้เลือกใช้กับปลาแซลมอน (*M. gulo*) กับการศึกษาของ Usmani *et al.* (2003) และ Hoh *et al.* (2008) ที่ใช้กับปลา *M. nemurus* พบมีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งและค่าเฮเทอโรไซโกตีใกล้เคียงกับการศึกษานี้ แสดงถึงเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่เลือกสามารถใช้ข้ามชนิดได้เนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์จะใช้ข้ามชนิดได้ต่อน้อยในระดับความสฤกเดียวกันและหากยังมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันยิ่งมีโอกาสที่จะใช้เครื่องหมายร่วมกันได้ดี (Morelli *et al.*, 2006) รายละเอียดดังนี้ การศึกษาของ Usmani *et al.* (2003) ศึกษาจากปลาจำนวนเฉลี่ย 24.50 ตัวอย่าง ไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้เหมือนกันได้แก่ ตำแหน่ง Mns432 พบ $A = 9.00$, $H_0 = 0.66$, $H_e = 0.73$ ตำแหน่ง MnRmE11-1 พบ $A = 10.00$ ค่า $H_0 = 0.76$ และ $H_e = 0.83$ ตำแหน่ง MnRmCT6-2 พบ $A = 8.00$, $H_0 = 0.72$ และ $H_e = 0.75$ และ Hoh *et al.* (2008) ทำการศึกษาในปลาจำนวน 90 ตัวอย่าง ที่ตำแหน่ง MnBp8-1-30 พบ $A = 9.00$ ค่า $H_0 = 0.3429$ และ $H_e = 0.6288$, MnVj2-1-62 พบ $A = 6.00$ ค่า $H_0 = 0.6167$ และ $H_e = 0.7232$ และ MnBp8-4-43b พบ $A = 12.00$ ค่า $H_0 = 0.6279$ และ $H_e = 0.8317$ (Table 4)

3.2 การทดสอบสมดุลฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium)

การทดสอบความเบี่ยงเบนของสัดส่วนจีโนไทป์ที่สังเกตได้กับค่าที่คาดหวังตามสมดุลฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก การออกจากสมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์กพบได้ในทั้งปลาเพศผู้และ

เพศเมียที่ตำแหน่ง MnBp8-1-30, MnVj2-1-62, MnRmCT6-2 และ MnBp8-4-43b และผลรวมที่ทุกตำแหน่งปลาทั้งสองกลุ่มตัวอย่างไม่อยู่ในสมดุล และเมื่อพิจารณาค่า F_{IS} หรือค่าสัมประสิทธิ์การผสมเลือดชิด (Inbreeding coefficient) ที่บ่งบอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรย่อยพบว่ามีค่าเป็นลบบวก แสดงถึงการออกจากสมดุลมีค่าเฮเทอโรไซโกตีจากการคาดหวัง (H_0) มากกว่าค่าเฮเทอโรไซโกตีจากการสังเกต (H_0) หรืออาจกล่าวได้ว่ากลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มอยู่ในสภาวะโฮโมไซโกต (Homozygote) มากกว่าที่ควรจะเป็นเมื่อประชากรอยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ซึ่งการพบ $H_e > H_0$ เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น การผสมพันธุ์ระหว่างเครือญาติ การคัดเฮเทอโรไซโกตออก หรือเกิดการปะปนกันของประชากรที่ต่างกัน 2 ประชากร ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า วาลันด์ เอฟเฟกต์ (Wahlund's effect) หรือภาวะที่มีเฮเทอโรไซโกต (Heterozygote) ต่ำกว่าปกติเมื่อเปรียบเทียบกับที่คาดว่าควรจะเป็นในภาวะสมดุล ฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Na-Nakorn, 2000) การออกจากสมดุลของปลาแซลมอนในการศึกษานี้ อาจเป็นผลมาจากการคัดพันธุ์ ในการเพาะพันธุ์ใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อย และคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์มาจากลูกปลาที่เลี้ยงในฟาร์ม เมื่อมีการเพาะพันธุ์ในรุ่นต่อ ๆ มาจึงมีโอกาสเกิดการผสมพันธุ์ระหว่างเครือญาติ

3.3 การประเมิน Effective population size (N_e) และสถานะคอขวด (Bottleneck)

การประเมินจำนวน Effective population size (N_e) ทั้งปลาเพศผู้และเพศเมียพบมีจำนวนมากเกินการประเมิน (Infinite) ผลการตรวจสอบสถานะคอขวดพบในกลุ่มตัวอย่างปลาแซลมอนเพศผู้ $P_{BottN} = 0.015$ (Table 5) การพบสถานะคอขวดในกลุ่มตัวอย่างปลาเพศผู้เป็นข้อมูล que แสดงถึงการลดลงของประชากรปลาเพศผู้ที่เป็นผลมาจากการคัดพันธุ์ที่ส่งผลต่อกลุ่มตัวอย่างปลาเพศผู้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chailertit *et al.* (2020) ที่พบว่าประชากรปลาตุ๊กตาจากฟาร์มเอกชนแห่งหนึ่งเกิดปรากฏการณ์คอขวดขึ้น ($P_{BottN} = 0.041$) เนื่องมาจากดำเนินการของฟาร์มที่เพาะปลาตุ๊กตาเป็นครั้งแล้วนำลูกพันธุ์ปลาตุ๊กตาที่เพาะได้ไปเลี้ยงที่จังหวัดสมุทรปราการ เมื่ออายุได้ 7 - 8 เดือน จึงคัดเอาตัวเมียที่มีไข่มาใช้ผลิตลูกปลาตุ๊กตาเพศในฟาร์มและนำตัวเมียไข่ส่วนหนึ่งพร้อมตัวผู้มาผสมเพื่อสร้างประชากรปลาตุ๊กตารุ่นถัดไป ซึ่งจากกระบวนการข้างต้นกล่าวได้ว่าฟาร์มปลาตุ๊กตามีการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์โดยที่ไม่ได้ตั้งใจ เนื่องจากการในการเพาะพันธุ์ใช้พ่อแม่จำนวนน้อยมาผสมพันธุ์กันและพ่อแม่

พันธุ์ที่คัดมาไม่ได้มีการวางแผนการคัดพันธุ์หรือการบันทึกประวัติของปลาแต่ละครอบครัว รวมถึงการเพาะพันธุ์ไม่มีการจัดการเรื่องสัดส่วนเพศหรือจำนวนพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสม ไม่มีแผนงานเพื่อป้องกันการเกิดสภาวะคอขวด จึงมีผลทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมในรุ่นลูกลดลง ซึ่งการพบสภาวะคอขวดในปลาแขยงกบเพศผู้ในการศึกษานี้ อาจเป็นผลมาจากสาเหตุเดียวกับการศึกษาข้างต้น เนื่องจากการจัดการเพาะพันธุ์ในฟาร์มใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวน 20 คู่ ซึ่งเป็นจำนวนที่น้อยเมื่อพิจารณาตามแนวทางของ Kincaid (1983) ที่ได้แนะนำว่าการเพาะพันธุ์แต่ละครั้งควรใช้พ่อแม่พันธุ์อย่างน้อย 50 คู่ และ Tave (1993) แนะนำจำนวน N_e ขั้นต่ำในการสร้างประชากรโรงเพาะฟักควรมีพ่อแม่พันธุ์อย่างน้อย 45 - 50 ตัว เพื่อป้องกันการเกิดเลือดชิด นอกจากนี้ตามแนวทางของโรงเพาะฟักที่ดีการสร้างประชากรเริ่มต้นควรดำเนินการตามข้อแนะนำของ Na-Nakorn (2000) ที่ว่าการสร้างพ่อแม่พันธุ์เริ่มต้นในโรงเพาะฟักการดำเนินการควรคัดพ่อแม่พันธุ์ให้มีจำนวนมากเพื่อให้เพียงพอต่อการคงไว้ซึ่งการรักษาความถี่จีโนไทป์ เนื่องจากการที่ประชากรจะอยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ประชากรจะต้องมีความถี่ยีนและความถี่จีโนไทป์คงที่ทุกชั่วอายุ ซึ่งจะต้องเป็นประชากรขนาดใหญ่ และความหลากหลายทางพันธุกรรมจะคงอยู่ในประชากรตลอดไป กล่าวคือในประชากรที่มีขนาดใหญ่จะมีการผสมพันธุ์กันแบบสุ่มโดยที่ไม่มีปัจจัยอื่นมากระทบต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ยีนได้แก่ ประชากรควรมีขนาดใหญ่

มีการผสมพันธุ์แบบสุ่ม ไม่มีการกลายพันธุ์ (Mutation) ไม่มีการอพยพย้ายถิ่น (Migration) และไม่มีการคัดพันธุ์ (Selection) จะส่งผลให้ความถี่ยีนในรุ่นลูกเข้าสู่ภาวะสมดุล (Genetic equilibrium) โดยความถี่ยีนจะคงที่ในประชากรทุกชั่วอายุ

อย่างไรก็ตาม แม้จะพบการมีสภาวะคอขวดในปลาแขยงกบเพศผู้แต่ด้วยจำนวน N_e ที่ยังพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากเกินการประมาณได้ (Infinite) แสดงถึงประชากรปลาแขยงกบกลุ่มดังกล่าวยังคงสามารถใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ได้ โดยที่ฟาร์มอาจต้องหาพ่อแม่พันธุ์ปลาแขยงกบจากแหล่งอื่นหรือจากธรรมชาติมาเสริมเพื่อเพิ่มระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมแต่ไม่ควรนำมาเสริมมากเกินไปเพื่อรักษาสถานภาพ Domesticated ของประชากรโรงเพาะฟักไม่ให้เปลี่ยนไปมากนัก นอกจากนี้ Na-Nakorn (2008) รายงานไว้ว่าในการดำเนินการควรมีวิธีการจัดการพันธุกรรมพ่อแม่พันธุ์ในโรงเพาะฟัก เช่น การจัดการเพื่อป้องกันการเกิดเลือดชิดซึ่งสามารถทำได้โดยการติดเครื่องหมายพ่อแม่พันธุ์และมีข้อมูลประวัติ การป้องกันการขาดช่วงพันธุกรรมซึ่งมักจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงความถี่อัลลีลในประชากรแบบไม่มีทิศทางและไม่สามารถทำนายได้ในแต่ละชั่วรุ่นซึ่งมีสาเหตุมาจากการมีประชากรขนาดเล็ก (Poompuang, 2008) หรือการใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อย และการป้องกันการคัดเลือกทางลบทำได้โดยการติดตามข้อมูล การเจริญเติบโต การเจริญพันธุ์และติดตามผลการจัดการในโรงเพาะฟักอย่างต่อเนื่อง

Table 3 Average allelic variability at 6 microsatellite loci of *M. gulio*. The indices included the sample size (N), number of alleles per locus (A), effective number of alleles (A_e), allelic richness (A_r), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and fixation index (F_{is})

Sample	Locus	N	A	A_e	A_r	H_o	H_e	F_{is}
Male	Mns432	46.00	9.00	4.59	9.00	0.63	0.78	0.19
	MnRmE11-1	46.00	3.00	2.04	2.98	0.33	0.51	0.36
	MnBp8-1-30	46.00	11.00	6.31	10.96	0.33	0.84	<u>0.61</u>
	MnVj2-1-62	46.00	11.00	2.70	10.96	0.33	0.63	<u>0.48</u>
	MnRmCT6-2	47.00	17.00	4.29	17.62	0.40	0.77	<u>0.47</u>
	MnBp8-4-43b	45.00	12.00	4.48	12.00	0.38	0.78	<u>0.51</u>
	Average	46.00	10.50	4.07	10.59	0.40	0.72	0.44
	SD	0.63	4.55	1.51	4.74	0.12	0.12	0.14

Table 3 (Continuous)

Sample	Locus	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>A_e</i>	<i>A_r</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F_{is}</i>
Female	Mns432	48.00	9.00	4.22	8.96	0.67	0.76	0.13
	MnRmE11-1	48.00	2.00	1.97	2.00	0.46	0.49	0.07
	MnBp8-1-30	48.00	9.00	4.80	8.98	0.50	0.79	0.37
	MnVj2-1-62	48.00	9.00	2.31	8.94	0.23	0.57	0.60
	MnRmCT6-2	48.00	17.00	4.10	16.89	0.42	0.76	0.45
	MnBp8-4-43b	48.00	8.00	2.76	7.96	0.40	0.64	0.38
	Average	48.00	9.00	3.36	8.96	0.44	0.67	0.33
	SD	0.00	4.77	1.16	4.74	0.14	0.05	0.08
Total	Average	47.00	9.75	3.71	9.77	0.42	0.69	0.39
	SD	1.13	4.52	1.34	4.60	0.13	0.12	0.17

Note: F_{is} values and probability of significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (p) are given for each population and locus. Values underlined indicate statistical significance, $p < 0.0042$, after Bonferroni correction = $0.05/12$ (Rice, 1989)

Table 4 Average allelic variability of *M. gulio* in this study compare with *M. nemurus* in previous study at same microsatellite loci. The indices included the sample size (*N*), number of alleles per locus (*A*), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e)

This research (<i>M. gulio</i>)	Locus					
	Mns432	MnRmE11-1	MnRmCT6-2	MnBp8-1-30	MnVj2-1-62	MnBp8-4-43b
<i>N</i>	47	47	47	47	47	47
<i>A</i>	9.00	2.50	17.00	10.00	10.00	10.00
H_o	0.65	0.40	0.41	0.42	0.28	0.39
H_e	0.77	0.50	0.77	0.82	0.60	0.71
Usmani <i>et al.</i> (2003) (<i>M. nemurus</i>)						
<i>N</i>	24	24	24	-	-	-
<i>A</i>	9.00	10.00	8.00	-	-	-
H_o	0.66	0.76	0.72	-	-	-
H_e	0.73	0.83	0.75	-	-	-
Hoh <i>et al.</i> (2008) (<i>M. nemurus</i>)						
<i>N</i>	-	-	-	90	90	90
<i>A</i>	-	-	-	9.00	6.00	12.00
H_o	-	-	-	0.3429	0.6167	0.6279
H_e	-	-	-	0.6288	0.7232	0.8317

Table 5 Estimates and 95% confidence intervals of contemporary effective population size (N_e) and the detection of bottlenecks based on Wilcoxon's test for two population samples at 6 microsatellite loci.

Samples	Effective population size			Bottleneck test
	N_e	Lower bound	Upper bound	TPM (p -value)
Male	Infinite	Infinite	Infinite	0.015
Female	Infinite	Infinite	Infinite	0.11

3.4 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

กลุ่มตัวอย่างปลาแขยงกบเพศผู้และเพศเมียมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมีค่า $Global F_{ST} = 0.01562$; AMOVA, $p = 0.02151$ ซึ่งผลการทดสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม AMOVA พบว่า 1.56 % ของความแปรปรวนเกิดจากความแตกต่างระหว่างประชากร และ 98.44 % ของความแปรปรวนที่เกิดจากความแตกต่างระหว่างสมาชิกในประชากร สำหรับการทดสอบระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ของกลุ่มตัวอย่างมีค่า 0.057 ซึ่งกล่าวได้ว่าปลาแขยงกบในการศึกษานี้มีระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยมากเมื่อเทียบกับปลา *M. nemurus* ในการศึกษาของ Usmani *et al.* (2003) ที่ได้รวบรวมปลามาจากแม่น้ำ 6 แหล่ง ที่พบว่าค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่าอยู่ระหว่าง 0.2238 - 0.8039 ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากประชากรโรงเพาะฟักที่แม้จะเกิดจากการนำปลาธรรมชาติมาสร้างประชากรตั้งต้นแล้วเมื่อผ่านกระบวนการ Domesticate ประชากรโรงเพาะฟักจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมลดลง ซึ่งผลของค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเป็นไปในทิศทางที่สอดคล้องกับผลความต่างระหว่างคู่ของกลุ่มตัวอย่างจากค่า pairwise $F_{ST} = 0.01562$ ที่ระดับ $p = 0.02703$ ($p < 0.05$) แสดงถึงปลาเพศผู้และเพศเมียมีพันธุกรรมต่างกัน ทั้งนี้อ้างอิงตาม Wright (1978) ที่ได้ให้เกณฑ์ไว้ว่าค่า $F_{ST} = 0.00 - 0.05$ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ ค่า $F_{ST} = 0.05 - 0.15$ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง ค่า $F_{ST} = 0.15 - 0.25$ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงค่า $F_{ST} > 0.25$ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงมาก ดังนั้นในการศึกษานี้ที่พบค่า F_{ST} ปลาเพศผู้และเพศเมียจัดได้ว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ ซึ่งการพบประชากรโรงเพาะฟักมีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ พบได้เช่นเดียวกับ Chailertit *et al.* (2020) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมประชากรปลาดุกอุยจากโรงเพาะฟัก 2 แหล่งคือ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำชุมพรและฟาร์มปลาสุภาภรณ์ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาดุกอุยจาก 2 แหล่งไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) และค่า F_{ST} มีค่าเท่ากับ 0.103 แสดงถึงปลาดุกอุยจากทั้ง 2 แหล่งมีความแตกต่าง

ทางพันธุกรรมปานกลางการพบว่าประชากรโรงเพาะฟักมีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำอาจเกิดได้จากกระบวนการสร้างประชากรโรงเพาะฟัก Na-Nakorn (2008) การสร้างประชากรโรงเพาะฟักเกิดกระบวนการที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในโรงเพาะฟักและส่งผลกระทบต่อประชากร เช่น การเกิดผลกระทบที่มาจากการเริ่มจากประชากรตั้งต้นจำนวนน้อย (Founder effects) โดยเกิดความแตกต่างอัลลีลระหว่างประชากรเดิมกับประชากรใหม่ เนื่องจากการนำปลาจากแหล่งหนึ่งมาเป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับสร้างประชากรใหม่ในโรงเพาะฟักอาจไม่ได้คำนึงถึงผลทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นจากจำนวนพ่อแม่พันธุ์เริ่มต้นเนื่องจากปลาส่วนใหญ่มีไข่จำนวนมากในการเพาะพันธุ์นั้นอาจมีการใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อย ซึ่งหากในการสร้างประชากรเริ่มต้นใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อย จะส่งต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม 2 กระบวนการ คือ การขาดช่วงพันธุกรรมคือการที่ความถี่ของอัลลีลเปลี่ยนแปลงไปแบบไม่มีทิศทาง พันธุกรรมในประชากรรุ่นพ่อแม่ถูกส่งไปยังรุ่นลูกเพียงบางส่วน ส่งผลทำให้ประชากรรุ่นลูกแตกต่างจากรุ่นพ่อแม่ และประชากรสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอัลลีลจำนวนหนึ่งจะหายไป จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งจะลดลงเมื่อเทียบกับรุ่นพ่อแม่ หรือในธรรมชาติและการผสมเลือดชิดที่เป็นผลมาจากการที่มีพ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อยส่งผลให้ประชากรรุ่นต่อ ๆ มามีความสัมพันธ์ทางสายเลือดมากขึ้นและอาจเกิดการผสมเลือดชิดเกิดขึ้นได้

4. สรุป

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรปลาแขยงกบ (*M. gulio*) จากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 6 ตำแหน่ง พบปลาแขยงกบมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและความหลากหลายในกลุ่มตัวอย่างทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่ต่างกัน พบสภาวะคอขวดในกลุ่มตัวอย่างเพศผู้แต่ด้วยการประเมินจำนวน N_e ที่พบว่ามีความหลากหลายสูงถึงประชากรเพศผู้ยังสามารถใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ได้ พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ค่า pairwise F_{ST} แสดงถึงการมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ในเกณฑ์ที่มีความต่างต่ำ เป็นผลมาจากการจัดการประชากรโรงเพาะฟักที่เมื่อมีการคัดพันธุ์จาก

กระบวนการสร้างประชากรโรงเพาะฟักที่อาจเริ่มจากพ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อยส่งผลให้ประชากรรุ่นต่อ ๆ มามีความสัมพันธ์ทางสายเลือดมากขึ้นและอาจเกิดการผสมเลือดชิดเกิดขึ้นได้ สำหรับการศึกษานี้มีข้อแนะนำในทางปฏิบัติเพื่อป้องกันการเกิดความเสื่อมของลักษณะเนื่องจากการผสมเลือดชิด (Inbreeding depression) จึงควรเพิ่มจำนวนพ่อแม่พันธุ์จากแหล่งพันธุ์อื่นหรือจากธรรมชาติเข้ามาเพิ่มเติมต้องคำนึงถึงการคงไว้ซึ่งสายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงให้เป็นประชากรโรงเพาะฟักแล้วเพื่อไม่ให้อุบัติลักษณะสำคัญที่คัดไว้ และในการดำเนินงานควรมีวิธีการจัดการพันธุ์กรรมพ่อแม่พันธุ์ในโรงเพาะฟักที่เป็นระบบเพื่อให้ประชากรปลาแซลมอนในโรงเพาะฟักมีระดับพันธุ์กรรมที่เหมาะสมและมีคุณลักษณะที่ดีต่อการเป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตลูกพันธุ์ที่ดีทั้งลักษณะคุณภาพและลักษณะปริมาณซึ่งจะส่งผลดีต่อการเพาะเลี้ยงปลาแซลมอนเพื่อสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณเพื่อการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) ปี พ.ศ. 2565 และครุภัณฑ์ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรีและมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก

6. เอกสารอ้างอิง

Afanas' ev, I. K. , Rubtsova, A.G., Malinina, V.T., Salmenkova, A.E., Omel' chenko, T.V. and Zhivotovsky, A.L. 2006. Microsatellite Variability and Differentiation of Hatchery Stocks of Chum Salmon *Oncorhynchus keta* Walbaum in Sakhalin. **Russian Journal of Genetics** 42(12): 1431-1438.

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.

Chailertit, V., Suntomchot, S., Umpolsak, K., Baoprasertkul, P., Theeratidechakul, T., Prachak Buaneam, P. and Borriboon, C. 2020. Genetic Diversity and Performance in Hatchery Stocks of Günther's Walking Catfish, *Clarias macrocephalus*. **Journal of fisheries technology research** 14(2): 32-47. (in Thai)

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. and Schneider, S. 2007. An Integrated Software Package for population Genetics Data Analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG). **Evolutionary Bioinform Online** 23(1): 47-50.

Foulley, J.L. and Olivier, L. 2006. Estimating allelic richness and its diversity. **Livestock Science** 101: 150-158.

Goudet, J. 2001. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indice (version 2.9.3)**. Available Source: <http://WWW2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>, March 27, 2023.

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

Hoh, P.B., Siraj, S.S., Tan, S.G. and Yusoff, Y. 2008. Isolation of Trinucleotide Microsatellite Markers for *Mystus nemurus*. **Russian Journal of Genetics** 44(3): 369-371.

Kincaid, H.L. 1983. Inbreeding in fish populations used for aquaculture. **Aquaculture** 33: 215-227.

Morelli, K.A., Revaldaves, E., Oliveira, C. and Foresti, F. 2006. Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes** 7: 32-34.

Na-Nakorn, U. 2000. **Genetics of aquatic animals (2nd ed)**. Kasetsart University Publisher, Bangkok. (in Thai)

Na-Nakorn, U. 2008. Founder population for aquaculture and domestication selection, pp. 78-93. In Na-Nakorn, U. and Kamonrat, W., eds. **Genetic population for aquaculture**. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

Oosterhout, C.R., Hutchinson, W.F., Will, D.P.M. and Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER : software for identifying and correcting

- genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes** 4: 535-538.
- 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.
- 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.
- Poompuang, S. 2008. Inbreeding and genetic drift in small population, pp 78-93. *In* Na-Nakorn, U. and Kamonrat, W., eds. **Genetic population for aquaculture**. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- 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.
- Tave, D. 1993. **Genetics for Hatchery Managers** (2nded). Kluwer Academic Publisher, Boston.
- Usmani, S., Tan, S.G., Siraj, S.S. and Yusoff, K. 2003. Population structure of the Southeast Asian river catfish *Mystus nemurus*. **International Society for Animal Genetics, Animal Genetics** 34: 462-464.
- Wachirachaikarn, A. and Na-Nakorn, U. 2019. Genetic diversity of the North African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) hatchery stocks in Thailand. **ScienceAsia** 45: 301-308.
- Wright, S. 1978. **Evolution and the Genetics of Populations**. University of Chicago Press, Chicago.