บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การรวบรวมตัวอย่าง

1. รวบรวมเนื้อเยื่อครีบหางลูกปลาเก๋าดอกแดง (*E. coioides*) จากแหล่งจับ และรับซื้อลูกปลาเก๋าบริเวณคลองเกาะเคี่ยม อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง (ภาพที่ 1) และจากอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี รวบรวมตัวอย่างจากจังหวัดตรังในเดือนมกราคม เมษายน กรกฎาคม และพฤศจิกายน 2547 และรวบรวมตัวอย่างจากจังหวัดจันทบุรี ในเดือน มกราคม 2547 เก็บรักษาเนื้อเยื่อครีบหางในเอทิลแอลกอฮอล์ 95%

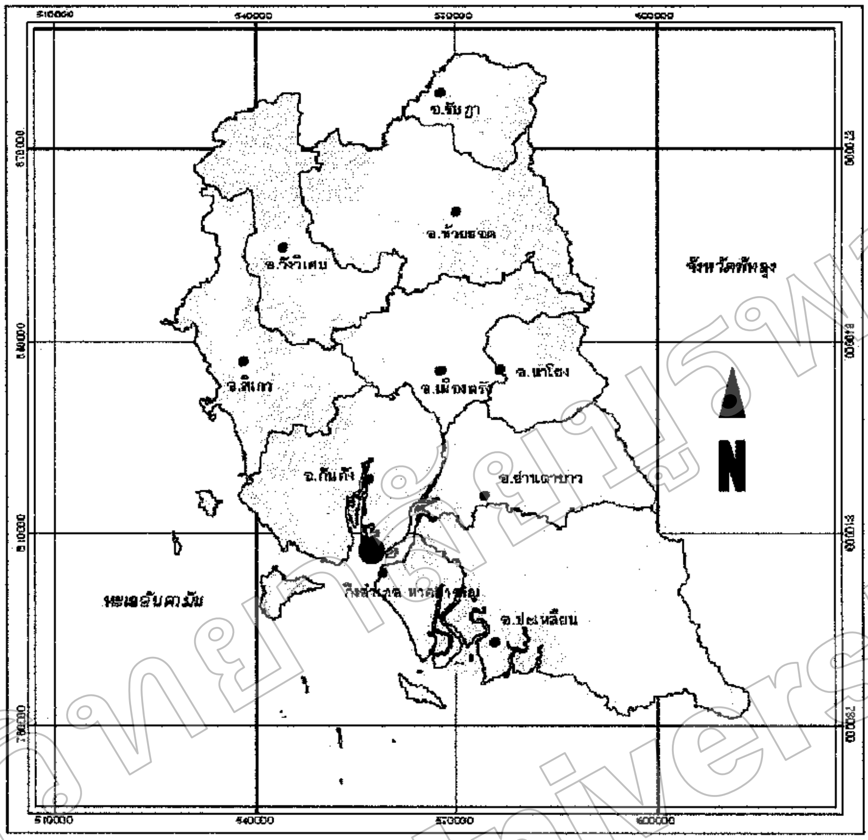
2. วิเคราะห์กลุ่มลูกปลาที่มีขนาดความยาวถึงหยักหาง (Fork Length, FL) ใกล้เคียงกัน ทุกช่วงการเก็บตัวอย่าง เพื่อป้องกันไม่ให้ปลาที่จับมาในแต่ละเดือน เป็นปลาที่มาจากครอบครัวเดียวกัน ในแต่ละครั้งของช่วงเวลาเก็บตัวอย่างที่จังหวัดตรัง วิเคราะห์ลูกปลา 2 กลุ่ม คือ (1) ขนาดเล็ก (6.5-10.3 เซนติเมตร) หรือขนาดกลาง (ประมาณ 9-15 เซนติเมตร) และ (2) ขนาดใหญ่ (17.5-29.0 เซนติเมตร) กลุ่มละ 33-40 ตัว และใช้ลูกปลาเก๋าดอกแดงที่รวบรวมจากอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี เป็นประชากรเปรียบเทียบ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การรวบรวมตัวอย่างลูกปลาเก๋าจาก อ. กันตัง จ. ตรัง และ อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี ระหว่างเดือนมกราคม-พฤศจิกายน ปี 2547

สัญลักษณ์ (ตัวย่อ)	ช่วงเวลา (เดือน)	ขนาด (เซนติเมตร)	จำนวน (ตัว)
JAS	มกราคม	เล็ก (7.6-10.3)	40
JAL	มกราคม	ใหญ่ (19.4-25.5)	40
APS	เมษายน	เล็ก (7.6-9.0)	40
APL	เมษายน	ใหญ่ (17.5-22.5)	40
JUM	กรกฎาคม	กลาง (ไม่มีข้อมูล*)	40
JUL	กรกฎาคม	ใหญ่ (ไม่มีข้อมูล*)	33
NOS	พฤศจิกายน	เล็ก (6.5-9.7)	40
NOL	พฤศจิกายน	ใหญ่ (18.5-29.0)	40
CH	มกราคม (จันทบุรี)	(6.6-12.8)	45

*ลูกปลาขนาดกลาง และขนาดใหญ่ของเดือนอื่น ๆ มีความยาวระหว่าง 9-15 และ 17.5-29.0 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



● บริเวณเก็บตัวอย่าง

ภาพที่ 1 บริเวณที่เก็บตัวอย่าง คลองเกาะเคี่ยม อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง

วิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

1. สกัดดีเอ็นเอ

ด้วยวิธี Salt Extraction ดัดแปลงจากวิธีการของ Aljanabi and Martinez (1994) โดยมีรายละเอียดโดยสังเขปดังนี้ ตัดตัวอย่างครีบหางขนาด ประมาณ 0.5 เซนติเมตร ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge Tube ขนาด 1.5 ml ที่มี Lysis Buffer (100 mM Tris HCl, 100mM EDTA, 0.5% SDS, 0.2M NaCl) และ Proteinase K (10 mg/ l) เพื่อย่อยโปรตีนออกจากเนื้อเยื่อ บ่มสารละลายที่ได้ ที่ 55 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง Water Bath (Poly Science 9005 A5, USA) ประมาณ 6-8 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ 7.5 M Ammonium Acetate และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol 100% ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol 70% และเก็บรักษาดีเอ็นเอใน TE Buffer (1 M Tris Base pH 8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0)

2. วัดปริมาณดีเอ็นเอ

วัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส (ผ่านกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปบวก)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บนอะกาโรส เจล 1% ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบนอน (BIO-RAD Subcell GT, Italy) และใช้กระแสไฟฟ้า 70 โวลท์ ประมาณ 45 นาที หลังจากนั้นจึงนำแผ่นเจล มาย้อมด้วย เอธิเดียม โบรไมด์ (10 mg/ ml) แล้วจึงเทียบปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างกับดีเอ็นเอ มาตรฐาน (λDNA) ที่ทราบปริมาณแน่นอน โดยดูความเข้มของสารเรืองแสงของดีเอ็นเอที่ย้อมติดด้วยเอธิเดียม โบรไมด์ ภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง UV Transilluminator (VILBER LOURMAT ETX-40M., French) ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย

3. เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่บริเวณไมโครแซเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง ด้วยเครื่อง Thermocycler _(TGradient Biometra, United Kingdom) ซึ่งมีรายละเอียดลำดับเบสของไพร์เมอร์ และสภาวะ ที่เหมาะสมสำหรับพีซีอาร์ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ และ Annealing Temperature สำหรับพีซีอาร์ของไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง

ไมโครแซทเทลไลท์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	Annealing (°c)	อ้างอิง
EM07	F: ACTCTGCTCCCGCTTTGCTT, R: TCTGTTTTGTCTCGCTTTTG	54	Nugroho et al. (1998)
EM08	F: CCCCCTCTATCTCTCCAC, R: CAAATAAGGCACGCTCTC	54	Nugroho et al. (1998)
EM10	F: AAGACAAATAAATGCAGA, R: ACCACAGGGGACTAAAGA	54	Nugroho et al. (1998)
CA2	F: GACTTGATTCAGCAAAATAAAGATG, R: AGAGACGGTGCCAGTAAATGAA	50	Rivera et al. (2003)
CA6	F: GTGTTGCTGGGGTTACTAATGAAG, R: TTAGACACATTGTCACGATGGTCC	54	Rivera et al. (2003)
CA7	F: CACAGTGAAATACTCATAAGTGATG, R: CAAGATGCCTGGGTATTTTTGG	50	Rivera et al. (2003)

4. แยกอัลลิลของไมโครแซทเทลไลท์ โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสผ่านโพลีอะคริลาไมด์ เจล 6% ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิสแนวตั้ง (SCIE-PLAS SEQ3341, United Kingdom) ใช้กระแสไฟฟ้า 900 โวลท์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5. บันทึกจีโนไทป์ ที่ได้จากการย้อมอัลลิล ที่แยกแล้วด้วยเทคนิค Silver Staining (Promega. USA) หลักการของเทคนิคนี้คือ รีดิวซ์ Silver Ion ที่จับกับพันธะของกรดอะมิโน โดยใช้สารโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และฟอร์มาดีไฮด์ (Formaldehyde) วิธีนี้มีความไวสูง ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง เมื่อย้อมได้แล้วจะเห็นดีเอ็นเอจับกับซิลเวอร์ไนเตรต (Silver Nitrate) เป็นแถบสีน้ำตาลเข้ม

6. วัดขนาดของอัลลิล โดยเทียบการเคลื่อนที่บนแผ่นเจลของอัลลิลที่ต้องการกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาดตั้งแต่ 50-800 คู่เบส (Invitrogen, USA) และ ลำดับเบสของ pGEM-3Zf (+) Vector (Promega, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ประเมินความหลากหลายภายในกลุ่มตัวอย่าง ประเมินความหลากหลายระหว่างกลุ่มตัวอย่าง และประเมินแนวโน้มการจัดกลุ่มประชากร จากข้อมูลจีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่าง

ประเมินความหลากหลายภายในตัวอย่างโดยใช้ดัชนีต่อไปนี้

1. จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง (Number of Alleles Per Locus, A)

2. Allelic Richness, (AR) เป็นการคำนวณจำนวนอัลลิลที่เป็นอิสระจากจำนวนตัวอย่าง

3. ร้อยละของตำแหน่งในสภาวะหลากรูปแบบ (Percent Polymorphic Loci) ซึ่งมีจำนวนอัลลิลมากกว่า 1 อัลลิล ที่ความถี่มากกว่า 5% และน้อยกว่า 95% เมื่อเทียบกับจำนวนตำแหน่งที่ศึกษาทั้งหมด

4. ความถี่อัลลิล (Allele Frequency) คำนวณได้จากการนับจำนวนรูปแบบของจีโนไทป์ต่อตำแหน่ง ที่ปรากฏในกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งได้แก่ จำนวนโฮโมไซโกต (Homozygote) และจำนวนเฮตเทอโรไซโกต (Heterozygote) ความถี่ของอัลลิลหนึ่ง ๆ คำนวณได้ดังนี้

$$\text{ความถี่ของอัลลิลใด ๆ} = (2aa+ab)/ 2N$$

เมื่อ aa = จำนวนโฮโมไซโกตของอัลลิลนั้น ๆ

ab = จำนวนเฮตเทอโรไซโกตของอัลลิลนั้น ๆ

N = จำนวนจีโนไทป์ทั้งหมดในตัวอย่าง

5. เฮตเทอโรไซโกซิตี้ (Heterozygosity, H)

ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ คือ สัดส่วนของจีโนไทป์ที่เป็นเฮตเทอโรไซกัสต่อจำนวนจีโนไทป์ทั้งหมดของแต่ละตำแหน่ง ซึ่งสามารถประเมินได้ 2 แบบ คือ คำนวณโดยตรงจากตัวอย่างซึ่งจะเรียกว่าค่าสังเกตของเฮตเทอโรไซโกซิตี้ (Observed Heterozygosity, Ho) และคำนวณจากความถี่อัลลิลตามความสัมพันธ์ภายใต้สภาวะของประชากรตามทฤษฎีซึ่ง เรียกว่า ค่าคาดหมายของเฮตเทอโรไซโกซิตี้ (Expected Heterozygosity, He) โดยคำนวณได้จาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

$$He = 1 - \sum_{i}^{m} p_i^2$$

เมื่อ p_i = ความถี่ของอัลลิล A ที่ตำแหน่ง I

m = จำนวนอัลลิลที่ตำแหน่ง I

6. ทดสอบการเบี่ยงเบนจากสมดุล Hardy-Weinberg ภายในตัวอย่าง

ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าสังเกต และ ค่าคาดหวังตามสมดุล Hardy-Weinberg ของ ความถี่ของจีโนไทป์ของแต่ละตำแหน่งในแต่ละประชากร โดยการประมาณค่า Exact p-Value ด้วยวิธี Markov Chain Method ตามวิธีการของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization: 1000, Batches: 100 และ Iterations per Batch: 10) และปรับระดับความน่าจะเป็น (p-Value) สำหรับการใช้ข้อมูลชุดเดิมวิเคราะห์หลายครั้ง (Multiple Test) ด้วย Bonferroni Correction (Rice, 1989)

7. ทดสอบ Genotypic Disequilibrium

ทดสอบความเป็นอิสระของจีโนไทป์ที่ตำแหน่งหนึ่งจากจีโนไทป์ที่ตำแหน่งอื่น โดยการประมาณค่า p-Value ด้วยวิธี Markov Chain Method ตามวิธีการของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization: 1000, Batches: 100 และ Iterations per Batch: 1000) และปรับระดับความน่าจะเป็น (p-Value) สำหรับการใช้ข้อมูลชุดเดิมวิเคราะห์หลายครั้ง (Multiple Test) ด้วย Bonferroni Correction (Rice, 1989)

ประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่าง

1. ทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลิล (Genic Differentiation) และความถี่จีโนไทป์ (Genotypic Differentiation) ระหว่างกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ Exact Tests โดยการประมาณค่า Exact p-Value ด้วยวิธี Markov Chain Method ตามวิธีการของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization: 1000, Batches: 10 และ Iterations per Batch: 2000) และปรับระดับความน่าจะเป็น (p-Value) สำหรับการใช้ข้อมูลชุดเดิมวิเคราะห์หลายครั้ง (Multiple Test) ด้วย Bonferroni Correction (Rice, 1989)

วิเคราะห์ข้อมูล 1.1 ถึง 2.1 ด้วยโปรแกรม GENEPOP Version 3.4 (Raymond & Rousset, 1995)

2. สัมประสิทธิ์-*F* (*F*-Coefficients)

ตรวจสอบโครงสร้างของประชากรโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ F_{ST} Wright (1978) ใช้ค่าสัมประสิทธ์ *F* (F_{ST}, F_{IS} และ F_{IT}) ในการอธิบายโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร โดยใช้ค่าความแตกต่างของ Ho กับ He โดย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

F_{ST} เป็นค่าที่วัดระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรต่าง ๆ หาก F_{ST} มีค่าสูง แสดงว่า มีการแบ่งประชากรย่อย

$$F_{ST} = (Ht-Hs)/ Ht$$

F_{IS} เป็นค่าที่บอกระดับความเบี่ยงเบนจากสมดุล Hardy-Weinberg ของประชากรย่อย

$$F_{IS} = (Hs-Ho)/ Hs$$

F_{IT} เป็นค่าที่บอกระดับการเบี่ยงเบนสมดุล Hardy-Weinberg ของประชากรทั้งหมด

$$F_{IT} = (Ht-Ho)/ Ht$$

โดย Hs = ค่าเฉลี่ยของ He จากยีนทุกตำแหน่งของประชากรย่อย

Ht = ค่าเฉลี่ยของ He จากยีนทุกตำแหน่งเฉลี่ยในทุกประชากร

Ho = ค่าเฉลี่ยของ Ho จากยีนทุกตำแหน่งภายในประชากรย่อย

Weir and Cockerham (1984) ได้ปรับค่าสัมประสิทธิ์ *F* ของ Wright (1978) โดยการให้น้ำหนักกับจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์จริง มีหลักการโดยสังเขปดังนี้

สำหรับหนึ่งอัลลิล:

$$F_{IT,l,a} = 1-(C/ (A+B+C)$$

$$F_{ST,l,a} = A/ (A+B+C)$$

$$F_{IS,l,a} = 1-(C/ (B+C))$$

$A = nq (s^2-(pq (1-pq)-(r-1)s^2/ r-hq/4)/ (nq-1))/ nc$

$B = nq (pq (1-pq (1-pq)-(r-1)s^2/ r-(2nq-1) hq/ (4nq))/ (nq-1)$

$C = hq/ 2$

p_i = ความถี่ของอัลลิล A ในประชากร i

n_i = ขนาดประชากร i

h_i = สัดส่วนของสัตว์ที่เป็น Heterozygote สำหรับอัลลิล A

nq = ค่าเฉลี่ยของขนาดประชากร

$$nc = (r\,nq- \sum_i (n_i^2)/ (r\,nq))/ (r-1)$$

r = จำนวนประชากรที่นำมาเปรียบเทียบ

$$pq = \sum_i (n_i p_i) / (r\ nq)$$

ความถี่เฉลี่ยของอัลลิล A

$$s^2 = \sum_i (n_i (p_i - pq)^2) / ((r-1)\ nq)$$

ความแปรปรวนของความถี่อัลลิล A ในทุกประชากร

$$hq = \sum_i (n_i h_i) / (r\ nq)$$

ค่าเฉลี่ย Heterozygote ของอัลลิล A

อัลลิลทั้งหมดทุกตำแหน่ง:

$$F_{IT} = \sum_l \sum_a F_{IT,l,a}$$

$$F_{ST} = \sum_l \sum_a F_{ST,l,a}$$

$$F_{IS} = \sum_l \sum_a F_{IS,l,a}$$

ทำการทดสอบทางสถิติด้วยโปรแกรม FSTAT Version 2.9.3 for Window (Goudet, 2001) ที่ความเชื่อมั่น 95% CI>0

3. ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic Distance)

คำนวณโดยการนำความถี่อัลลิลมาสุ่มตัวอย่างซ้ำ 1,000 ครั้ง (Bootstrap) โดยโปรแกรม SEQBOOT และหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรมตามวิธี Cavalli-Sforza and Edwards Chord Distance (1967) โดยโปรแกรม GENDIST วิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดโดยชุดโปรแกรม PHYLIP Version 3.61 (Felsenstein, 1993)

ประเมินแนวโน้มการจัดกลุ่มตามความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่าง

1. แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรม

นำค่าระยะห่างทางพันธุกรรม Cavalli-Sforza and Edwards Chord Distance (1967) มาจัดแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) และแสดงผลในรูปแผนภูมิ Dendrogram ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์ของการจัดกลุ่มเมื่อ สุ่มตัวอย่างซ้ำ 1,000 ครั้ง (Consensus Tree) ด้วยโปรแกรม NEIGHBOR และ CONSENSE วิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดโดยชุดโปรแกรม PHYLIP (Felsenstein, 1993)

2. การวิเคราะห์แบ่งส่วนหลายมิติ (Multi Dimensional Scaling: MDS)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นำค่าระยะห่างทางพันธุกรรม Cavalli-Sforza and Edwards Chord Distance (1967) มากำหนดจุดบน Ordination ด้วยการสุ่มหลาย ๆ ครั้งจนได้ภาพตรงกับ Distance Metrix ความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มดูจากค่า Stress Value (Stress Value>0.2=Poor: 0.2-0.1=Fair: 0.1-0.05=Good: 0.05-0.025=Excellent: 0.00=Perfect) (Giguere, 2006) วิเคราะห์ MDS ด้วยโปรแกรม SPSS Version 11.5 (SPSS Inc., 2002)

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบพื้นฐาน (Principle ComponentAnalysis: PCA)

นำความถี่อัลลิลมากำหนดตำแหน่งตัวอย่างบนแกน ซึ่งใช้อธิบายความแปรปรวนของข้อมูล โดยแกนที่หนึ่ง จะอธิบายรูปแบบความแปรปรวนของกลุ่มตัวอย่าง (% of Variance) ได้ดีที่สุด และแกนที่สองที่อธิบายได้ดีรองลงมาวิเคราะห์ PCA โดยใช้โปรแกรม PCA-GEN Version 1.2 (Goudet, 1999) ทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติของแกนโดย Permutation 1,000 ครั้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University