บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทั่วไปและชีววิทยาบางประการของปลากะพงขาว

1. การเรียกชื่อและอนุกรมวิธานของปลากะพงขาว

ปลากะพงขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lates calcarifer* Bloch มีชื่อสามัญว่า Giant perch, Seabass, White seabass, silver seaperch, Palmer และ Baramundi (Kungvankij, Tiro, Pudadera, & Potesta,1985)

Phylum Chordata

Sub-Phylum vertebrata

Class Pisces

Sub-Class Teleosteii

Order Perciformes

Family Centropomidae

Genus *Lates*

Species *Lates calcarifer* Bloch (Kallasam & Thirunavukkarasu, 2003)

2. การแพร่กระจายของปลากะพงขาว

ปลากะพงขาว เป็นปลามีเกล็ดขนาดใหญ่ จัดอยู่ในประเภท ปลาสองน้ำ (Catadromous) อาศัยอยู่น้ำจืด น้ำเค็ม น้ำกร่อย ปากแม่น้ำ ทะเลสาบ ป่าชายเลน และชายฝั่ง (Cappo, De'ath, Boyle, Aumend, Olbrich, Hoedt, Perna, & Brunskill, 2005) และพบทั่ว ๆ ไปในเขตร้อน อินโดแปซิฟิก ตะวันตก อ่าวเปอร์เซีย จีน ไต้หวัน และทางใต้ของประเทศญี่ปุ่น ทางใต้ของปาปัวนิวกินี และทางเหนือของประเทศออสเตรเลีย (www.fishbase.org; ภาพที่ 2-1) สำหรับในประเทศไทยพบมากแถบจังหวัดชายทะเลและตามแม่น้ำลำคลอง เช่น ปากแม่น้ำบางปะกง แม่น้ำประแสร์ แม่น้ำเวฬุ แม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำแม่กลอง แม่น้ำท่าจีน และตามชายฝั่งทะเลของจังหวัด จันทบุรี ตราด สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา (กัลยา ยงพฤกษา, 2529)

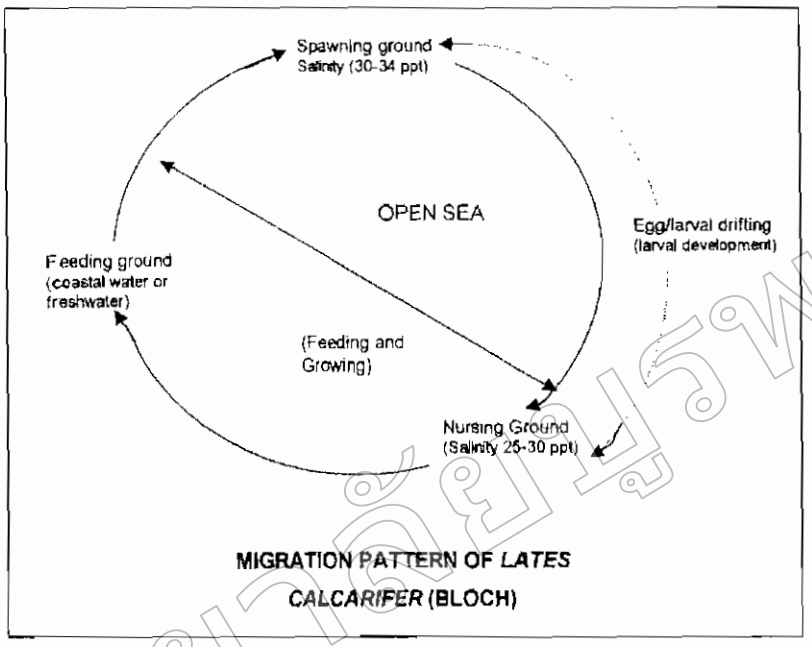
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 2-1 การแพร่กระจายของปลากะพงขาวในโลก (www.fishbase.org) โดยจุดสีดำแสดงบริเวณที่มีการแพร่กระจายของปลากะพงขาว

3. วงจรชีวิตของปลากะพงขาว

ปลากะพงขาวโตเต็มที่เมื่ออายุ 2-3 ปี โดยเริ่มแรกมักจะเป็นเพศผู้ก่อน ซึ่งมีน้ำหนัก 1.5-3 กิโลกรัม และจะเปลี่ยนเป็นเพศเมีย ภายใน 3-5 ปี มีน้ำหนัก 3.5-4 กิโลกรัม (Abraham, Trirunavukkarasu, & Kallasam, 2003; Kallasam & Trirunavukkarasu, 2003; Schipp, 1991) ในการศึกษาของ Moore (1979) ปลากะพงขาวในธรรมชาติของประเทศปาปัวนิวกินีพบว่าความยาวปลากะพงขาวประมาณ 89.5 เซนติเมตร มักเป็นเพศผู้ และปลากะพงขาวที่มีความยาวประมาณ 101.5 เซนติเมตร มักจะเป็นเพศเมีย และยังพบว่าสัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 3.8 ต่อ 1 วงจรชีวิตของปลากะพงขาวต้องมีการเคลื่อนย้ายไปมาระหว่างแหล่งน้ำเค็มและน้ำจืด เพื่อการเติบโตและแพร่พันธุ์ (สุจินทร์ มณีวงศ์ และสวัสดิ์ วงศ์สมนึก, 2517) ปลากะพงขาวจะผสมพันธุ์และวางไข่ในน้ำทะเลลึกที่มีความเค็มประมาณ 30-34 ส่วนในพันส่วน (Trirunavukkarasu, Kailasam, & Abraham, 2003) หลังจากนั้นไข่จะถูกพัดพาเข้าสู่ชายฝั่ง และฟักออกเป็นตัว ลูกปลากะพงขาวที่ฟักออกเป็นตัวแล้วจะดำรงชีวิตอยู่ในน้ำกร่อยหรือน้ำจืด จนมีอายุได้ 2-3 ปี ที่มีขนาด 3-5 กิโลกรัม ก็จะออกสู่ทะเลเพื่อทำการผสมพันธุ์และวางไข่ต่อไป (Kungvankij, Tiro, Pudadera, & Potesta,1985) ดังภาพที่ 2-2 ไม่พบหลักฐานว่าปลากะพงขาวที่ไปวางไข่จะกลับมาที่ฝั่งอีก (Davis, 1986) ปลากะพงขาวตัวเต็มวัยที่ประเทศปาปัวนิวกินี ส่วนใหญ่จะอาศัยอยู่ใกล้บริเวณปากแม่น้ำ 75 เปอร์เซ็นต์ 20 เปอร์เซ็นต์ มีการเคลื่อนที่ไกลกว่า 100 กิโลเมตร และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีการเคลื่อนที่ไกลกว่า 500 กิโลเมตรจากแหล่งที่อาศัยอยู่ (Blaber, Milton, & Salini, 2008)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-2 วงจรชีวิตของปลากะพงขาว (Kallasam & Trirunavukkarasu, 2003)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็น 1 ใน 3 ของความหลากหลายทางชีวภาพ (biological diversity หรือ biodiversity) (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2538) ซึ่งประกอบด้วย

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม
2. ความหลากหลายของชนิดพันธุ์
3. ความหลากหลายทางนิเวศวิทยา

ความหลากหลายทางพันธุกรรม หมายถึงพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชีวิตที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากรุ่นพ่อแม่และส่งต่อไปยังรุ่นต่อ ๆ ไป (สิริกุล บรรพพงศ์, 2546) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของประชากร เนื่องจากความหลากรูปของอัลลิลหรือยีนที่ควบคุมลักษณะหนึ่ง ๆ ซึ่งเป็นหลักประกันถึงความอยู่รอดและความยั่งยืนของสปีชีส์ (พรรณนภา ศักดิ์สูง, 2546) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรสามารถอธิบายได้ 2 ระดับ คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร และความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร คือ ระดับความผันแปรของหน่วยพันธุกรรมระหว่างสมาชิกของประชากรเดียวกันสามารถวัดได้จากดัชนีต่อไปนี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. ร้อยละของยีนในสภาวะหลากรูปแบบ (percent polymorphic loci) คือ สัดส่วนของยีนที่มีอัลลิลมากกว่า 1 อัลลิลต่อตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละของจำนวนยีนที่ศึกษาทั้งหมด หากศึกษาจากตัวอย่างต่ำกว่า 100 ตัวอย่างต่อประชากร ยีนที่ถือว่าหลากรูปแบบต้องมีความถี่ของอัลลิลที่พบมากที่สุดไม่เกิน 0.95 (P_{95}) ส่วนการศึกษาที่ใช้ตัวอย่างต่อประชากร 100 ตัวอย่างขึ้นไปสามารถใช้เกณฑ์ P_{99} ได้ (Hedrick, 1985)

2. จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง (number of allele per locus: A)

3. Efective number of allele (A_e) คือ จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งที่คำนวนจากความถี่อัลลิล ใช้ในการเปรียบเทียบประชากรที่มีจำนวนและการกระจายตัวของอัลลิลแตกต่างกัน โดยปกติจะมีค่าน้อยกว่าจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งที่พบ (Allendorf & Luikart, 2007) คำนวนได้จากสูตร

$$A_e = 1/\sum p_i^2$$

เมื่อ p_i คือ ความถี่ของอัลลิลที่ i

4. เฮตเทอโรไซโกซิตี้ (heterozygosity) คือ สัดส่วนของจีโนไทป์ที่เป็นเฮตเทอโรไซโกตต่อจีโนไทป์ทั้งหมดของแต่ละตำแหน่ง ซึ่งสามารถคำนวณได้จากตัวอย่าง (ค่าสังเกต; Observed heterozygosity; H_o) และจากความถี่อัลลิล (ค่าคาดหมาย; Expected heterozygosity; H_e)

5. Allelic Richness (A_r) คือ จำนวนอัลลิลที่คำนวณจากความเป็นจริงที่เป็นอิสระจากจำนวนตัวอย่าง และใช้เปรียบเทียบความหลากหลายของอัลลิล ในประชากรที่มีจำนวนตัวอย่างไม่เท่ากัน (Foulley & Ollivier, 2006)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร คือ ระดับความแตกต่างขององค์ประกอบทางพันธุกรรมของต่างประชากร ซึ่งสามารถวัดได้ด้วยดัชนีต่อไปนี้

1. ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) คือ ค่าที่แสดงถึงอัลลิลที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละตำแหน่งหลังจากที่ประชากรเริ่มมีการแยกออกจากกัน โดยจะบ่งบอกถึงความถี่และปริมาณการถ่ายเทยีนระหว่างประชากร ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 โดยค่า 0 บ่งชี้ถึงความถี่อัลลิลที่คล้ายกันของ 2 ประชากร และ 1 บ่งชี้ถึงความถี่อัลลิลที่แตกต่างกันของ 2 ประชากร (Hedrick, 2005) ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมสามารถนำไปใช้ในการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic dendrogram)

2. ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient) คือ ค่าที่แสดงความสัมพันธ์ระดับความหลากหลายภายในกลุ่มประชากร ประกอบด้วย 3 ค่า คือ

- F_{st} เป็นค่าที่วัดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรย่อย มีค่าระหว่าง 0 ถึง 1 ถ้า F_{st} มีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่าตัวอย่างที่ศึกษานั้นมีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อยจริง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

- F_{is} เป็นค่าที่บอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรย่อย ค่านี้มีทั้งค่าบวกและลบ โดยค่าที่เป็นบวกแสดงว่ามีสัดส่วนโฮโมไซโกตในประชากรมากกว่าค่าที่คาดหมาย

- F_{it} เป็นค่าที่บอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กของประชากรทั้งหมด (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2543) ค่านี้มีทั้งค่าบวกและลบ โดยค่าที่เป็นบวกแสดงว่ามีสัดส่วนโฮโมไซโกตในประชากรมากกว่าค่าที่คาดหมาย (Nguyen et al., 2005b)

3. Analysis of Molecular Variance; AMOVA เป็นการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากร ความแตกต่างของประชากรประเมินจากระดับความแปรปรวนระหว่างประชากร เทียบกับความแปรปรวนทั้งหมด การวิเคราะห์ AMOVA มีหลักการคล้ายกับการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) (Mengoni & Bazzicalupo, 2002)

ประชากรในทางทฤษฎี (Ideal population) และสมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก

กฎสมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ได้รับการค้นพบโดยนักคณิตศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ ฮาร์ดี และแพทย์ชาวเยอรมันชื่อ ไวน์เบิร์ก ในปี ค.ศ.1908 กฎของสมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์กกล่าว ไว้ว่า ประชากรที่ใช้อ้างอิงในทางพันธุศาสตร์ หรือประชากรในทางทฤษฎี (ideal population) เป็นประชากรที่มีขนาดใหญ่ ผสมพันธุ์แบบสุ่ม ไม่มีอิทธิพลของการกลายพันธุ์ ไม่มีการคัดเลือกและการอพยพเข้าออก ซึ่งทำให้ความถี่อัลลิลความถี่จีโนไทป์มีค่าคงที่ทุกรุ่น และความถี่อัลลิลสามารถใช้ทำนายความถี่จีโนไทป์ในรุ่นถัดไปได้ (กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, 2549; พรรณี ฐิตาพิชิต, 2545; วิสุทธิ์ ใบไม้, 2536)

กระบวนการทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเปลี่ยนแปลง

ในประชากรจริง มักมีการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากกระบวนการดังต่อไปนี้

1. การคัดเลือก (selection) คือ การที่บางจีโนไทป์ในประชากรไม่สามารถถ่ายทอดได้โดยสุ่ม ซึ่งการคัดเลือกนี้สามารถเกิดขึ้นได้โดยมนุษย์หรือโดยธรรมชาติ การคัดเลือกโดยธรรมชาติคือการที่ประชากรมีการผสมพันธุ์เพื่อเลือกจีโนไทป์ที่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมนั้น ๆ ได้ ซึ่งการคัดเลือกโดยธรรมชาติเป็นปัจจัยที่จะเพิ่มความถี่ของอัลลิลที่เป็นประโยชน์ต่อการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมนั้น ๆ (local adaptation) (พรรณี ฐิตาพิชิต, 2545)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ส่วนการคัดเลือกโดยมนุษย์อาจเกิดขึ้นโดยตั้งใจและอาจเกิดขึ้นโดยไม่ได้ตั้งใจ การคัดเลือกโดยตั้งใจ เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ทำให้ความถี่ของอัลลิลที่ควบคุมลักษณะที่เราต้องการขึ้นในรุ่นถัดไป การคัดเลือกโดยไม่ได้ตั้งใจ อาจรวมถึงการคัดเลือกด้วยกระบวนการปฏิบัติในโรงเพาะฟัก เช่น นักเพาะพันธุ์ถนัดที่จะใช้แม่ปลาขนาดเล็กมาเป็นแม่พันธุ์เนื่องจากรีดไข่ง่าย สะดวก เมื่อปฏิบัติไปหลายชั่วอายุก็มีผลเท่ากับการคัดเลือกปลาให้ขนาดเล็กลง เจริญพันธุ์เร็ว การเจริญเติบโตลดลง (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2551a)

2. การขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) คือ การเปลี่ยนแปลงความถี่อัลลิลหรือมีการสูญหายของอัลลิลในแต่ละชั่วอายุโดยกระบวนการสุ่มและมีทิศทางไม่แน่นอน (Hallerman, 2003; Templeton, 2006) โดยอัตราของการเปลี่ยนแปลงของความหลากหลายจะขึ้นอยู่กับขนาดของประชากร (พรรณี ชูติพิชิต, 2545 ; Ngyen, 2006 a) ซึ่งประชากรขนาดเล็กจะมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรขนาดใหญ่ (วันศุกร์ เสนานาญ, 2551)

การขาดช่วงทางพันธุกรรมในโรงเพาะฟักอาจเกิดจาก 1). การใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อยมาเป็นประชากรเริ่มต้น ซึ่งพ่อแม่พันธุ์เหล่านั้นอาจไม่เป็นตัวแทนของประชากรดั้งเดิม (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2551 b) และ2). แนวทางปฏิบัติในโรงเพาะฟักที่ทำให้สัดส่วนเพศผู้กับเพศเมียไม่เท่ากัน หรือมีตัวแทนของครอบครัวต่าง ๆ ไม่เท่ากันในรุ่นลูก (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2543) เช่น หลักการที่ปฏิบัติกันในโรงเพาะฟักโดยเฉพาะใน ปลากะพงขาว ปลาเก๋า และปลาตะเพียนขาว (ที่ปล่อยให้ผสมกันเอง) ซึ่งส่งผลให้ปลาไม่ได้ผสมพันธุ์ทุกตัว ทำให้สัดส่วนเพศผู้กับเพศเมียที่ผสมพันธุ์จริง ๆ ไม่เท่ากัน และลูกที่ได้จากพ่อแม่แต่ละคู่มักจะไม่เท่ากันจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ effective population size: N_e ของพ่อแม่พันธุ์ในโรงเพาะฟักลดลงอย่างรวดเร็วจนเกิดปัญหาในปัจจุบันของโรงเพาะฟัก (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2551b) effective population size: N_e คือ ขนาดของประชากรจริงที่มีพฤติกรรมเหมือนประชากรในทางทฤษฎี ซึ่งประชากรจริงมักจะมีคุณสมบัติที่เบี่ยงเบนไปจากประชากรในทางทฤษฎีคือ ขนาดประชากรไม่ใหญ่ ไม่มีการผสมพันธุ์แบบสุ่ม มีการคัดเลือกและมีการถ่ายเทยีน (Lande & Barrowclough, 1987) ซึ่งผลของ genetic drift คือ การลดระดับเฮตเทอโรไซโกซิตี้ และการลดลงของความหลากหลายของจำนวนอัลลิลในประชากร

3. การถ่ายเทยีน (Gene flow) คือ การที่สมาชิกบางส่วนของประชากรย้ายออกจากประชากรหนึ่ง หรือการที่มีสมาชิกจากประชากรอื่นย้ายเข้ามาแล้วมีการผสมพันธุ์ขึ้น เกิดการถ่ายเทยีนกันและกัน ทำให้ความถี่ของบางอัลลิลในประชากรทั้งสองเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Gharrett & Zhivotovsky, 2003) และอัตราการเปลี่ยนแปลงนี้จะมากหรือน้อยจะขึ้นกับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรทั้งสองนั้นและจำนวนสมาชิกที่แลกเปลี่ยนกันต่อรุ่น (number of migrant per generation) (พรรณี ชูติพิชิต, 2545) ผลของการแลกเปลี่ยนยีนต่อความหลากหลายทาง

พันธุกรรม คือ การเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรผู้รับ แต่จะลดความแตกต่างระหว่างประชากร (Gharrett & Zhivotovsky, 2003)

4. การกลาย (mutation) คือ ความคลาดเคลื่อนของข้อมูลทางพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูก มักเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยสุ่ม การกลายนับว่าเป็นจุดเริ่มต้นที่สามารถสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อการเกิดวิวัฒนาการ (พรรณี ฐิตาพิชิต, 2545) ซึ่งอาจมีผลดีหรือผลเสียก็ได้ การกลายสามารถแบ่งออกเป็น 2 ระดับคือ การกลายระดับดีเอ็นเอและการกลายระดับโครโมโซม (Allendorf & Luikart, 2006; Hallerman & Epifanio, 2003; Hedrick, 2005)

เครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม

เครื่องหมายพันธุกรรม หมายถึง เครื่องหมายที่สามารถบ่งชี้ลักษณะของฟีโนไทป์ที่สังเกตได้จากการมองเห็นหรือการตรวจด้วยสารเคมี เครื่องหมายพันธุกรรมอาจระบุถึงยีนที่มีคุณสมบัติให้โปรตีนในรูปแบบที่จำแนกความแตกต่างได้ หรือเป็นดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ยีนที่มีสภาวะหลากรูปแบบ และสามารถจำแนกรูปแบบที่แตกต่างกันได้โดยเทคนิคทางโมเลกุล (อมรา คัมภิรานนท์, 2542) เราสามารถแบ่งเครื่องหมายพันธุกรรมได้เป็น 2 ประเภท จากส่วนของยีนที่ทำหน้าที่และไม่ทำหน้าที่ (Chistiakov, Hellemans, & Volckaert, 2006) ได้แก่

1. เครื่องหมายประเภท Type I คือเป็นเครื่องหมายที่เป็นส่วนหนึ่งของยีนที่ทำหน้าที่ ได้แก่ RFLP ส่วนใหญ่ อัลโลไซม์ ไมโครแซลเทลไลท์ และ Single Nucleotide Polymorphism; SNP) ของ Expressed Sequence Tag; EST ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของยีนที่แสดงออก

2. เครื่องหมายประเภท Type II คือเป็นเครื่องหมายที่เป็นส่วนหนึ่งของจีโนมที่ไม่ทำหน้าที่ ได้แก่ RAPDs, AFLP, ไมโครแซลเทลไลท์ ส่วนใหญ่ และ SNP ของส่วนที่ไม่ใช่ยีน ซึ่งเครื่องหมายเหล่านี้เหมาะสำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร เนื่องจากเครื่องหมายพันธุกรรมเหล่านี้ไม่อยู่ภายใต้อิทธิพลของการคัดเลือก ซึ่งไม่ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรความหลากหลายที่เกิดใหม่ก็จะมีการสะสมไว้ จึงสามารถที่จะสะท้อนโครงสร้างที่แท้จริงของประชากรได้ ตลอดจนความหลากหลายภายในและระหว่างประชากรได้ดี (Liu & Cordes, 2004) (ตารางที่ 2-1)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-1 ประเภทของเครื่องหมายพันธุกรรมระดับโมเลกุล ลักษณะ และการประยุกต์ใช้ (ดัดแปลงจาก Liu & Cordes, 2004)

ชนิดเครื่องหมาย	ชื่อย่อ	ต้องมีข้อมูลมาก่อนหรือไม่	แบบการถ่ายทอด	ประเภทของเครื่องหมาย	จำนวนตำแหน่ง	จำนวนอัลลิล	ระดับความหลากหลาย	การประยุกต์ใช้
Allozyme,	-	มี	กฎเมนเดล, โคโดมิแนนท์	Type I	1	2-6	ต่ำ	Linkage mapping ความหลากหลายประชากร จำแนกชนิด
Mitochondrial DNA	mtDNA	ไม่มี	จากแม่	-	-	หลายแฮพโพลไทป์	-	ความหลากหลายประชากร จำแนกชนิด
Restriction Fragment Length Polymorphism	RFLP	มี	กฎเมนเดล, โคโดมิแนนท์	Type I หรือ Type II	1	2	ต่ำ	Linkage mapping
Random Amplified Polymorphic DNA	RAPD, AP-PCR	ไม่มี	กฎเมนเดล, โดมิแนนท์	Type II	หลาย	2	ปานกลาง	ความหลากหลายประชากร จำแนกชนิด
Amplified Fragment Length Polymorphism	AFLP	ไม่มี	กฎเมนเดล, โดมิแนนท์	Type II	หลาย	2	สูง	Linkage mapping ความหลากหลายประชากร
Microsatellites	SSR	มี	กฎเมนเดล, โคโดมิแนนท์	ส่วนมากเป็น Type II	1	หลายอัลลิล	สูง	Linkage mapping ความหลากหลายประชากร ศึกษาพ่อแม่
Expressed Sequence tags	EST	มี	กฎเมนเดล, โคโดมิแนนท์	Type I	1	2	ต่ำ	Linkage mapping, Physical mapping, Comparative mapping
Single Nucleotide Polymorphism	SNP	มี	กฎเมนเดล, โคโดมิแนนท์	Type I หรือ Type II	1	2-4	สูง	Linkage mapping ความหลากหลายประชากร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-1 ประเภทของเครื่องหมายพันธุกรรมระดับโมเลกุล ลักษณะ และการประยุกต์ใช้ (ต่อ) (ดัดแปลงจาก Liu & Cordes, 2004)

ชนิดเครื่องหมาย	ชื่อย่อ	ต้องมีข้อมูลมาก่อนหรือไม่	แบบการถ่ายทอด	ประเภทของเครื่องหมาย	จำนวนตำแหน่ง	จำนวนอัลลิล	ระดับของความหลากหลาย	การประยุกต์ใช้
Insertions/deletions	Indels	มี	กฎเมนเดล, โคโดมิแนนท์	Type I หรือ Type II	1	2	ต่ำ	Linkage mapping

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นอกจากนี้ เครื่องหมายพันธุกรรมยังสามารถแบ่งออกตามประเภทของสารพันธุกรรมได้เป็น ระดับโปรตีน และระดับดีเอ็นเอ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) คือ

1. เครื่องหมายพันธุกรรมระดับโปรตีน ได้แก่ อัลโลไซม์ (Allozymes) และ ไอโซไซม์ (Isozymes)

อัลโลไซม์ คือ เอนไซม์ที่ผลิตโดยต่างอัลลิลในตำแหน่งเดียวกัน (Nguyen, 2006 b) และไอโซไซม์ คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เหมือนกันที่ผลิตในต่างตำแหน่ง (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัลโลไซม์อาศัยหลักการที่ว่าอัลโลไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ต่างกันและกรดอะมิโนเหล่านั้นมีประจุสุทธิ ขนาด และรูปร่างที่ต่างกัน ดังนั้นจึงนำไปแยกที่สนามไฟฟ้าสายของกรดอะมิโนที่ต่างกันจะแยกจากกัน (electrophoresis) และเมื่อย้อมเจลดังกล่าวด้วยสารเคมี ก็สามารถที่จะมองเห็นแถบของ อัลโลไซม์และสามารถที่จะอ่านจีโนไทป์ได้ (Nguyen, 2006 b)

ข้อดีของอัลโลไซม์ คือ อัลโลไซม์ส่วนใหญ่ถ่ายทอดตามกฎของเมนเดล โดยมีการแสดงออกเป็นแบบข่มร่วม ข้อดีคือ ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก ใช้เครื่องมือง่าย ๆ ไม่ซับซ้อน (ศิราวุธ กลิ่นบุหงา บวรลักษณ์ คำน้ำทอง และอุทัยรัตน์ ณ นคร, 2551)

ข้อเสียของอัลโลไซม์ คือ จำเป็นต้องรักษาตัวอย่างในสภาพสดและส่วนใหญ่ต้องฆ่าสิ่งมีชีวิตนั้นทำให้ไม่เหมาะสมกับการศึกษาสิ่งมีชีวิตที่ใกล้สูญพันธุ์ หรือเนื้อเยื่อที่ผ่านการเก็บรักษามาระยะเวลาหนึ่ง (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2543) นอกจากนี้อัลโลไซม์ยังมีความหลากหลายต่ำ เนื่องจากเอนไซม์ที่สร้างนั้นสำคัญต่อการดำรงชีวิต เมื่อเกิดการกลาย เอนไซม์ที่สร้างอาจไม่ทำหน้าที่ สัตว์ที่มีอัลลิลใหม่จึงมักตายหรือทำหน้าที่ผิดไป ดังนั้นจะไม่สามารถแยกความแตกต่างของประชากรที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (Liu & Cordes, 2004)

2. เครื่องหมายพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอ ได้แก่

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) คือ เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจความผันแปรหรือแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มสั้น ๆ เพียงชนิดเดียว เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งในจีโนม และตรวจสอบผลที่ได้โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส สามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เทคนิคอาร์เอพีดีทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ให้ข้อมูลมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยประมาณ 25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา (สมาคมพันธุศาสตร์, 2548)

ข้อดีของเครื่องหมาย RAPD คือ แถบดีเอ็นเอที่ได้แสดงถึงลำดับของดีเอ็นเอที่กระจายอยู่ทั่วจีโนมและเป็นดีเอ็นเอที่ไม่ทำหน้าที่จึงสะสมความหลากหลายไว้สูง และวิธีการศึกษาง่ายโดยไม่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ต้องมีความรู้ในเรื่องลำดับเบสของบริเวณที่ต้องการศึกษา ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละครั้งจะได้ผลที่ครอบคลุมหลายตำแหน่ง (Dayhoff & Eck, 2004)

ข้อเสียของเครื่องหมาย RAPD คือ ในกรณีที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมเกิดจากการขาดหายหรือการแทรกของลำดับเบสจะทำให้ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์แตกต่างจากเดิม จึงทำให้อ่านเหมือนว่าเป็นแถบดีเอ็นเอของตำแหน่งอื่น นอกจากนี้เทคนิคนี้ไม่สามารถแยกแถบดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่ต่างกัน จึงทำให้ผลการอ่านคลาดเคลื่อน (ศิราวุธ กลิ่นบุหงา และคณะ, 2551)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) คือ เทคนิคที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดสายดีเอ็นเอเพื่อที่จะตรวจสอบความแตกต่างของรูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัด ณ ตำแหน่งที่จำเพาะ (วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541) โดยแต่ละเอนไซม์มีตำแหน่งการตัดเฉพาะที่ต่างกัน ดังนั้นหากเกิดการกลายในตำแหน่งที่ตัดบางตำแหน่ง ทำให้เอนไซม์นั้นตัดสายดีเอ็นเอไม่ได้ ผลการตัดก็จะให้ดีเอ็นเอน้อยชิ้นกว่าเดิม และจะมีดีเอ็นเอบางชิ้นใหญ่กว่าเดิม เมื่อนำมาแยกด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส ก็จะพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษา (Liu & Cordes, 2004)

ข้อดีของเครื่องหมาย RFLP คือ มีการถ่ายทอดแบบข่มร่วม ดีเอ็นเอแต่ละชิ้นมักมีขนาดแตกต่างกันชัดเจน เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมจึงทำให้สามารถตรวจความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ (Liu & Cordes, 2004)

ข้อเสียของเครื่องหมาย RFLP คือ ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมจะสามารถตรวจสอบจากส่วนที่มีจุดตัดเท่านั้นจึงทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ได้จากเทคนิคนี้มีค่าต่ำและเบี่ยงเบนไปจากความจริงมากจึงควรที่จะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะหลายเอนไซม์ และการศึกษาวิธีนี้ต้องรู้ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่จะศึกษาก่อนเพื่อสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการทำพีซีอาร์ และเนื่องจากการศึกษาด้วยวิธีนี้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจะเป็นการศึกษาเพียงตำแหน่งเดียวทำให้ไม่สามารถศึกษาตัวอย่างได้ครั้งละมาก ๆ ในเวลาอันจำกัดได้ (Liu & Cordes, 2004)

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) คือ เป็นการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ซึ่งเป็นการรวมข้อดีของ RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน แต่ AFLP จะมีประสิทธิภาพมากกว่า RFLP เพราะสามารถที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้หลายตำแหน่งในเวลาเดียวกันและมีผลให้การทำซ้ำสูงกว่า RAPD (Dayhoff & Eck, 2004)

ข้อดีของเครื่องหมาย AFLP คือ ให้ผลคงที่เมื่อทำซ้ำเนื่องจากความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ทำพีซีอาร์ และการวิเคราะห์ด้วย AFLP ไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับของนิวคลีโอไทป์ของสิ่งมีชีวิตเหมือนกับ RAPD และที่สำคัญคือเทคนิคนี้สามารถให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่หลากหลายจำนวนมาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

และมีไพรเมอร์ให้เลือกใช้มาก จึงสามารถที่จะประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ เช่น ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม, ศึกษาลักษณะพันธุกรรม, การจำแนกประชากร และการสร้างแผนที่ยีน (ศิราวุธ กลิ่นบุหงา และคณะ, 2551)

ข้อเสียของเครื่องหมาย AFLP คือ เป็นเครื่องหมายแบบข่มสมบูรณ์ ซึ่งไม่สามารถที่จะบ่งชี้เฮตเทอโรไซโกซิตี้ในแต่ละตำแหน่งได้ จึงไม่สามารถที่จะจำแนกพ่อแม่ลูกของสัตว์น้ำที่คัดพันธุ์ในโรงเพาะได้

ไมโครแซลเทลไลท์; Microsatellite คือ สายดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุด ๆ โดยแต่ละชุดที่ซ้ำ ๆ จะประกอบด้วยเบสที่ซ้ำกันเพียง 1-6 คู่เบส (Liu & Cordes, 2004) บางครั้งอาจเรียกเบสซ้ำชนิดนี้ว่า Simple Sequence Repeats; SSR หรือ Short Tandem Repeat; STR ตัวอย่างเบสซ้ำแบบไมโครแซลเทลไลท์ที่มีลำดับเบสแกนลักษณะต่าง ๆ เช่น

ลำดับเบสแกนจำนวน 1 เบส : CCCCCCCCCC หรือ $(C)_{10}$

ลำดับเบสแกนจำนวน 2 เบส : CACACACACACACACA หรือ $(CA)_8$

ลำดับเบสแกนจำนวน 3 เบส : CACCACCACCACCAC หรือ $(CAC)_5$

ลำดับเบสแกนจำนวน 4 เบส : GGGAGGGAGGGAGGGAGGGA หรือ $(GGGA)_5$

ลำดับเบสแกนจำนวน 5 เบส : TTTTATTTTATTTTATTTTATTTTA หรือ $(TTTTA)_5$

(วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541; Brown & Epifanio, 2003; Dayhoff & Eck, 2004) และมีจำนวนของ repeat unit ติดต่อกันจำนวนหลาย ๆ ชุด ไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอ จะกระจายอยู่ทั่วไปในโครโมโซม โดยที่ในจีโนมปลาสามารถพบได้ในทุก ๆ 10 กิโลเบส (Liu & Cordes, 2004)

เนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอมีขนาดไม่ใหญ่ การศึกษาความหลากหลายจึงสามารถทำโดยอาศัยหลักการการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR) ซึ่งจำเป็นจะต้องออกแบบสายดีเอ็นเอเริ่มต้นหรือไพรเมอร์ (Primer) ที่มีลำดับเบสเข้าคู่กันกับลำดับเบสที่ขนาบข้างไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอแล้ว สามารถตรวจดูความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอ โดยแยกขนาดของโมเลกุลดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส บนอะคริลาไมด์เจล (acrylamide gel) ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี หรือการย้อมด้วยสารเคมี ปัจจุบันมีการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยการติดสารเรืองแสงที่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Fluorescent genotyping) (Ginot, Bordelais, Nguyen, & Gyapay, 1996)

ข้อดีของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ คือ มีการถ่ายทอดแบบข่มร่วม มีความหลากหลายสูงจึงสามารถใช้ศึกษาประชากรที่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยได้ดี เช่น ประชากรโรงเพาะฟักกับประชากรธรรมชาติ หรือใช้แยกครอบครัวสัตว์ที่นำมาเลี้ยงปนกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(Carmen & Ablan. 2006) และมีความหลากหลายของจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ที่ถูกพบว่ากระจายอยู่ทั่วไปในโครโมโซม ทำให้มีการนำมาใช้ในการสร้างแผนที่จีโนม (genome mapping) และเพื่อใช้ศึกษารายละเอียด ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในระดับดีเอ็นเอ ในประชากรได้ (ปรีชา ประเทพา, 2543)

ข้อเสียของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ คือ ต้องมีการพัฒนาไพรเมอร์ให้ได้ก่อน ซึ่งต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง นอกจากนี้ยังพบอัลลิลที่ไม่สร้างแถบดีเอ็นเอ (null allele) ทำให้อ่านผลผิดพลาดจากเฮตเทอโรไซโกตเป็นโฮโมไซโกตได้ (ศิราวุธ กลิ่นบุหงา และคณะ, 2551

ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA; mtDNA) คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย ซึ่งไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ ของสัตว์มีลักษณะเป็นวงกลมที่เป็นสายคู่มีความยาวประมาณ 16 กิโลเบส และมีจำนวนหลายพันชุดในแต่ละเซลล์ (Beaumont & Hoare, 2003) ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอมีอัตราการเกิดการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์สูงกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียสประมาณ 5-10 เท่า

ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของสัตว์ประกอบด้วย บริเวณที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ ดังนี้ คือ

1. ยีนควบคุมการสร้างโปรตีน 13 ตำแหน่ง ได้แก่ หน่วยย่อย ที่ 1, 2, 3, 4, 4L, 5 และ 6 ของ NADH dehydrogenase, cytochrom *b*, หน่วยย่อย 3 หน่วย ของ cytochrome *c* oxidase (COI, II, III) และ หน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย ของ Adenosine triphosphase synthetase (ATPase6 และ ATPase8)

2. ยีนที่ควบคุมการสร้าง ribosomal RNA; rRNA จำนวน 2 ตำแหน่งคือ 12S rRNA และ 16S rRNA

3. ยีนที่ควบคุมการสร้าง transfer RNA; tRNA จำนวน 22 ยีน

4. control region หรือที่เรียกว่า D-loop ที่เป็นจุดเริ่มต้นของ การจำลองดัวเองของสายดีเอ็นเอ และการสร้าง messenger RNA ในกระบวนการ transcription (ศิราวุธ กลิ่นบุหงา และคณะ, 2551)

ลักษณะที่สำคัญของ mtDNA ที่เหมาะต่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร คือมีอัตราการกลายของยีนสูงกว่า DNA ในนิวเคลียส ประมาณ 10 เท่า และมีการคงอยู่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงส่วนที่มีการเกิดวิวัฒนาการ และจะถ่ายทอดจากแม่ทางเดียว เนื่องด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงทำให้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2543)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากะพงขาว และสัตว์ทะเลบางชนิด

ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรธรรมชาติของปลากะพงขาวเท่าที่มีการศึกษา มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกับสัตว์น้ำชนิดอื่นที่มีลักษณะการดำรงชีวิตคล้ายปลากะพงขาว เช่น ปลาไหลญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*) (Tseng, Chen, Kao, Tzeng, & Lee, 2001) ปลาตูหนา (*Anguilla anguilla*) (Daemen, Cross, Ollevier, & Volckaert, 2001) (ตารางที่ 2-2) ในขณะที่ประชากรโรงเพาะฟักมีค่าความหลากหลายค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับสัตว์น้ำที่เลี้ยงในโรงเพาะฟักชนิดอื่น เช่น ปลาแซลมอนแอตแลนติก (*Salmo salar*) (Norris, Bradley, & Cunninghaw, 1999) ปลา *Brycon oplinus* (Barroso, Hilsdorf, Moreira, Cabello, & Traub-Cseko, 2005) (ตารางที่ 2-2)

ในประชากรธรรมชาติ ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ ที่ประเมินจากอัลโลไซม์ 11 ตำแหน่ง ในประชากรปลากะพงขาวจาก 3 บริเวณในประเทศออสเตรเลีย มีค่าอยู่ในช่วง 0.028-0.035 (Shaklee & Salini, 1985) ในขณะที่ปลาชนิดอื่น ๆ เช่น ปลาไหลญี่ปุ่น (*A. japonica*) มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ อยู่ในช่วง 0.046-0.061 (Maes & Volckart, 2002) (ตารางที่ 2-2) เมื่อใช้ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอในประชากรปลากะพงขาวธรรมชาติในประเทศออสเตรเลีย มีค่าแฮพโพลไทป์ มีค่าอยู่ในช่วง 0.763-0.933 (Chenoweth, Hughes, Keenan, & Lavery, 1998) ส่วนใน ปลาตูหนา (*A. anguilla*) มีค่าแฮพโพลไทป์ อยู่ในช่วง 0.617-0.819 (Daemen et al., 2001) (ตารางที่ 2-2) นอกจากนี้ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ที่ประเมินจาก เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ของปลากะพงขาวในธรรมชาติ มีค่าอยู่ในช่วง 0.75-0.78 (Yue et al., 2009) ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่พบในประชากร ปลาตูหนา (*A. Anguilla*) (Daemen et al., 2001) และปลาไหลญี่ปุ่น (*A. japonica*) (Chang, Han, & Tzeng, 2007) (ตารางที่ 2-2) ส่วนในประชากรโรงเพาะฟักของปลากะพงขาวที่ประเมินจากไมโครแซทเทลไลท์ 9 ตำแหน่ง มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้อยู่ในช่วง 0.72-0.76 (Zhu et al., 2006) และ 14 ตำแหน่ง มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้อยู่ในช่วง 0.47-0.74 (Yue et al., 2009) (ตารางที่ 2-2)

ประชากรในโรงเพาะฟักของสัตว์น้ำหลายชนิดมักมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าประชากรในธรรมชาติ (ตารางที่ 2-2) ทั้งนี้เป็นผลจากแนวทางการปฏิบัติในโรงเพาะฟัก เช่น การนำพ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อยมาเป็นประชากรตั้งต้น (Norris et al., 1999) การผสมพันธุ์พ่อแม่พันธุ์ในสัดส่วนที่ไม่เท่ากัน (Frost, Brad, & Jerry, 2006) และการเกิดความแปรปรวนของขนาดครอบครัวในรุ่นถัดไป (Withler, 1988) ซึ่งเอื้อให้เกิดการสูญเสียความหลากหลายของอัลลิล และการลดลงของระดับเฮตเทอโรไซโกซิตี้ ตัวอย่างปรากฏการณ์ดังกล่าวพบที่ หอยเชลล์ (*Patinopecten yessoensis*) Li, Xu, and Yu (2007) พบว่าประชากรโรงเพาะฟักในประเทศจีน ซึ่งนำเข้าพันธุ์หอยมาจากประเทศญี่ปุ่นมานานกว่า 20 ปี มีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยกว่าประชากรธรรมชาติในประเทศญี่ปุ่น (ค่าความหลากหลายของโรงเพาะฟัก: อัลลิลต่อตำแหน่งมีค่า

อยู่ในช่วง 4.8-6.7 : ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรในธรรมชาติ: อัลลิลต่อตำแหน่งมีค่าอยู่ในช่วง 7.5-8.3) (ตารางที่ 2-2) ในหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis discus*) Li, Park, Endo, and Kijima (2004) เนื่องจากมีการนำเข้าหอยเป๋าฮื้อพ่อแม่พันธุ์ธรรมชาติมาจากมหาสมุทรแปซิฟิก และมีการเลี้ยงในญี่ปุ่นหลายรุ่นซึ่งลูกพันธุ์ที่เกษตรกรเลี้ยงส่วนใหญ่มาจากโรงเพาะฟัก จึงทำให้ประชากรหอยเป๋าฮื้อ ในโรงเพาะฟักมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยกว่าในประชากรธรรมชาติ (ค่าความหลากหลายของโรงเพาะฟัก: อัลลิลต่อตำแหน่งมีค่าอยู่ในช่วง 3.5-8; ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรในธรรมชาติ: อัลลิลต่อตำแหน่งมีค่าอยู่ในช่วง 21.3-23) (ตารางที่ 2-2) ส่วนในปลากะพงขาว Yue et al. (2009) ศึกษา 9 ประชากร ใน 6 ประเทศ โดยประชากรโรงเพาะฟักที่ออสเตรเลียมีการใช้ลูกรุ่นที่ 3 มาเป็นตัวอย่างจึงทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยกว่าในประชากรธรรมชาติ (ค่าความหลากหลายของโรงเพาะฟัก: อัลลิลต่อตำแหน่งมีค่าอยู่ในช่วง 3.57-8.21; ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรในธรรมชาติ: อัลลิลต่อตำแหน่งมีค่าอยู่ในช่วง 9.14-10.71) (ตารางที่ 2-2)

อย่างไรก็ตาม ในสัตว์น้ำบางชนิด เช่น ปลากัด (*Betta splendens*) ที่ประเมินจากอัลโลไซม์ 7 ตำแหน่ง จากประชากรโรงเพาะฟัก 14 ประชากร ในจังหวัดนครปฐมมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้อยู่ในช่วง 0.091-0.142 ซึ่งโรงเพาะฟักมีความหลากหลายสูง (Meejui, Sukmanomon, & Na-Nakorn, 2005) ผู้วิจัยสันนิษฐานว่าเกิดจากการนำพ่อแม่พันธุ์จากปลาต่างประชากรมาผสมเป็นประชากรตั้งต้น (ตารางที่ 2-2)

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเกิดจากการจำกัดการถ่ายเทยีนระหว่างประชากร และอัตราการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่ไม่เท่ากันในแต่ละประชากร โดยความแตกต่างในประชากรธรรมชาติมักเกิดจากปัจจัยทางภูมิศาสตร์ เช่น ระยะทางที่ห่างกัน หรือมีแผ่นดินกั้นระหว่างแหล่งน้ำ (Dewoody, 2000) หรือปัจจัยทางชีววิทยา เช่นการวางไข่ที่ไม่พร้อมกัน (Smoker, Gharrett, & Stekoll, 1988) ในขณะที่ความแตกต่างของประชากรโรงเพาะฟักมักเกิดจากระดับการแลกเปลี่ยนพ่อแม่พันธุ์ระหว่างประชากร (Meejui, Sukmanomon, & Na-Nakorn, 2005) การศึกษาที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่าประชากรธรรมชาติปลากะพงขาวของประเทศออสเตรเลีย มักมีความแตกต่างทางพันธุกรรมตามระยะทางอย่างน้อย 150 กิโลเมตร (Salini & Shakee, 1988) ส่วนในประเทศไทยการแบ่งแยกประชากรมักพบระหว่างประชากรสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน เช่น ในหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis asinina*) ซึ่งพบว่าประชากรอ่าวไทยแตกต่างจากประชากรอันดามันมาก (Tang, Tassanakajon, Klinbunga, Jarayabhand, & Menasveta, 2004) และในกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) ซึ่งประชากรกุ้งแชบ๊วยในประเทศไทยมีความแตกต่าง

ระหว่างประชากรของฝั่งทะเล อันดามันกับอ่าวไทย และระหว่างประชากรในอ่าวไทยด้วยกันเอง (อ่าวไทยตอนบนกับอ่าวไทยตอนล่าง) (ศรีรัตน์ สอดศุข และคณะ, 2541) (ตารางที่ 2-2)

ระดับความแตกต่างระหว่างประชากรโรงเพาะฟัก มักขึ้นอยู่กับระดับการแลกเปลี่ยนพ่อแม่พันธุ์ระหว่างโรงเพาะฟัก แหล่งประชากรเริ่มต้น การจัดการพ่อแม่พันธุ์ และแนวทางปฏิบัติของแต่ละโรงเพาะฟักเป็นต้น เช่นในการศึกษาของ Meejui, Sukmanomon, and Na-Nakorn (2005) ที่ศึกษาในปลากัด (*B. splendens*) ระหว่างโรงเพาะฟักระบบปิด (มีการเพาะพันธุ์ปลา แล้วเก็บรุ่นลูกตัวเมียไว้ประมาณ 200 ตัว โดยเก็บรุ่นเว้นรุ่นและใช้พ่อพันธุ์ของโรงเพาะตนเองแล้วผสมพันธุ์เป็นรุ่นต่อไป) และระบบเปิด (มีการเพาะพันธุ์ปลา แล้วเก็บตัวผู้ไว้ประมาณ 200 ตัว จากนั้นจึงนำปลาเพศเมียมาจากแหล่งอื่นเพื่อนำมาผสมพันธุ์เป็นรุ่นต่อไป) ซึ่งแนวทางปฏิบัติของแต่ละโรงเพาะฟักที่ต่างกัน จึงทำให้มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งมีค่าอยู่ในระดับปานกลาง ค่า F_{st} เท่ากับ 0.0754 ($P < 0.0002$) (ตารางที่ 2-2)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟักกับประชากรธรรมชาติของสัตว์น้ำบางชนิด

สปีชีส์	ชนิดเครื่องหมายพันธุกรรม	ตำแหน่ง	สถานที่ (จำนวนประชากร)	ภายในประชากร			ระหว่างประชากร	อ้างอิง
				H_o	H_e	A	F_{st}	
Phylum Mollusca								
1. หอยเชลล์ (*Patinopecten yessoensis*)	Microsatellite	6	ธรรมชาติ (3) โรงเพาะฟัก (2)	0.521-0.523 0.450-0.504	0.666-0.676 0.558-0.600	7.5-8.3 4.8-6.7	0.060 ($p < 0.01$)	Li, Xu, and Yu (2007)
2. หอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis discus*)	Microsatellite	6	ธรรมชาติ (2) โรงเพาะฟัก (3)	0.700-0.721 0.517-0.621	0.793 0.559-0.715	21.3-23 3.5-8.5	0.004 0.243-0.427 ($p < 0.01$)	Li, Park, Endo, and Kijima (2004)
3. หอยนางรม (*Crassostrea gigas*)	Microsatellite	7	ธรรมชาติ (2) โรงเพาะฟัก(5)	0.665-0.713 0.474-0.613	0.950-0.958 0.916-0.949	28.6-29.9 19.1-26.1	0.105-0.348 ($p < 0.05$)	Yu and Li (2007)
Phylum Crustacean								
1. กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*)	Allozyme	5	ธรรมชาติ (3)	0.61-0.75	0.62-0.72	1.5-1.7	0.029 ($p < 0.05$)	ศรีรัตน์ สอดศุข และคณะ (2541)
Phylum Chrodata (ปลาทะเล)								
1. ปลาแซลมอนแอตแลนติก (*Salmo salar*)	Microsatellite	15	ธรรมชาติ (4) โรงเพาะฟัก (3)	0.66-0.68 0.41-0.64	0.66-0.70 0.57-0.68	7.6-11.5 6.8-11.9	0.057 ($p < 0.001$)	Norris, Bradley, and Cunninghaw (1999)
2. Atlantic cod (*Gadus morhua L.*)	Microsatellite	8	ธรรมชาติ (2) โรงเพาะฟัก (3)	0795-0.834 0.749-0.791	0.821-0.830 0.802-0.821	18.1-20.1 15.0-15.8	0.074 ($p < 0.001$)	Pampoulie et al. (2006)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟักกับประชากรธรรมชาติของสัตว์น้ำบางชนิด (ต่อ)

สปีชีส์	ชนิดเครื่องหมายพันธุกรรม	ตำแหน่ง	สถานที่ (จำนวนประชากร)	ภายในประชากร			ระหว่างประชากร	อ้างอิง
				H_o	H_e	A	F_{st}	
Phylum Chrodata (ปลาทะเล)								
3. Brycon (*Brycon opalinus*)	Microsatellite	7	ธรรมชาติ (7) โรงเพาะฟัก (1)	0.495-0.634 0.559	0.821-0.892 0.787	5.43-15.15 13.28	0.011-0.107 ($p < 0.05$)	Baroso et al. (2005)
Phylum Chordata (ปลาน้ำจืด)								
1. ปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*)	Microsatellite	5	ธรรมชาติ (9) โรงเพาะฟัก (2)	0.596-0.756 0.602-0.620	0.612-0.839 0.619-0.622	4.0-5.5 3.1-3.3	0.062	จิตราภรณ์ ฟองอิสระ (2551)
2. ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*)	Microsatellite	5	ธรรมชาติ (2) โรงเพาะฟัก (4)	0.62-0.65 0.61-0.66	0.62-0.64 0.61-0.64	4.80-6.20 4.60-5.20	0.003 ($p < 0.05$)	Ha, Nguyen, Poompuang, and Na-Nakorn (2009)
3. ปลานวลจันทร์เทศ (*Cirrhinus mrigala*)	Allozyme Microsatellite	7 7	ธรรมชาติ (7)	0.105-0.135 0.387-0.413	0.108-0.122 0.385-0.402	-	0.020 ($p < 0.05$) 0.013 ($p < 0.05$)	Chauhan (2007)
4. ปลากัด (*Betta splendens*)	Allozyme	7	โรงเพาะฟัก (14) ธรรมชาติ (1)	0.081-0.125 0.065	0.091-0.142 -	1.32-1.42 1.5	0.0754 ($p < 0.0002$)	Meejui, Sukmanomon, and Na-Nakorn, (2005)
5. ปลาสวาย (*P.hypophthalmus*)	Microsatellite	5	ธรรมชาติ (3) โรงเพาะฟัก (5)	0.608-0.788 0.613-0.763	0.720-0.755 0.723-0.834	5.00-7.40 5.80-11.0	-	ทักขิณา เหมยคำ และคณะ (2550)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟักกับประชากรธรรมชาติของสัตว์น้ำบางชนิด (ต่อ)

สปีชีส์	ชนิดเครื่องหมายพันธุกรรม	ตำแหน่ง	สถานที่ (จำนวนประชากร)	ภายในประชากร			ระหว่างประชากร	อ้างอิง
				H_o	H_e	A	F_{st}	
Phylum Chordata (ปลาสองน้ำ)								
1. ปลาตูหนา (*Anguilla anguilla*)	Microsatellite mtDNA	4 5	ธรรมชาติ (5)	0.278-0.737 -	0.286-0.940 *h*=0.617-0.819	9.6-12.4 -	0.004 ($p < 0.05$) 0.014 ($p < 0.05$)	Daemen at al. (2001)
2. ปลาไหลญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*)	Microsatellite	7	ธรรมชาติ (4 เดือน: 1)	0.386-0.844	0.627-0.945	2.7-19.5	0.029 ($p = 0.173$)	Chang, Han, and Tzeng (2007)
3. ปลาไหลญี่ปุ่น (*A. japonica*)	Allozyme	15	ธรรมชาติ (7)	0.047-0.059	0.046-0.061	1.7-2.4	0.002 ($p < 0.05$)	Maes and Volckart (2002)
4. ปลาไหลญี่ปุ่น (*A. japonica*)	Microsatellite	7	ธรรมชาติ (3 ปี)	0.69-0.73	0.84-0.86	12.3-13.5	0.031 ($p < 0.01$)	Tseng, Tzeng and Lee (2003)
5. ปลาไหลญี่ปุ่น (*A. japonica*)	Microsatellite	6	ธรรมชาติ (2)	0.54-0.89	0.72-0.97	14.7	-	Tseng et al. (2001)
6. ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch)	Allozyme	11	ธรรมชาติ (3)	-	0.028-0.035	-	0.028	Shaklee and Salini (1985)
7. ปลากะพงขาว (*L. calcarifer* Bloch)	Allozyme	12	ธรรมชาติ (7)	-	0.038-0.107	-	0.087 ($p < 0.001$)	Salini and Shaklee (1988)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Burapha University

287000
ว.ท.
ส.๒๘๔

ตารางที่ 2-2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟักกับประชากรธรรมชาติของสัตว์น้ำบางชนิด (ต่อ)

สปีชีส์	ชนิดเครื่องหมายพันธุกรรม	จำนวนแหน่ง	สถานที่ (จำนวนประชากร)	ภายในประชากร		ระหว่างประชากร		อ้างอิง
				H_o	H_e	A	F_{st}	
Phylum Chordata (ปลาสองน้ำ)								
8. ปลากะพงขาว (*L. calcarifer* Bloch)	Microsatellite	9	ธรรมชาติ (1) โรงเพาะฟัก (2)	0.72 0.70-0.74	0.75 0.72-0.76	8.2 8.0-9.6	0.03 ($p < 0.05$)	Zhu et al. (2006)
9. ปลากะพงขาว (*L. calcarifer* Bloch)	Microsatellite	14	ธรรมชาติ (4) โรงเพาะฟัก (5)	0.71-0.74 0.52-0.66	0.75-0.78 0.47-0.74	9.14-10.71 3.57-8.21	0.124 ($p < 0.05$)	Yue et al. (2009)
10. ปลากะพงขาว (*L. calcarifer* Bloch)	mtDNA		ธรรมชาติ (9)	-	0.763-0.933 [h]	17-24 [1]	-	Chenoweth et al. (1998)

หมายเหตุ AMOVA = Analysis of Molecular variance, H_o = ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้จากค่าสังเกต, H_e = ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้จากค่าคาดหมาย, A = อัลลิลต่อตำแหน่ง, F_{st} = เป็นค่าที่วัดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรย่อย, D = ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม, h = ความหลากหลายของแฮพโพลไทป์, 1=จำนวนแฮพโพลไทป์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR)

เทคนิคพีซีอาร์ เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มจำนวนโมเลกุลของดีเอ็นเอในปริมาณมาก โดยสามารถเพิ่มโมเลกุลของดีเอ็นเอได้เป็นล้าน ๆ เท่าในหลอดทดลอง (พรรณี ฐิตาพิชิต, 2545) โดยหลักการของเทคนิคพีซีอาร์ คือ การเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์และการเพิ่มลดอุณหภูมิ ความจำเพาะของเทคนิคพีซีอาร์ได้จากไพรเมอร์ ที่จะไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่านั้น และอาศัยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Dayhoff & Eck, 2004) ที่มีคุณสมบัติทนต่อความร้อนที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ การประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์ มีความจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลผลิตของปฏิกิริยาที่ต้องการมีจำนวนมากพอที่จะนำไปใช้งานให้บรรลุวัตถุประสงค์ รวมทั้งการไม่มีผลผลิตของปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะด้วย (บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค, 2546) ในการสังเคราะห์ 10 รอบ ดีเอ็นเอจะถูกขยายเป็น 2^{10} = 1024 เท่า, 20 รอบ ประมาณล้านเท่า และ 30 รอบ ประมาณพันล้านเท่า แต่ในทางทฤษฎีดีเอ็นเอที่มีปริมาณเป็นนาโนกรัมสามารถขยายให้เป็นกรัมได้โดยการใช้พีซีอาร์ 30 รอบ (พรรณี ฐิตาพิชิต, 2545)

การทำปฏิกิริยาในแต่ระรอบของพีซีอาร์ ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ตามลำดับ 3 ขั้นตอน ได้แก่

- Denaturation step (Denaturating) เป็นขั้นตอนที่ทำให้ DNA สายคู่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว เกิดที่อุณหภูมิสูง ประมาณ 94 องศาเซลเซียส

- Annealing step (Primer annealing) คือไพรเมอร์ 2 สาย เข้าไปจับ (anneal) ที่ตำแหน่งจำเพาะของดีเอ็นเอสายเดี่ยวทั้ง 2 สาย อุณหภูมิช่วงนี้จะลดลงอยู่ในช่วงประมาณ 40 องศาเซลเซียส 60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ขั้นตอนนี้จะขึ้นอยู่กับความจำเพาะของไพรเมอร์แต่ละสาย

- Elongation step (Primer extension or Polymerization) ขั้นตอนนี้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะทำงานโดยเร่งการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3'ของไพรเมอร์ สายดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใหม่จะยาวไปเรื่อย ๆ จากบริเวณที่ปลายทั้งสองของไพรเมอร์ ที่จับอยู่บนสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ทั้งสองสายทำให้บริเวณที่ต้องการ จะถูกจำลองได้โดยสมบูรณ์ อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้คือ 72 องศาเซลเซียส

ปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนจะดำเนินไปเรื่อย ๆ ตามที่เราตั้งโปรแกรมจำนวนรอบไว้ จนกระทั่งสิ้นสุดจะได้ amplification of the target หรือเรียกว่า amplicon หรือผลผลิตพีซีอาร์ (ปรีชา ประเทพา, 2543; Brown & Epifanio, 2003; Dayhoff & Eck, 2004; Palumbi, 1996)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในปฏิกิริยาของเทคนิคพีซีอาร์จะประกอบด้วยองค์ประกอบดังนี้ (วรรณา ทองนพคุณ, ชนินทร์ ลิ่มวงศ์ และเพทาย เย็นจิตโสมนัส, 2548)

1. DNA แม่แบบหรือ DNA แม่พิมพ์ (DNA template) เป็น DNA ที่สกัดได้มาจากเซลล์ที่มีนิวเคลียสของมนุษย์ สัตว์ พืช สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

2. DNA สายเริ่มต้นขนาดสั้น ๆ เรียกว่า ไพรเมอร์ (Primer) มีความยาวประมาณ 18-25 เบส จำนวน 2 สาย สายหนึ่ง เรียกว่า ไพรเมอร์เอฟ (Forward primer) อีกสายหนึ่ง เรียกว่า ไพรเมอร์อาร์ (Reverse primer) แต่ละสายจะมีลำดับเบสที่เข้าคู่ (Complementary) กับลำดับเบสด้านปลาย 3' ของสาย DNA แม่แบบได้ โดยจับที่ตำแหน่งที่อยู่ขนาบข้าง (Flanking region) กับส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน ไพรเมอร์ได้มาจากการสังเคราะห์ด้วยเครื่องสังเคราะห์ DNA

3. นิวคลีโอไทด์หรือเบส มี 4 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (adenine, A), กัวนีน (guanine, G), ไซโตซีน (cytosine, C) และไธมีน (thymine, T) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของโครงสร้าง DNA

4. เอนไซม์ DNA โพลีเมอเรส (DNA polymerase) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ เอนไซม์นี้มีหลายชนิด ที่นิยมกันทั่วไปเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* จึงเรียกเอนไซม์นี้ว่า *Taq* DNA Polymerase แบคทีเรียชนิดนี้อาศัยในน้ำพุร้อน มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 95 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ ประมาณ 72 องศาเซลเซียส

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็นสารเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA polymerase

6. บัฟเฟอร์ (buffer) เป็นสารที่ทำให้สภาพของสารในหลอดทดลองมีสภาวะความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

7. น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งใช้ผสมกับสารตั้งต้นดังกล่าวทั้งหมด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University