

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมไทป์ที่ไม่โครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง ของปลากะพงขาว 7 กลุ่ม ตัวอย่าง คือ จังหวัดจันทบุรี (CH-W), (อ.ปากนคร) จังหวัดนครศรีธรรมราช (PN-W), จังหวัดตราด (TR-W), ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จังหวัดนครศรีธรรมราช (NK-H), ฟาร์มทะเลทอง อ. เมือง จังหวัดชลบุรี (TT-H), ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จังหวัดระยอง (รุ่นพ่อแม่) (RA-H), และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จ.ระยอง (รุ่นลูก) (RF-H) ได้ผลดังนี้

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

ไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง มีสภาวะหลากหลายรูปแบบในทุกประชากรโดยมีจำนวน อัลลีลตั้งแต่ 3 (*Lca* 08) ถึง 17 (*Lc-m* 05) อัลลีล และพบอัลลีลที่มีความเฉพาะต่อประชากร (private alleles) ทั้งหมด 5 อัลลีล ที่ 2 ตำแหน่ง ใน 2 ประชากร ได้แก่ ประชากร PN-W (*LcaM*32, *Lc-m* 05) และ TR-W (*LcaM*32) อัลลีลเฉพาะมีความถี่ตั้งแต่ 0.008-0.016 (ตารางภาคผนวกที่ ข-1)

ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ที่แสดงโดยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง ค่า Allelic richness (A_r) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) และ ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหมาย (H_e) ของประชากรธรรมชาติไม่ต่างกับค่าที่พบในประชากรโรงเพาะฟัก ($p > 0.05$) โดยในประชากรธรรมชาติมีค่าจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งอยู่ระหว่าง 7.57 (CH-W) ถึง 8.43 (PN-W) ค่าเฉลี่ย A_r อยู่ระหว่าง 6.97 (CH-W) ถึง 7.64 (PN-W) ค่าเฉลี่ย H_o อยู่ระหว่าง 0.72 (CH-W) ถึง 0.79 (TR-W) ในขณะที่ค่า H_e อยู่ระหว่าง 0.71 (TR-W, PN-W ถึง 0.75 (CH-W) (ตารางที่ 4-1) ส่วนในประชากรโรงเพาะฟัก มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง อยู่ระหว่าง 5.86 (RF-H) ถึง 7.43 (TT-H) ค่าเฉลี่ย A_r อยู่ระหว่าง 5.70 (RF-H) ถึง 7.27 (RA-H) ค่าเฉลี่ย H_o อยู่ระหว่าง 0.68 (NK-H) ถึง 0.78 (RA-H) ในขณะที่ค่าเฉลี่ย H_e อยู่ระหว่าง 0.65 (RF-H) ถึง 0.75 (RA-H) (ตารางที่ 4-1)

เมื่อทดสอบความเบี่ยงเบนของสัดส่วนจีโนมไทป์ที่สังเกตได้กับค่าที่คาดหวังตามสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ที่ทุกตำแหน่งในกลุ่มตัวอย่างปลากะพงขาว พบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เกือบทุกตำแหน่ง ในกลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่อยู่ในสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ยกเว้นที่ตำแหน่ง *Lca*64 ในตัวอย่าง RF-H (ตารางที่ 4-1) โดยค่า H_o มีค่าต่ำกว่าค่า H_e ($p < 0.001$ ซึ่งเป็นค่าความน่าจะเป็นที่มิ การปรับ สำหรับการใช้ข้อมูลวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง ด้วยวิธี Bonferroni correction (0.05/49) (Rice, 1989) และทดสอบ Null allele พบว่าไม่มี Null allele ที่ทุกตำแหน่ง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

กลุ่มตัวอย่างปลากะพงขาวมีความแตกต่างทางพันธุกรรม (ค่า $Global F_{ST} = 0.024$; AMOVA, $p=0.0001$) การทดสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม AMOVA พบว่า 2.46 %ของความแปรปรวนเกิดจากความแตกต่างระหว่างประชากร และ 97.54% ของความแปรปรวนที่เกิดจากความแตกต่างระหว่างสมาชิกในประชากร (ตารางที่ 4-2)

เมื่อพิจารณาความแตกต่างระหว่างคู่ตัวอย่างจากธรรมชาติ (3 แหล่ง) พบว่ากลุ่มตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนบน TR-W กับ CH-W ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม เมื่อทดสอบด้วย exact tests ($p=0.007$) และ F_{ST} ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง (ค่า $F_{ST} = 0.006$, $p=0.120$) (ตารางที่ 4-3) ในขณะที่ PN-W ต่างกับทั้งสองกลุ่มตัวอย่าง ส่วนในกลุ่มตัวอย่างจากโรงเพาะฟัก (4 แหล่ง) พบว่า ทุกแหล่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรม เมื่อทดสอบด้วย exact tests ($p<0.002$) แต่มีบางแหล่งที่ไม่ต่างทางพันธุกรรมเมื่อพิจารณาจากค่า F_{ST} ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง (NK-H กับ TT-H, $F_{ST} = 0.006$, $p=0.048$)

เมื่อพิจารณาตัวอย่างทั้งหมด (จากธรรมชาติ และ โรงเพาะฟัก) พบว่าตัวอย่างจากโรงเพาะฟักบางแหล่งไม่มีความแตกต่างจากตัวอย่างจากธรรมชาติ ซึ่งได้แก่ NK-H ที่มีความคล้ายทางพันธุกรรมกับกลุ่มตัวอย่างจากธรรมชาติภาคตะวันออกทั้งสองกลุ่ม (TR-W และ CH-W; $F_{ST} = 0.002$, $p=0.225$ และ $F_{ST} = 0.002$, $p=0.210$) ค่า F_{ST} ยังแสดงความคล้ายทางพันธุกรรมระหว่างโรงเพาะฟักในภาคตะวันออก (TT-H และ RA-H) กับตัวอย่างจากธรรมชาติอ่าวไทยตอนบน CH-W ($F_{ST} = 0.003$, $p=0.120$ และ $F_{ST} = 0.012$, $p=0.003$) แผนภาพ MDS ที่สร้างจากค่า F_{ST} ระหว่างคู่ตัวอย่าง (ภาพที่ 4-3) ยังแสดงให้เห็นว่า RE-H และ RA-H แตกต่างจากกลุ่มตัวอย่างอื่น ๆ มากที่สุด

แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างปลากะพงขาว และแผนภาพ MDS โดยใช้ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม Cavalli-Sforza and Edward's distance (ภาพที่ 4-1, 4-2) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มตัวอย่างในทิศทางใกล้เคียงกับ exact tests และ F_{ST} นั่นคือในกลุ่มตัวอย่างจากธรรมชาติ กลุ่มตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนบน (TR-W และ CH-W) มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกัน มากกว่า กลุ่มตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนล่าง (PN-W) ส่วนในกลุ่มตัวอย่างจากโรงเพาะฟัก RA-H และ RF-H แตกต่างจากตัวอย่างอื่น ๆ มากที่สุด เมื่อพิจารณาตัวอย่างทั้งหมด พบว่า กลุ่มตัวอย่างจากโรงเพาะฟัก ยังมีลักษณะคล้ายกับกลุ่มตัวอย่างจากธรรมชาติ ดังนี้ คือ TT-H คล้ายกับ CH-W (bootstrap value = 53.6%) และ NK-H คล้ายกับ TR-W (bootstrap value = 58%) นอกจากนี้จากแผนภาพยังแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่าง RA-H และ RA-F (bootstrap value = 59.5%)

ตารางที่ 4-1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์ 7 ตำแหน่ง ในกลุ่มตัวอย่างปลากระพงขาวจากโรงเพาะฟักและธรรมชาติในบริเวณอ่าวไทย ดัชนีแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม ได้แก่ ขนาดของอัลลีล (R), จำนวนตัวอย่าง (N), จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (A), Effective number of allele (A_e), Allelic Richness (A_r), ค่า Observed heterozygosity (H_o) ค่า Expected heterozygosity (H_e), ค่า Fixation Index (F_{is}) และค่าความน่าจะเป็น (P -value) ที่สัดส่วนจีโนไทป์ที่สังเกตได้จะเบี่ยงเบนจากสัดส่วนที่คาดหวังภายในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

Locus		TT-H	RA-H	RF-H	NK-H	CH-W	TR-W	PN-W
Lca 74	R	160-172	160-172	160-172	160-172	160-172	160-174	160-172
	N	56	30	36	39	65	53	66
	A	5	5	4	5	5	6	5
	A_e	3.53	3.31	3.41	3.57	3.44	2.84	2.69
	A_r	5.00	5.00	4.00	4.99	5.00	5.13	4.97
	H_o	0.52	0.57	0.81	0.51	0.60	0.77	0.55
	H_e	0.72	0.70	0.71	0.72	0.71	0.65	0.63
	F_{is}	0.28	0.19	-0.14	0.29	0.15	-0.19	0.13
	P	0.002	0.1824	0.0036	0.0422	0.445	0.0254	0.0135
Lca 60	R	191-238	191-238	191-234	191-238	191-238	191-238	191-238
	N	56	31	36	39	65	53	66
	A	8	7	5	6	7	6	8
	A_e	4.21	3.66	2.29	3.27	3.46	3.11	2.54
	A_r	7.78	6.97	4.81	5.53	5.84	5.30	6.37
	H_o	0.71	0.84	0.67	0.62	0.65	0.74	0.61
	H_e	0.76	0.73	0.56	0.69	0.71	0.68	0.61
	F_{is}	0.06	-0.15	-0.18	0.11	0.09	-0.08	0.00
	P	0.2711	0.5823	0.0397	0.7558	0.79	0.9277	0.4309
LcaM21F	R	163-197	163-197	163-197	163-197	163-197	163-197	163-197
	N	56	31	36	39	65	53	66
	A	7	7	7	7	7	7	7
	A_e	5.20	6.01	5.62	5.43	4.88	5.15	5.31

Locus		TT-H	RA-H	RF-H	NK-H	CH-W	TR-W	PN-W
	A_r	6.78	7.00	7.00	6.77	6.67	6.53	6.83
	H_n	0.91	0.94	1.00	0.90	0.82	0.98	0.95
	H_c	0.81	0.83	0.82	0.82	0.80	0.81	0.81
	F_{is}	-0.13	-0.12	-0.22	-0.10	-0.03	-0.22	-0.18
	P	0.0466	0.9083	0.0039	0.3097	0.0372	0.4551	0.0193
Lca64	R	280-302	280-302	283-302	280-302	280-302	280-302	280-302
	N	56	31	36	39	65	53	65
	A	5	5	4	6	6	6	6
	A_c	3.03	3.54	2.57	4.08	3.55	3.29	2.69
	A_r	4.77	5.00	3.97	5.76	5.31	5.38	5.17
	H_n	0.70	0.68	0.58	0.62	0.72	0.85	0.72
	H_c	0.67	0.72	0.61	0.75	0.72	0.70	0.63
	F_{is}	-0.04	0.06	0.04	0.18	-0.01	-0.22	-0.15
	P	0.0025	0.6827	0.0006*	0.0105	0.1209	0.0215	0.0012
LcaM08F	R	257-263	257-263	257-263	257-263	257-263	257-263	257-263
	N	56	31	36	39	65	53	66
	A	3	3	3	3	3	3	3
	A_c	1.95	2.02	1.41	1.64	2.08	1.63	2.18
	A_r	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
	H_n	0.55	0.61	0.28	0.38	0.54	0.42	0.58
	H_c	0.49	0.50	0.29	0.39	0.52	0.39	0.54
	F_{is}	-0.13	-0.22	0.05	0.02	-0.04	-0.07	-0.06
	P	0.5131	0.2062	0.2258	0.452	0.2349	0.6538	0.0566
LcaM32	R	140-197	140-197	145-193	145-193	140-193	140-215	140-197
	N	56	31	36	39	65	47	64
	A	11	11	9	10	12	12	14
	A_c	7.40	7.14	5.88	8.11	7.80	7.75	7.47
	A_r	9.60	10.97	8.64	9.99	10.65	11.14	12.47
	H_n	0.91	0.94	0.97	0.82	0.95	0.81	0.91

Locus		TT-H	RA-H	RF-H	NK-H	CH-W	TR-W	PN-W
	H_c	0.86	0.86	0.83	0.88	0.87	0.87	0.87
	F_{is}	-0.05	-0.09	-0.17	0.06	-0.09	0.07	-0.05
	P	0.5551	0.945	0.007	0.0185	0.9088	0.0022	0.1182
Lc-m05	R	196-236	196-236	196-221	196-236	196-236	196-236	196-236
	N	56	31	36	39	65	53	66
	A	13	13	9	14	13	14	16
	A_c	10.58	9.61	3.54	8.90	9.21	7.67	10.81
	A_r	12.45	12.93	8.50	13.41	12.29	12.66	14.65
	H_n	0.93	0.90	0.69	0.95	0.78	0.96	0.88
	H_c	0.91	0.90	0.72	0.89	0.89	0.87	0.91
	F_{is}	-0.03	-0.01	0.03	-0.07	0.12	-0.11	0.03
	P	0.4042	0.7277	0.0715	0.4119	0.024	0.0037	0.0032
All loci		TT-H	RA-H	RF-H	NK-H	CH-W	TR-W	PN-W
	N	56.0	30.9	36.0	39.0	65.0	52.1	65.6
	A	7.43	7.29	5.86	7.29	7.57	7.71	8.43
	A_c	5.13	5.04	3.53	5.00	4.92	4.49	4.81
	A_r	7.05	7.27	5.70	7.11	6.97	7.02	7.64
	H_n	0.75	0.78	0.71	0.68	0.72	0.79	0.74
	H_c	0.74	0.75	0.65	0.73	0.75	0.71	0.71
	F_{is}	-0.01	-0.05	-0.08	0.07	0.03	-0.42	-0.04
	P	0.256	0.605	0.05	0.286	0.366	0.298	0.092

หมายเหตุ เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P < 0.001$ ซึ่งเป็นค่าความน่าจะเป็นที่มีการปรับ สำหรับการใช้อยู่ข้อมูลวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple tests) ด้วย Bonferroni correction; (0.05/49) (Rice, 1989)

ตารางที่ 4-2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Analysis of molecular Variance; AMOVA) ภายในและระหว่างประชากรปลากะพงขาวจากแหล่งน้ำธรรมชาติและโรงเพาะฟักบริเวณอ่าวไทย

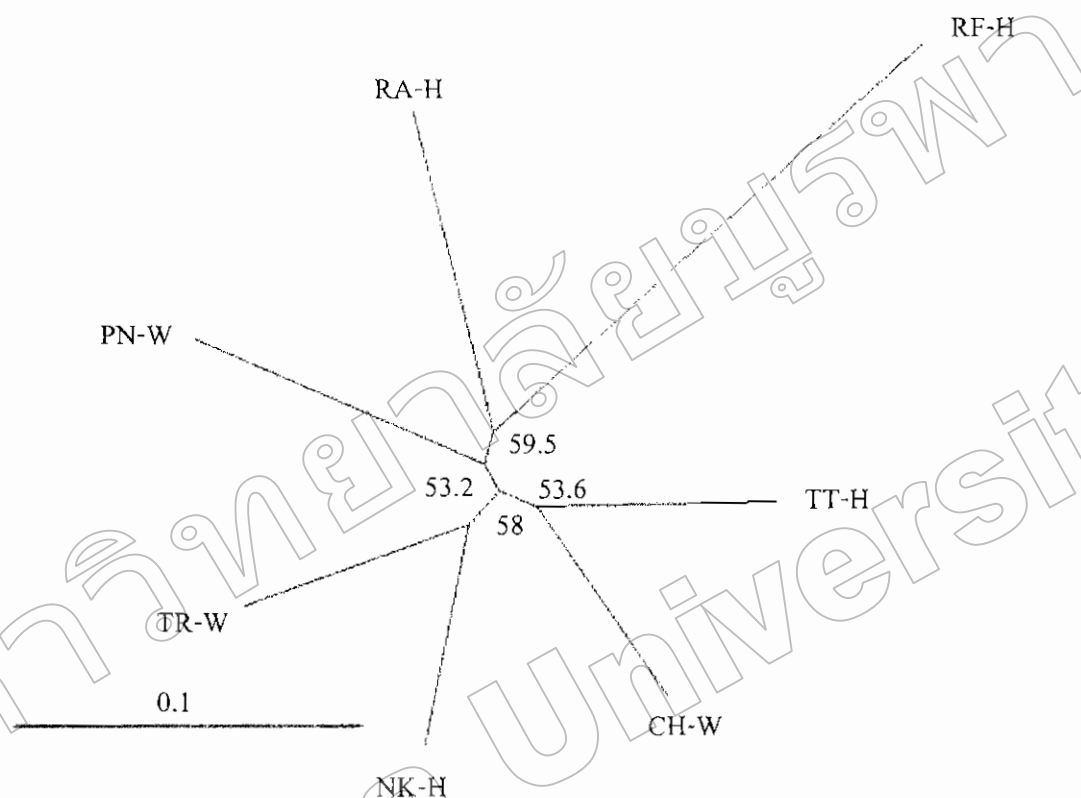
แหล่งความแปรปรวน	d.f.	SS	Variance components	เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวน
ระหว่างประชากร	6	52.627	0.06387	2.46 %
ภายในประชากร	685	1733.834	2.53114	97.54 %
รวม	691	1786.461	2.59501	
Fixation index	Φ_{st}	0.02461	$P = 0.00000$	

ตารางที่ 4-3 ค่าความน่าจะเป็น (P-value) ของการทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากร โดย Exact tests (ด้านบน) และค่า pairwise F_{ST} (ด้านล่าง) ของกลุ่มตัวอย่างปลากะพงขาว 7 แหล่ง

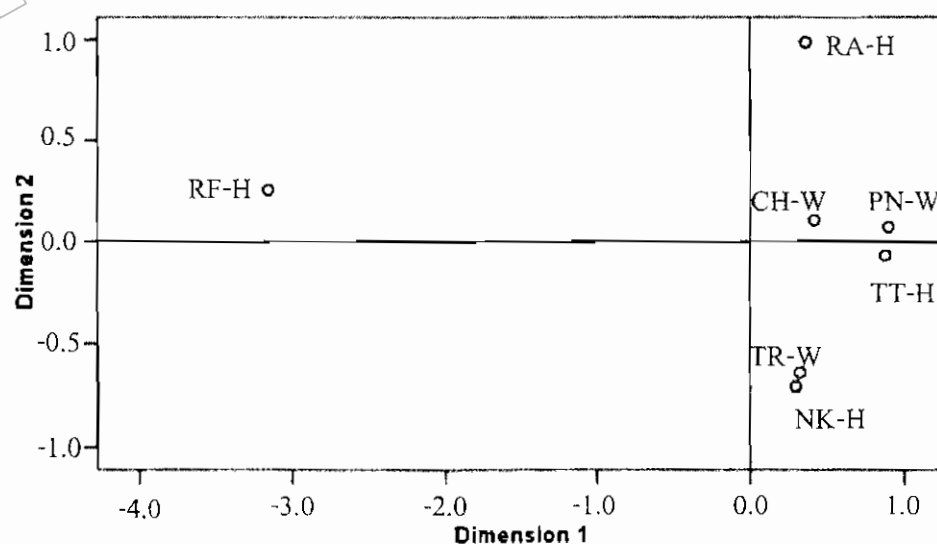
	TT	RA	RF	NK	CH	TR	PN
TT	-	0.000000*	Highly sign.	0.000019*	0.000537*	Highly sign.	Highly sign.
RA	0.016*	-	Highly sign.	Highly sign.	0.000190*	Highly sign.	Highly sign.
RF	0.052*	0.056*	-	0.000000*	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.
NK	0.006 ns	0.018*	0.049*	-	0.002 *	0.539 ns	0.000005*
CH	0.003 ns	0.012 ns	0.050*	0.002 ns	-	0.008 ns	0.000000*
TR	0.016*	0.036*	0.057*	0.002 ns	0.006 ns	-	0.000005*
PN	0.029*	0.038*	0.083*	0.020*	0.022*	0.013*	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย * และ Highly sign. แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p \leq 0.002$ ซึ่งเป็นค่าความน่าจะเป็นที่มีการปรับสำหรับการใช้ข้อมูลวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple tests) ด้วย Bonferroni correction (0.05/21) (Rice, 1989)

ภาพที่ 4-1 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สร้างจากค่า Cavalli-Sforza and Edward's distance โดยวิธี UPGMA ของกลุ่มตัวอย่างปลากะพงขาว 7 กลุ่ม (ตัวเลขที่แสดงบนจุดแยกคือค่าร้อยละของการทำซ้ำจากการสุ่ม (bootstrap) 1,000 ครั้ง)



ภาพที่ 4-2 แผนภาพ MDS ที่สร้างจากค่า Cavalli-Sforza and Edward's distance (Stress value < 0.001)



ภาพที่ 4-3 แผนภาพ MDS ที่สร้างจากค่า F_{ST} ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง (Stress value = 0.04263)

