



รายงานการวิจัย

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

และประวัติประชากรของปลาหน้าดิน : ปลาทรายแดง

(*Nemipterus hexodon*) ในประเทศไทยหลังการประกาศใช้

พระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2558

Assessment of Genetic diversity, Population Genetic structure
and Demographic History of Demersal fish: Threadfin Bream

(*Nemipterus hexodon*) in Thailand after Fisheries Act 2558 B.E.

Enact

วีระเกียรติ ทรัพย์มี	Verakiat Supmee
จุฑามาศ ศุภพันธ์	Juthamas Suppapan
อภิรักษ์ สงรักษ์	Apirak Songrak
สมรักษ์ รอดเจริญ	Somrak Rodjareon
วิจิตร วิโสรัมย์	Wijitara Wisorum

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณเงินแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2561

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและประวัติ
ประชากรของปลาทรายแดง (*Nemipterus hexodon*) ในประเทศไทยหลังการ
ประกาศใช้พระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2558

วีระเกียรติ ทรัพย์มี¹ จุฑามาศ ศุภพันธ์² อภิรักษ์ สงรักษ์³ สมรักษ์ รอดเจริญ⁴ และ
วิจิตร วิโสรัมย์⁵

บทคัดย่อ

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างพันธุ ศาสตร์ ประชากร และประวัติ
ประชากร ของปลาทรายแดง (*Nemipterus hexodon*) ในประเทศไทย หลังการประกาศใช้
พระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2558 เก็บตัวอย่าง จากจังหวัดสงขลา จังหวัด นครศรีธรรมราช
จังหวัดสุราษฎร์ธานีจังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดชลบุรี จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และ
จังหวัดพังงา ในปี พ.ศ. 2558 จำนวนทั้งหมด 142 ตัว และในปี พ.ศ. 2560 จำนวนทั้งหมด 177 ตัว
จากนั้นนำมาวิเคราะห์จากความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากยีน
cytochrome oxidase subunit I ขนาด 419 คู่เบส ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทาง
พันธุกรรม พบว่าในปี พ.ศ. 2558 มีจำนวนแฮพลไทป์ทั้งหมด 18 แฮพลไทป์ ประกอบด้วย rare
haplotype 5 แฮพลไทป์ ส่วนในปี พ.ศ. 2560 มีจำนวนแฮพลไทป์ทั้งหมด 42 แฮพลไทป์
ประกอบด้วย rare haplotype 29 แฮพลไทป์ การที่มีจำนวน rare haplotype เพิ่มขึ้น แสดงว่า
ประชากร ปลาทรายแดง มีจำนวน เพศเมียที่มีความสามารถในการขยายพันธุ์ เพิ่มขึ้น ส่วน ค่า
haplotype diversity และ nucleotide diversity มีค่า 0.802 ± 0.022 และ 0.003 ± 0.000 ในปี
พ.ศ. 2558 ส่วนในปี พ.ศ. 2560 มีค่า 0.848 ± 0.022 และ 0.004 ± 0.000 แสดงว่ามีความหลากหลาย
ทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้น การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี AMOVA และ Pairwise
 F_{ST} พบว่าทั้งในปี พ.ศ. 2558 และปี พ.ศ. 2560 ประชากรปลาทรายแดงในประเทศไทยมีโครงสร้าง
ทางพันธุกรรมเกิดขึ้นโดยแบ่งเป็นประชากรฝั่งทะเลอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน ซึ่งเป็นผลมาจาก
การขัดขวางการถ่ายเทยีนจากปัจจัยทางภูมิศาสตร์ของคาบสมุทรลามากกว่าการขาดช่วงทาง
พันธุกรรมจากปรากฏการณ์คอขวดเนื่องจากการประมงเกินขนาดมาเป็นเวลานาน จากการทดสอบ
mismatch distribution, ค่าพารามิเตอร์สำหรับการวิเคราะห์ประวัติประชากร และการทดสอบ
neutrality test พบว่าทั้งในปีพ.ศ. 2558 และปี พ.ศ. 2560 ให้ผลเหมือนกันคือ ประชากรปลาทราย
แดงน่าจะมีการขยายขนาดมาประมาณ 190,000 – 390,000 ปีที่ผ่านมาในยุคไพลสโตซีน ผล
การศึกษาครั้งนี้สรุปว่าการบังคับใช้กฎหมายตามพระราชบัญญัติประมง พ.ศ. 2558 เป็นระยะเวลา

ประมาณหนึ่งปีส่งผลให้ประชากรปลาทรายแดงในประเทศไทย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้น และสามารถนำข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้มาใช้ในการจัดการปลาทรายแดงในประเทศไทยได้

คำสำคัญ: ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ปลาทรายแดง โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร



¹ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร. ศรีวิชัย อ. พุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช

²ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช อ. เมือง จ. นครศรีธรรมราช

³ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มทร. ศรีวิชัย อ. สีเกา จ. ตรัง

⁴ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช อ. เมือง จ. นครศรีธรรมราช

⁵อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร. ตะวันออก อ. บางพระ จ. ชลบุรี

Assessment of Genetic diversity, Population Genetic structure and Demographic History of Demersal fish : Threadfin Bream (*Nemipterus hexodon*) in Thailand after Fisheries Act 2558 B.E. Enact

Verakiat Supmee¹, Juthamas Suppapan², Apirak Songrak³, Somrak Rodjareon⁴
and Wijitara Wisorum⁵

Abstracts

Assessment of genetic diversity, population genetic structure and demographic history of demersal fish : Threadfin Bream (*Nemipterus hexodon*) in Thailand after fisheries act 2558 B.E. enact was analysed based on the variation of the nucleotide sequence of mitochondrial DNA in cytochrome oxidase subunit I (419 bp). The mtDNA sequences of 142 and 177 individual collecting from 9 sampling sites in 2558 B.E. and 2560 B.E. : Songkhla, Nakorn Si Thammarat, Surat Thanee, Samut Songkram, Chonburi, Satun, Trang, Krabi, Phang Nga province were analyzed. A total of 18 haplotypes consisting of 5 rare haplotypes in 2558 B.E and total of 42 haplotypes consisting of 29 rare haplotypes in 2560 B.E were identified. The increasing of rare haplotypes indicated that the female effective population size of *N. hexodon* living in the Thailand coast is large. Estimated values of haplotype diversity and nucleotide diversity were 0.802 ± 0.022 and 0.003 ± 0.000 in 2558 B.E. and were 0.848 ± 0.022 and 0.004 ± 0.000 in 2560 B.E.. The result showed that genetic diversity was increased. Analysis of molecular variance (AMOVA) and pairwise F_{ST} revealed the genetic structure between the Gulf of Thailand and the Andaman sea both 2558 B.E. and 2560 B.E.. Genetic separation the result from the gene flow disruption between populations of the Gulf of Thailand and the Andaman sea, caused by a geographic barrier like the Malaysian peninsula more than genetic bottle neck by over fishing. Both 2558 B.E. and 2560 B.E. found that mismatch distribution, estimates of population parameters and neutrality tests suggested that *N. hexodon* might have undergone a population expansion, possibly within the last 190,000 to 390,000 years during the Pleistocene period, which coincides with the drastic climate changes that

occurred during the same period. In conclusion, genetic diversity of *N. hexodon* living in the Thailand coast was increased after Fisheries Act 2558 B.E. enact for one year. This study are necessary information contributing to efficient strategies to conserve this species in Thailand.

Keywords: Mitochondrial DNA, Threadfin Bream, Population genetic structure



¹Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thung Song, Nakhon Si Thammarat

² Faculty of Education, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Mueang, Nakhon Si Thammarat

³Faculty of Science and Fishery Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang

⁴ Faculty of Science and Technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Mueang, Nakhon Si Thammarat

⁵Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Eastern, Bangphra, Chonburi

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยในครั้งนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2560 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย คณะผู้วิจัยขอขอบคุณชาวประมงทุกท่านที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างในทุกพื้นที่ สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ ปลาทรายแดง ทุกตัวที่เป็นตัวอย่างในการทำการศึกษาในครั้งนี้

วีระเกียรติ ทรัพย์มี
จุฑามาศ ศุภพันธ์
อภิรักษ์ สงรักษ์
สมรักษ์ รอดเจริญ
วิจิตร วิโสรัมย์
กันยายน 2561

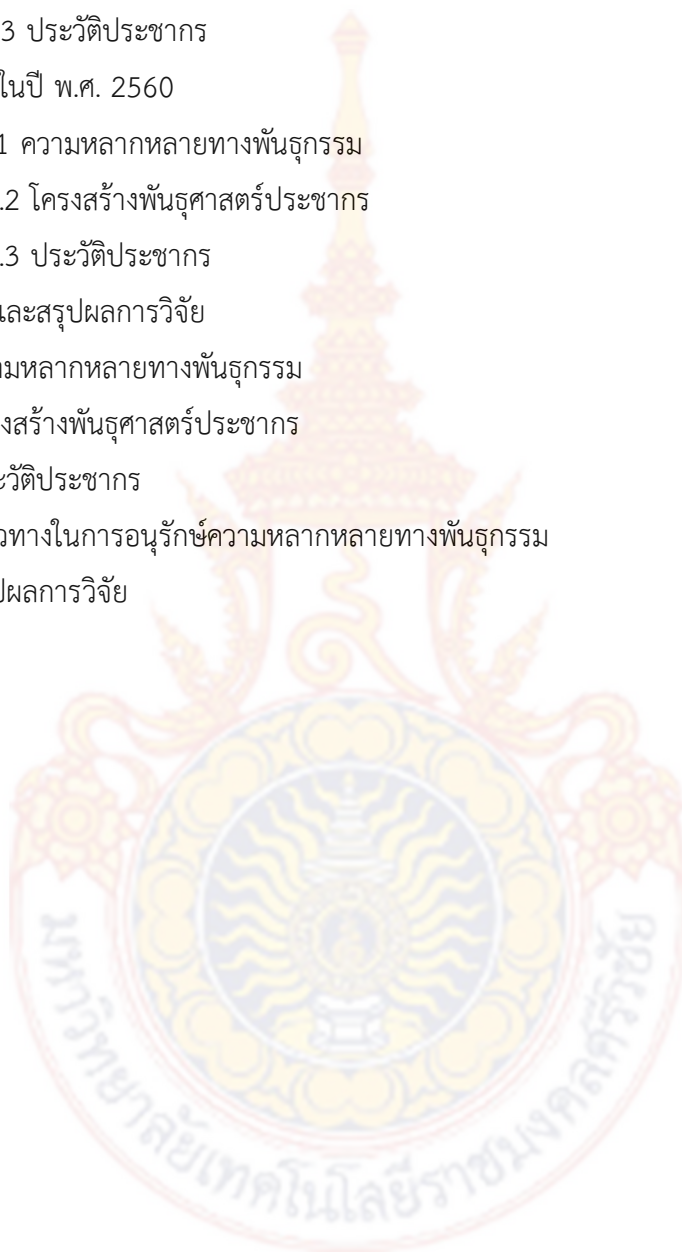


สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(ก)
Abstracts	(ข)
กิตติกรรมประกาศ	(ง)
สารบัญ	(จ)
สารบัญตาราง	(ช)
สารบัญภาพ	(ซ)
สารบัญภาคผนวก	(ณ)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
2.1 ชีววิทยาของปลาทรายแดง	4
2.2 ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในสัตว์	6
2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม	8
2.4 การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	9
2.5 การศึกษาประวัติประชากร	10
2.6 การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในปลาทะเล	11
2.7 พันธุศาสตร์กับการจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำ	13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	15
3. 1. วัสดุและอุปกรณ์	15
3. 2. การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย	16
3. 3. การจัดการข้อมูลและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม	16
3. 4. การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	17
3. 5. การวิเคราะห์ประวัติประชากร	18
บทที่ 4 ผลการวิจัย	19
4.1 ผลการศึกษาในปี พ.ศ. 2558	19
4.1.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม	19
4.1.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	21

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.1.3 ประวัติประชากร	24
4.2 ผลการศึกษาในปี พ.ศ. 2560	26
4.2.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม	26
4.2.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	29
4.2.3 ประวัติประชากร	32
บทที่ 5 วิจัยและสรุปผลการวิจัย	34
5.1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม	34
5.2. โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร	35
5.3. ประวัติประชากร	36
5.4. แนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม	37
5.5 สรุปผลการวิจัย	38
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	46



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การกระจายของแฮโพลไทป์ในแต่ละจังหวัดที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2558	20
2	ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2558	21
3	การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยวิธี AMOVA ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2558	23
4	ค่า pairwise F_{ST} ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2558	24
5	ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากร ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2558	25
6	การกระจายของแฮโพลไทป์ในแต่ละจังหวัดที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2560	27
7	ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2560	28
8	การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยวิธี AMOVA ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2560	31
9	ค่า pairwise F_{ST} ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2560	32
10	ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากร ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2560	33

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปลาทรายแดง	5
2	โครงสร้างของไนโมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ	7
3	บริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่าง ปลาทรายแดงในปี พ.ศ. 2558 และ พ.ศ. 2560	15



สารบัญภาคผนวก

ภาคผนวกที่		หน้า
1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแฮปโลไทป์จำนวน 18 แฮปโลไทป์ที่ได้จากการศึกษาในปี พ.ศ. 2558	47
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแฮปโลไทป์จำนวน 42 แฮปโลไทป์ที่ได้จากการศึกษาในปี พ.ศ. 2560	50
3	ภาพกิจกรรมในการทำงานวิจัย	57



บทที่ 1

บทนำ

ปลาทรายแดง (*Nemipterus hexodon*) เป็นปลาหน้าดินที่อาศัยตามแนวชายฝั่ง เป็นปลาเศรษฐกิจที่นำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตซูริมีเนื่องจาก เนื้อปลามี สีขาว มีไขมันต่ำ และไม่มีกลิ่นคาว ปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ผลิตซูริมีอันดับต้นๆของโลกโดยผลิตภัณฑ์ที่ได้เกือบทั้งหมดจะส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น สิงคโปร์ ฮองกง สหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย (จักรี, 2544) หลายปีที่ผ่านมาพบว่ามี การทำประมงพาณิชย์ผิดกฎหมายเพิ่มมากขึ้นเป็นสาเหตุทำให้สัตว์น้ำลดลง เนื่องจากการใช้เครื่อง มือทำประมงอย่างไม่คำนึงถึงสภาพแวดล้อมเช่น เรืออวนลาก อวนรุน ซึ่งเป็นเครื่องมือทำลายล้างสัตว์ หน้าดินที่รุนแรงที่สุดโดยปลาที่จับได้จะเป็นปลาขนาดเล็กและเป็นลูกปลาเศรษฐกิจที่ยังไม่โตเต็มวัย ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะถูกจับขึ้นมาเพื่อส่งให้โรงงานปลาป่น อาหารสัตว์ โดยเรือประเภทรุ่นสามารถ จับสัตว์น้ำได้มากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ ประมงพื้นบ้านสามารถจับสัตว์น้ำได้เพียง 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นทำให้เกิดการแย่งปันทรัพยากรสัตว์น้ำอย่างไม่เท่าเทียม ปลาทรายแดงเป็นปลา เศรษฐกิจที่ได้รับผลกระทบจากการทำประมงแบบผิดกฎหมายมากที่สุด พบว่า สถิติการจับปลาทรายแดงมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว โดยในปี พ.ศ. 2548 มีปริมาณการจับได้ถึง 100,000 ตัน แต่ลดลง เหลือประมาณ 50,000 ตัน ในปี พ.ศ. 2555 (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2555) จากการ กำหนดมาตรการควบคุมและการจัดระเบียบการใช้เรือประมงอย่างเข้มงวดตาม พระราชบัญญัติการ ประมง พ.ศ. 2558 คาดว่าจะทำให้โอกาสที่สัตว์น้ำวัยอ่อนและสัตว์น้ำเศรษฐกิจมีโอกาสในการฟื้นฟู และเจริญเติบโตและสามารถเพิ่มจำนวนได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามจากการที่มีการทำประมงอย่าง ผิดกฎหมายมาเป็นเวลานานอาจส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์ ทะเลรวมถึงการเกิดเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมของสัตว์น้ำซึ่งเกิดจากการขาดช่วงทาง พันธุกรรม (genetic drift) ซึ่งจะมีผลเป็นอย่างมากต่อวิวัฒนาการและการอยู่รอดของประชากรใน ระยะยาว แต่พบว่าข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรสัตว์น้ำส่วนใหญ่ในประเทศไทยยังมีการศึกษา กันไม่มากนัก

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมได้แก่ ทางความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร และประวัติประชากร ของ ปลาทรายแดงในประเทศไทย เพื่อ ประเมินผลความหลากหลายทางพันธุกรรมหลังจากมีการประกาศ พระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2558 โดยทิ้งช่วงเวลาประมาณ 1- 2 ปี เพื่อให้ประชากรปลาทรายแดงมีการฟื้นฟูและขยายพันธุ์ซึ่ง ช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่ครบวงจรของการสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตของปลาทรายแดงจึงเป็น ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยก่อนที่จะทำการประเมิน ความหลากหลายทางพันธุกรรมในการของบประมาณครั้งนี้ได้มีการเก็บตัวอย่างปลาทรายแดงจากทุก

แหล่งตัวอย่างไว้แล้วก่อนมีการประกาศใช้พระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2558 ซึ่งได้เก็บรักษาสภาพไว้และจะนำผลที่ทดลองได้ไปเปรียบเทียบกับความหลากหลายทางพันธุกรรมในปี พ.ศ. 2560 การศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรีย ไลตีเอ็นเอจากยีน cytochrome oxidase subunit I เนื่องจากสามารถวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรได้อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์ประวัติประชากรที่ผ่านมาและทำนายทิศทางของการเพิ่มหรือการลดขนาดของประชากรในอนาคตได้ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะสามารถนำไปใช้ในการจัดการประชากรปลาทรายแดงในธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพและยังคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรม

โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม การอพยพหรือการกลายพันธุ์ (Ayala, 1982; Slatkin, 1987) รูปแบบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรจะบ่งบอกถึงความสามารถในการอยู่รอดที่สิ่งมีชีวิตสามารถปรับตัวให้เหมาะสมกับแหล่งที่อยู่โดยแสดงออกในรูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมกับกลุ่มประชากร (Tudela *et al.*, 1999) ซึ่งสามารถนำข้อมูลโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรไปใช้ในการวางแผนจัดการทรัพยากรให้เหมาะสมกับแหล่งที่อยู่ได้ (Roldan *et al.*, 2000) อีกทั้งยังสามารถใช้ระบุกลุ่มทางพันธุกรรม (genetic stock) ของประชากรในธรรมชาติจากแหล่งอาศัยต่างๆ เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงได้

ตามพระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2558 ในมาตราที่ 9 มีการกล่าวถึงการ ส่งเสริมการมีส่วนร่วมและสนับสนุนชุมชนประมงท้องถิ่นในการจัดการ การอนุรักษ์ การฟื้นฟู และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนจากทรัพยากรสัตว์น้ำรวมทั้งต้องมีการเผยแพร่ความรู้หรือข้อมูลข่าวสารลงสู่ชุมชน ดังนั้นจึงเป็นโอกาสดีที่จะมีการเริ่มต้นศึกษาเพื่อหาข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อเป็นข้อมูลในการจัดการและการติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของสัตว์ทะเลต่อไปในอนาคตและจะได้เป็นข้อมูลในการเผยแพร่เพื่อลงสู่ชุมชนต่อไป โดยในแผนงานต่อไปจะนำผลการวิจัยไปบูรณาการกับการจัดการทางประมงด้วยวิธีการอื่นๆร่วมกับชุมชนเครือข่ายเพื่อหาข้อตกลงในการจัดการประมงชายฝั่งที่จะทำให้ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทรายแดงในท้องถิ่น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรม ของปลาทรายแดงในประเทศไทยก่อน และหลังจากมีการประกาศใช้ พระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2558

2. เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของ ปลาทรายแดงในประเทศไทย ก่อนและ หลังจากมีการประกาศใช้ พระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2558

3. เพื่อศึกษาประวัติประชากรสำหรับการคาดคะเนแนวโน้มของจำนวนประชากร ของปลา ทรายแดงในประเทศไทยหลังจากมีการประกาศใช้ พระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2558



บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ปัจจุบันมีการตื่นตัวในการรักษาความหลากหลายทางชีวภาพ ในธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากในอดีตที่ผ่านมามนุษย์มีการพัฒนาด้านต่างๆ เป็นระยะเวลายาวนาน โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะให้ได้ผลลัพธ์สูงสุดแต่ให้ความสำคัญต่อผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยมากจึงทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ยั่งยืน จะเห็นได้จากตัวอย่างของการประมงที่เริ่มจับสัตว์น้ำได้น้อยลงหรือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ประสบกับปัญหาต่างๆ มากมาย เช่น โรคระบาด หรือสัตว์น้ำที่เลี้ยงมีขนาดไม่โตเหมือนในอดีตที่ผ่านมา จากความตอนหนึ่งในพระราชดำรัสของพระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช พระราชทานแก่สมาชิกกลุ่มเกษตรกรทั่วประเทศ ณ โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดาเมื่อวันที่ 14 พฤษภาคม 2523 ว่า

“...ทรัพยากรด้านประมงจะต้องจัดเป็นระเบียบ ความสำคัญไม่ได้อยู่ที่ว่าปล่อยพันธุ์ปลาให้ดีหรือเลี้ยงปลาให้เติบโต ความสำคัญอยู่ที่ด้านบริหารการจับปลาเพื่อให้ประชาชนได้ประโยชน์จริงๆ...”

ดังนั้นในการบริหารจัดการปลาทรายแดงอย่างยั่งยืนนั้นนอกจากจะต้องมีการจัดการทางการประมงที่ดีแล้ว จำเป็นมากที่จะต้องทราบข้อมูลทางพันธุกรรมซึ่งจะต้องใช้พิจารณาประกอบในการจัดการเพื่อให้เหมาะสมกับแหล่งพันธุกรรมของ ปลาทรายแดง แต่ละท้องถิ่นเพื่อให้คงซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้

2.1 ชีววิทยาของปลาทรายแดง

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

ปลาทรายแดง (ภาพที่ 1) หรือมีชื่อเรียกอื่นว่าปลาทรายแดงโหม่ง มีชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า Threadfin Breams และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nemipterus hexodon* มีการจำแนกทางอนุกรมวิธานดังนี้ (Russell, 1990)

Class	Actinopterygii
Subclass	Neopterygii
Order	Perciformes
Suborder	Percoidei
Family	Nemipteridae
Genus	Nemipterus
Species	<i>Nemipterus hexodon</i>



ภาพที่ 1 ปลาทรายแดง

ลักษณะทั่วไป เป็นปลาทะเลมีรูปร่างเรียวยาว มีขนาดความยาวประมาณ 20 - 30 เซนติเมตร ลำตัวท่อนโตทู่ ท่อนหางยาว จะงอยปากค่อนข้างสั้นปากกว้างและเฉียงขึ้นเล็กน้อย มีฟันแหลมคม ส่วนที่ครีบแข็งและครีบอ่อนมีความสูงสม่ำเสมอคล้ายครีบแหลมยื่นออกเป็นเส้นเดี่ยว เช่นเดียวกับปลายครีบกัน ครีบท้องอยู่ใกล้กับครีบหูมีปลายแหลมเหมือนกัน หรือหางแยกแฉกเว้า พื้นลำตัวสีขาว หลังสีชมพูปนม่วง มีแถบสีเหลืองที่ครีบหลัง 2 แถบ ลำตัว 6-7 แถบ และครีบกัน 1 แถบ แฉกบนครีบหางมีแถบสีเหลืองหนึ่งแถบ มีจุดสีส้มอยู่เหนือช่องเหงือกข้างละจุด ถิ่นอาศัย อยู่รวมกันเป็นฝูง หากินบริเวณท้องทะเลที่เป็นโคลนหรือโคลนปนทรายพบทั่วไปบริเวณอ่าวไทยและทะเลอันดามัน กินสัตว์น้ำที่มีขนาดเล็กกว่าซึ่งอยู่บริเวณหน้าดิน (Russell, 1990)

การแพร่กระจาย

ปลาทรายแดงเป็นปลาหน้าดินที่อยู่รวมกันเป็นฝูงและหากินตามพื้นท้องทะเลที่เป็นโคลนหรือดินทรายปนโคลน พบแพร่กระจายทั่วไปในทะเลแถบอินโดแปซิฟิก ตั้งแต่ชายฝั่งจนถึงระดับความลึก 300 เมตร ในน่านน้ำไทยพบทั้งฝั่งทะเลอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน ในระดับความลึกสูงสุดประมาณ 60 - 70 เมตร (อุดมและวีระ, 2522)

นิสัยการกินอาหาร

ปลาทรายแดงเป็นปลาที่หากินตามพื้นทะเล จัดเป็นพวกสัตว์กินเนื้อโดยอาหารที่กินได้แก่กุ้ง หมึก หอย ลูกปลา และสัตว์หน้าดินขนาดเล็ก (สมโภชน์, 2547) ปลาทรายแดงขนาดเล็กจะหากินอยู่ตามบริเวณที่ตื้นกว่าปลาขนาดใหญ่ ซึ่งส่วนใหญ่จะกินอาหารพวกกุ้ง โคพีพอด ออสตราคอด ปลาเล็ก หมึก เป็นต้น (เกศินี, 2520)

ความสำคัญทางเศรษฐกิจของปลา ทรายแดง

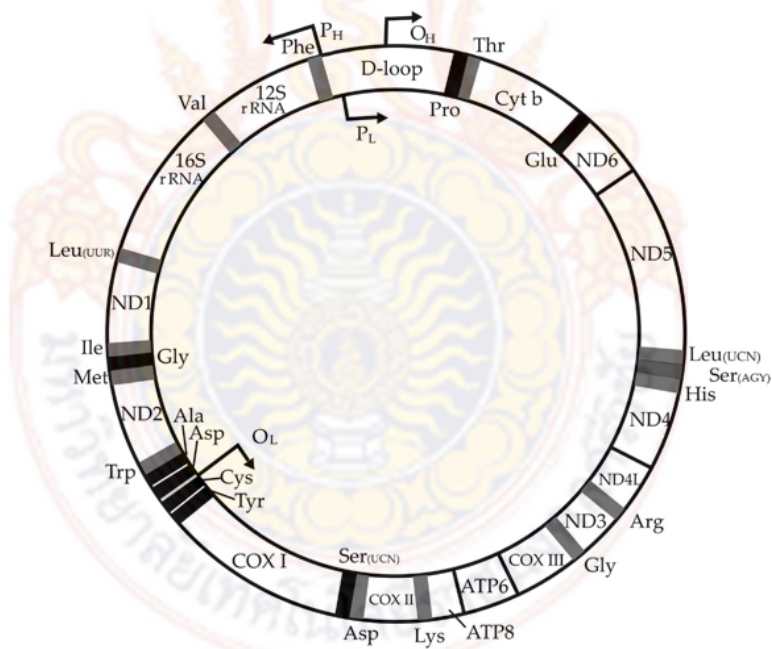
ประเทศไทยมีการจับสัตว์น้ำติดอันดับ 1 ใน 10 ประเทศแรกของโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งการประมงทะเล จากข้อมูลสถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2553 พบว่าตั้งแต่ พ.ศ. 2544 - 2553 มีผลผลิตจากการจับสัตว์น้ำเค็มและเพาะเลี้ยงชายฝั่งคิดเป็นร้อยละ 77 ของผลผลิตจากการประมงทั้งหมด แบ่งเป็นการประมงสัตว์ทะเลร้อยละ 52.3 และการเพาะเลี้ยงชายฝั่งร้อยละ 24.7 หนึ่งในทรัพยากรประมงชายฝั่งที่สำคัญของประเทศไทย ชนิดหนึ่ง คือปลา ทรายแดง เนื่องจากเป็นวัตถุดิบสำคัญมีคุณภาพดีที่สุดในกา ผลิตซูริมิ เนื่องจาก เนื้อ ปลา สีขาวที่มีไขมันต่ำ และไม่มีกลิ่นคาว ปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ผลิตซูริมิอันดับต้นๆของโลกโดยผลิตภัณฑ์ที่ได้เกือบทั้งหมดจะส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น สิงคโปร์ ฮองกง สหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย (จักรี, 2544) จากข้อมูลปริมาณสัตว์น้ำเค็มที่จับได้ในปี พ.ศ. 2555 พบว่ามีการจับปลาทรายแดงได้สูงถึง 53 , 000 ตัน โดยแบ่งเป็นปริมาณการจับจากฝั่งอ่าวไทยประมาณ 40,000 ตัน และฝั่งอันดามัน 13,000 ตัน คิดเป็นมูลค่าทางเศรษฐกิจถึง 2,151.7 ล้านบาท (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2555)

2.2 ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ในสัตว์

การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์ทะเลมีเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการตรวจสอบหลายวิธีเช่น Random amplification of polymorphic DNA (RAPD), Amplified fragment Length Polymorphism (AFLP) และ Simple Sequence Repeat (SSR) (Klinbunga *et al.*, 2007) ปัจจุบันนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่กำลังได้รับความนิยมในปัจจุบันได้แก่ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเนื่องจากมีข้อดีหลายประการเช่น มีการถ่ายทอดพันธุกรรมทางแม่ทำให้มีความคล้ายคลึงกันของสมาชิกภายในประชากรจึงทำให้ไม่ต้องใช้ตัวอย่างในปริมาณมากในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง (Brown *et al.*, 1982) อีกทั้งไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ มีจำนวนมากในแต่ละเซลล์ทำให้การสกัดดีเอ็นเอในแต่ละครั้งจะได้ปริมาณดีเอ็นเอ เป็นจำนวนมาก รวมทั้งไม่มีการเกิด recombination ทำให้สามารถตรวจสอบสายสัมพันธ์ภายในประชากรได้ และที่สำคัญคือมี

อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงซึ่งเหมาะแก่การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม โครงสร้างทาง พันธุศาสตร์ประชากรและประวัติประชากร (Guo *et al.*, 2011)

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอ ประมาณ 2-10 ซ้ำ (Boore, 1999) ไมโทคอนเดรีย ลดีเอ็นเอ ในสัตว์จะมีลักษณะเป็น circular DNA โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 15,000-17,000 คู่เบส ประกอบไปด้วยยีนจำนวน 37 ยีน ได้แก่ยีนที่แปลรหัสเพื่อเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ oxidative phosphorylation 13 ยีน แปลรหัสเป็น transfer RNAs 22 ยีน และแปลรหัสเป็นเป็น small และ large subunits of ribosomal RNAs จำนวน 2 ยีน ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ มีการจัดเรียงตัวของยีนที่ไม่ทับซ้อนและไม่มีส่วนที่เป็นอินทรอน มีส่วนที่เรียกว่าคอนโทรลรีเจียน ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีน (Crease,1999; Avise, 1986; Ouithavon, 2009) บริเวณคอนโทรลรีเจียน มีชื่อเรียกอีกชื่อว่า D-loop เป็นบริเวณที่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมากกว่าบริเวณอื่นในไมโทคอนเดรีย ลดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิด replication และ expression (Boore, 1999) อัตราการเกิด nucleotide substitution ของบริเวณคอนโทรลรีเจียนจะสูงกว่าบริเวณอื่น 5-10 เท่าและสูงกว่าใน nuclear genes 25-100 เท่า



ภาพที่ 2 โครงสร้างของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ที่มา: Avise (1994)

2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นส่วนหนึ่งของ ความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ซึ่งประกอบด้วยความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ความหลากหลายของชนิด (species diversity) และความหลากหลายทางนิเวศวิทยา (ecological diversity) ความหลากหลายทางพันธุกรรมหมายถึงความผันแปรของยีนหรือหน่วยของพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรเกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน (recombination) และการรวมตัวกันใหม่ (rearrangement) ของยีนหรือโครโมโซมในระหว่างการแบ่งตัวแบบไมโอซิสรวมทั้งการกลาย ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเกิดขึ้นเมื่อสมาชิกในประชากรมีการแยกตัวออกจากประชากรเดิมและเริ่มแยกกลุ่มผสมพันธุ์ ลดการถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างประชากรทำให้ความถี่ของอัลลีลเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งถ้ามีการถ่ายเทของยีนมากประชากรก็มีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ถ้ามีการถ่ายเทของยีนน้อย หรือไม่มีเลยประชากรก็จะแตกต่างกันมากจนในระยะเวลาหนึ่งประชากรที่แยกจากกันจะมีวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างประชากร (Frankham *et al*, 2002) และนำไปสู่การวิวัฒนาการเกิดเป็นชนิดพันธุ์ใหม่ (speciation) ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อความอยู่รอดของชนิดพันธุ์ (species) โดยสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ จะไม่สามารถปรับตัวได้หากสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปก็จะนำไปสู่การสูญพันธุ์ นอกจากนี้ความหลากหลายที่ต่ำหากเป็นผลจากจำนวนพ่อแม่พันธุ์ทางพันธุกรรม (effective population size, N_e) น้อยจะนำไปสู่การผสมเลือดชิด ซึ่งมีผลให้ลักษณะที่จำเป็นต่อการอยู่รอด เสื่อมถอยลง การอนุรักษ์จึงจำเป็นต้องรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากรไว้ ซึ่งจะทำให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่อมีข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเป้าหมาย (Frankham *et al.*, 2002)

กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมภายในประชากร

ประชากรในธรรมชาติมักมีพฤติกรรมที่เบี่ยงเบนไปจากประชากรทางทฤษฎี เนื่องจากเกิดกระบวนการทางพันธุกรรมต่างๆ กระบวนการสำคัญที่เกี่ยวข้องมีดังนี้คือ

1. การขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) คือการที่ความถี่ของอัลลีลเปลี่ยนแปลงไปอย่างไม่มีการคัดเลือก เกิดจากการที่มีพันธุกรรมเพียงบางส่วนเท่านั้นที่ได้ถ่ายทอดไปสู่ชั่วอายุต่อไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง 2 ประการ คือ (1) พันธุกรรมของรุ่นลูกแตกต่างจากรุ่นพ่อแม่ (2) ประชากรจะสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอัลลีลจำนวนหนึ่งจะสูญหายไปโดยเฉพาะอัลลีลที่มีความถี่

ต่ำ ดังนั้นจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งจะลดลงเมื่อเทียบกับประชากรธรรมชาติ กระบวนการขาดช่วงทางพันธุกรรมมักเกิดขึ้นกับประชากรขนาดเล็กมากกว่าประชากรขนาดใหญ่

2. การถ่ายเทยีนระหว่างประชากร (gene flow) เกิดจากสมาชิกของประชากรหนึ่งไปผสมพันธุ์กับอีกประชากรหนึ่ง หากสิ่งมีชีวิต 2 กลุ่มมีการถ่ายเทยีนในระดับที่สูง ความแตกต่างระหว่างประชากร 2 กลุ่ม ก็จะน้อยลงจนกระทั่งเป็นประชากรเดียว หากระดับการถ่ายเทยีนระหว่างกลุ่มต่ำ ทั้งสองกลุ่มก็อาจจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรม ปัจจัยที่ขัดขวางการถ่ายเทยีนระหว่างกลุ่ม อาจรวมถึงปัจจัยทางกายภาพ เช่น สภาพภูมิประเทศหรือสิ่งกีดขวาง และปัจจัยทางชีววิทยา เช่น ความจำเพาะต่อแหล่งวางไข่ หรือการมีฤดูกาลวางไข่ต่างกัน

3. การเกิดสภาวะคอขวด (demographic bottlenecks) เกิดจากการที่แต่ละจีโนไทป์มีโอกาสถูกคัดเลือกออกจากประชากรได้ไม่เท่ากัน การคัดเลือกในประชากรสัตว์น้ำธรรมชาติสามารถเกิดได้จากสภาวะธรรมชาติ เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำหรือจากการกระทำของมนุษย์ เช่น การใช้เครื่องมือที่จำเพาะต่อสัตว์ลักษณะหนึ่ง การคัดเลือกอาจทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเท่าเดิมหรือลดลงขึ้นอยู่กับลักษณะจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซโกต หรือเฮเทอโรไซโกต ที่ถูกคัดออกจากประชากร ผลของการคัดเลือกต่อลักษณะปริมาณคือการเปลี่ยนค่าเฉลี่ยของลักษณะของประชากรรุ่นถัดไป (วันศุกร์และจิราภรณ์, 2551)

2.4 การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งอาจเกิดจากการปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม การอพยพหรือการกลายพันธุ์ (Ayala, 1982; Slatkin, 1987) รูปแบบโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรจะบ่งบอกถึงความสามารถในการอยู่รอดที่สิ่งมีชีวิตสามารถปรับตัวให้เหมาะสมกับแหล่งที่อยู่ต่างๆโดยแสดงออกในรูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมกับกลุ่มประชากร โดยการเกิดโครงสร้างประชากรเกิดจากการที่มีการขัดขวางความสามารถในการส่งถ่ายยีนในกลุ่มประชากร เช่นการขัดขวางการเกิด การถ่ายเทยีนอันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น ปัจจัยทางสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ หรือความสามารถในการสืบพันธุ์ วิธีการวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรนั้นมีหลายวิธีเช่น การเปรียบเทียบค่า heterozygosity หรือการเปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรม สำหรับการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นนิยมใช้วิธีการเปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยวิธี Analysis of molecular variance (AMOVA) โดย AMOVA จะทำการประมาณการความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยตรงจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยคำนวณในรูปแบบของ squared-distances matrix จากการเปรียบเทียบระหว่างคู่ของแฮโลไทป์ โดยจะคำนวณออกมาเป็นความแปรปรวนออกมาแล้วแสดงค่าในรูปแบบของค่า F -statistic analogs ตามระดับของการแบ่งกลุ่มประชากรตรวจสอบ (Excoffier, *et al.* 2010)

2.5 การศึกษาประวัติประชากร

การศึกษาประวัติประชากรเป็นการศึกษาถึงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของ effective population size ในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถที่จะนำมาสร้างเป็นโมเดลของรูปแบบของการกลายพันธุ์เพื่อใช้คาดคะเนการเปลี่ยนแปลงที่ผ่านมาได้เช่น การตรวจสอบการขยายขนาดของประชากรโดยการศึกษาย้อนกลับด้วยวิธีการทาง coalescent เพื่อคาดคะเนประชากรก่อนและหลังการขยายตัว (Tajima, 1989 ; Rogers and Harpending, 1992) อีกวิธีหนึ่งซึ่งนิยมใช้ในการตรวจสอบประวัติประชากรคือการศึกษานิวทรัลิตี (neutrality tests (Tajima's D and Fu's F statistics) โดยวิธีนี้เป็นการตรวจสอบประชากรที่มีการเบี่ยงเบนไปจากประชากรที่เป็น neutral population ซึ่งเป็นประชากรที่มีการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนอันเนื่องมาจากปัจจัยของการเกิดการกลายพันธุ์และ genetic drift เท่านั้น และยังสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ population size ได้อีกด้วย (Mousset *et al.*, 2004) โดยในการตรวจสอบด้วยวิธี Tajima's D test และ Fu's F_s test หากมีค่าติดลบ แสดงว่าประชากรเคย ผ่านการถูกคัดเลือกแบบ purifying selection หรือเคยเกิด population expansion มาก่อน โดยค่า Fu's F_s จะมีความสามารถในการตรวจสอบการเกิด population expansion ได้สูงหากมีค่าติดลบ (Fu, 1997) การตรวจสอบประวัติประชากรอีกวิธีการที่นิยมคือการตรวจสอบด้วยวิธี Mismatch distribution โดยวิธี Mismatch distribution เป็นการตรวจสอบการแพร่กระจายของความถี่เมื่อเปรียบเทียบเป็น รายคู่ ของจำนวนของการกลายพันธุ์ โดยแสดงออกมาในรูปแบบของพารามิเตอร์ ได้แก่ θ_0, θ_1 (ก่อนและหลัง population growth) และค่า τ (ระยะเวลาในการกลายพันธุ์) และยังแสดงผลในรูปแบบของกราฟการกระจายได้ (Rogers and Harpending, 1992) โดยหากกราฟเป็นรูปแบบ smooth unimodal distributions แสดงว่ามีการสะสมของการเกิดการกลายพันธุ์มาเรื่อยๆ แสดงว่าประชากรน่าจะเริ่มมีการขยายขนาดมาเมื่อไม่นานมานี้ แต่ถ้าหากว่ารูปแบบของกราฟเป็นแบบ ragged multimodal distributions แสดงว่าประชากรมีการขาดหายของการกลายพันธุ์มานานการฝึกขาดของกราฟเป็นเพียงการกลายพันธุ์เพื่อรักษาความสมดุลในประชากรเท่านั้นซึ่งแสดงว่าประชากรมีขนาดที่คงที่และเป็นประชากรที่เป็น constant population size (Cassone and Boulding, 2006)

2.6 การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในปลาทะเล

การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของปลาทะเลสามารถที่จะทำให้เข้าใจในกลไกของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Tudela *et al.*, 1999) ซึ่งสามารถนำข้อมูลไปใช้ในการวางแผนจัดการทรัพยากรได้ (Roldan *et al.*, 2000) สาเหตุของการเกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์ทะเลมีหลายปัจจัยเช่น ปัจจัยทางฟิสิกส์ทางทะเล ได้แก่ กระแสน้ำ น้ำขึ้นน้ำลง พายุ เป็นต้น ปัจจัยทางชีววิทยา เช่น การเคลื่อนที่ของตัวอ่อน กลยุทธ์ในการสืบพันธุ์ เป็นต้น (Roman and Palumbi, 2004) การเกิดการแยกของโครงสร้างประชากรของ ปลา อาจเกิดจากการที่มีระยะห่างระหว่างประชากรมากเกินไปหรือมีปัจจัยทางภูมิศาสตร์มาขวางกั้นทำให้ไม่สามารถเกิดการถ่ายยีน ระหว่างกันได้ หรือเกิดจากการที่มีการจำกัดของแหล่งที่อยู่โดยจะเลือกเฉพาะแหล่งที่อยู่ที่เหมาะสมเท่านั้น (Bowen *et al.*, 2001; Guarnieo *et al.*, 2002; Carmill *et al.*, 2003; Bernal-Ramirez *et al.*, 2003; Hoffman *et al.*, 2005) หรืออาจเกิดจากปัจจัยจากมนุษย์ที่มีการจับปลามากเกินไป จนกระทั่งทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดต่ำลงและมีความแตกต่างของโครงสร้างประชากรเกิดขึ้น การศึกษาเกี่ยวกับทางด้าน พันธุศาสตร์กลุ่มปลา ทราายแดง มีรายงานการศึกษา เฉพาะในต่างประเทศ เช่น การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลาทราายแดง (*Nemipterus japonica*) ตลอดชายฝั่งของประเทศมาเลเซียโดยใช้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cytochrome b* พบว่ามีความแตกต่างของพันธุกรรมระหว่างประชากรตลอดชายฝั่งของประเทศมาเลเซียและพบว่ามี การผสมแบบสุ่มภายในประชากรเดียวกัน (Lim *et al.*, 2014) การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาในครอบครัว Nemipteridae โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cytochrome c oxidase I* พบว่า สามารถแยกกลุ่มปลาในครอบครัว Nemipteridae ได้ 9 ชนิด (Ravitchandirane *et al.*, 2012) และการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลา *Nemipterus peronii* และปลา *Nemipterus japonicus* ที่อาศัยบริเวณชายฝั่งทางตะวันตกและตะวันออกของประเทศอินเดียโดยใช้อัลโลไซม์พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรทั้งสองชายฝั่งทะเล (Menezes *et al.*, 2002)

สำหรับการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลาทราายแดงในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนมีแต่รายงานการศึกษาของปลาชนิดอื่นเช่น การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) ในทะเลฝั่งอ่าวไทยและอันดามันโดยใช้ โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ผลการศึกษาพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาช่อนทะเลทั้งสองฝั่งใกล้เคียงกันและไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรทั้งสองฝั่งซึ่งคาดว่า การที่ไม่มีความแตกต่างของโครงสร้างประชากรน่าจะเกิดจากการที่มีการผสมกันเอง ภายในกลุ่ม (inbreeding) (Phinchongsakuldit *et al.*, 2013) การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์

ประชากรของม้าน้ำ (*Hippocampus kuda*) ในประเทศไทยโดยเก็บตัวอย่างจาก ทะเลฝั่งอ่าวไทย และอันดามันโดยใช้โดยใช้โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก ไมโทคอนเดรีย ลดีเอ็นเอ บริเวณ control region ผลการศึกษาพบว่า มีโครงสร้างประชากรเกิดขึ้นและยังพบว่าทั้งสองฝั่งทะเลมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงจึงควรมีการจัดการแยกกันในแต่ละฝั่งทะเล (Panithanarak et al., 2010) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากะรัง (*Epinephelus coioides*) ในทะเลไทยและอินโดนีเซียโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ในประเทศไทยเก็บตัวอย่างที่ จังหวัดนครศรีธรรมราชและตรัง ผลการศึกษาพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยและพบว่ามีโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรในจังหวัดนครศรีธรรมราชแตกต่างจากประชากรในแหล่งอื่น (Antoro et al., 2006)

การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของกลุ่มปลาทะเลที่อาศัยตามบริเวณชายฝั่งมีหลายรายงานเช่นการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลา Korean threadsail filefish (*Stephanolepis cirrhifer*) จากบริเวณชายฝั่งของประเทศเกาหลี โดยใช้โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 11 ตำแหน่ง ผลการศึกษาพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและพบว่ามีโครงสร้างของประชากรเกิดขึ้นโดยบริเวณชายฝั่งจาก Geomundo มีความแตกต่างจากบริเวณอื่นซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากบริเวณนี้มีเกิดการปรากฏการณ์คอขวด (genetic bottleneck) มาก่อน (An et al., 2013) การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลากะเบนสามชนิดได้แก่ *Himantura gerrardi*, *Neotrygon kuhlii* และ *Taeniura lymna* จากพื้นที่เขต Central Indo-West Pacific โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมจากตำแหน่ง polymorphic site ของอินทรอนจากยีนต่างๆจำนวน 7 ยีน พบว่ามีความแตกต่างของโครงสร้างประชากรเกิดขึ้นโดยพบว่ายิ่งระยะห่างระหว่างแหล่งที่อยู่เพิ่มมากขึ้นจะยิ่งมีความแตกต่างของโครงสร้างประชากรมากขึ้น (Borsa et al., 2012) การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลา whitefish (*Coregonus maraena*) จากทะเลบอลติกและชายฝั่งของสวีเดนโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่งผลการศึกษาพบว่ามีความแตกต่างของประชากรโดยแยกเป็นทางฝั่งตอนใต้และตอนเหนือและพบว่าความแตกต่างจะยิ่งเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะทางเพิ่มมากขึ้น (Olsson et al., 2012) การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลา spottedtail goby (*Synechogobius ommaturus*) จากชายฝั่งประเทศเกาหลีและญี่ปุ่นโดยใช้เทคนิค AFLP ผลการศึกษาพบว่าไม่มีโครงสร้างของประชากรเกิดขึ้นแต่พบว่ามีมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากแสดงว่าปลา spottedtail goby มีความสามารถในการแพร่กระจายสูงมาก (Song et al., 2010) การศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลาในแนวปะการังสองชนิดคือ *Plectropomus maculatus* และ *Lutjanus carponotatus* จากแนวปะการัง Great Barrier Reef ของออสเตรเลีย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากไมโทคอนเดรีย ลดีเอ็นเอ

บริเวณคอนโทรลรีเจียน ผลการศึกษาพบว่าไม่มีโครงสร้างของประชากรของทั้งสองชนิดและในการจัดการไม่ควรจัดการแยกกัน (Evans *et al.*, 2010)

2.7 พันธุศาสตร์กับการจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำ

ปัจจุบันกิจกรรมทางการประมงด้านการจับสัตว์น้ำและการเพาะเลี้ยง สัตว์น้ำมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว มีการนำความรู้ทางพันธุศาสตร์มาใช้ในการจัดการทรัพยากรเพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืนและมีประสิทธิภาพสูงสุด การที่สัตว์น้ำต่างชนิดกันมีลักษณะการดำรงชีวิต อัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอด และรูปแบบการสืบพันธุ์ที่แตกต่างกัน เป็นผล เนื่องจากพันธุกรรมที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด ปัจจุบันเทคนิคทางด้านอนุพันธุศาสตร์มีความก้าวหน้าเป็นอย่างมากทำให้สามารถตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ในระดับโมเลกุลโดยอาศัยโมเลกุลเครื่องหมาย เช่น โพรตีนเครื่องหมาย ได้แก่ อัลโลไซม์ ซึ่งเป็นการตรวจสอบและเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนชนิดต่างๆ และดีเอ็นเอเครื่องหมาย ได้แก่ ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellites), เครื่องหมายอาร์ เอพีดี (Randomly Amplified Polymorphic DNA; RAPD), เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (Amplified fragment length; polymorphism; AFLP) และ เครื่องหมายจาก ไมโทคอนเดรีย ลดีเอ็นเอเอ รวมทั้งการตรวจสอบความแตกต่างในการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณต่างๆ ซึ่งดีเอ็นเอเครื่องหมายสามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ละเอียดและถูกต้องกว่าโปรตีนเครื่องหมายและใช้ปริมาณตัวอย่างในการตรวจสอบเพียงเล็กน้อย ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ ในประเทศไทยมีประโยชน์ต่อการวางแผนและการจัดการในเชิงอนุรักษ์ไม่ให้มีการปะปนของสายพันธุ์ที่ทำให้สูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมและอาจทำลายลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยง การปรับปรุงพันธุ์ การจัดการเกี่ยวกับโปรแกรมการคัดเลือกเพื่อการผสมพันธุ์ ความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากร และความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของสัตว์น้ำ ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์น้ำแต่ละชนิดที่ระดับภายในประชากรและแต่ละประชากรจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำแต่ละชนิด ซึ่งความรู้ที่ได้จากงานวิจัยพันธุศาสตร์พื้นฐานสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดเป็นอย่างดี (Frankham *et al.*, 2002)

ปัจจุบันมีการนำความรู้เกี่ยวกับพันธุศาสตร์ และเทคนิคทางอนุชีววิทยา มาศึกษาและประยุกต์ใช้ประโยชน์ของทรัพยากรสัตว์น้ำในด้านต่างๆ ให้เป็นไปอย่างยั่งยืน เช่น การระบุชนิด การศึกษาโครงสร้างประชากร การผสมข้ามสายพันธุ์ การวิเคราะห์ผลกระทบทางพันธุกรรมต่อการจับสัตว์น้ำและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เครื่องหมายพันธุกรรมนั้นมีประโยชน์อย่างยิ่งในการจัดการทรัพยากรทางน้ำ โดยช่วยในการจำแนกและติดตามลักษณะทางพันธุกรรมที่น่าสนใจในสัตว์น้ำที่ต้อง

การคัดพันธุ์เพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ดี รวมถึงการวางแผนการผสมข้ามสายพันธุ์ สำหรับการสร้างโปรแกรมการคัดพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพนั้นต้องมีความรู้พื้นฐานทางพันธุกรรมเป็นอย่างดี ต้องเข้าใจถึงความถี่ของยีน (gene frequency) และค่า heritability ในแต่ละประชากรสามารถประเมินระดับการอพยพได้รวมถึงการคาดการณ์การ mixed stock ระหว่างประชากรการศึกษาและติดตามพันธุกรรมของสัตว์น้ำซึ่งจะช่วยให้เข้าใจการเปลี่ยนแปลงของประชากรสัตว์น้ำทั้งในธรรมชาติและในโรงเพาะเลี้ยงได้ง่ายขึ้น

ในสัตว์ทะเลหลายชนิดจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำเนื่องจากพฤติกรรมการวางไข่ การอพยพหรือการไม่กลับมาวางไข่ที่แหล่งน้ำเดิมซึ่งส่งผลให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และมีความเสี่ยงสูงต่อการสูญพันธุ์ ดังนั้น การปรับปรุงพันธุกรรมสัตว์น้ำที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำและการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์น้ำที่เป็นสัตว์น้ำในธรรมชาติ และโรงเพาะเลี้ยงจะทำให้สามารถจัดการการเพาะพันธุ์และผสมข้ามพันธุ์ได้อย่างเหมาะสม รวมถึงสามารถเฝ้าระวังการเกิดการผสมกันเองในกลุ่มเครือญาติ นอกจากนี้ เครื่องหมายพันธุกรรมยังช่วยในการจำแนกชนิดของสัตว์น้ำเพื่อผลประโยชน์ทางการค้าและเพื่อการอนุรักษ์อีกด้วย



บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1. วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปลา ทวายแดงจากจังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดชลบุรี จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา โดยเก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2558 จำนวนทั้งหมด142 ตัว และในปี พ.ศ. 2560 จำนวนทั้งหมด177 ตัว (ภาพที่ 3 , ตารางที่ 2, ตารางที่ 7) หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างสดไว้ในน้ำแข็งแล้วส่งเข้าห้องปฏิบัติการและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3 บริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่าง ปลาทวายแดงในปี พ.ศ. 2558 และ พ.ศ. 2560
จังหวัดสงขลา (SK); จังหวัดนครศรีธรรมราช (NS); จังหวัดสุราษฎร์ธานี (SR); จังหวัดสมุทรสงคราม (SM); จังหวัดชลบุรี (CH); จังหวัดสตูล (ST); จังหวัดตรัง (TG); จังหวัดกระบี่ (KB); จังหวัดพังงา (PN)

3.1.2 ชุดสกัดดีเอ็นเอ

Genomic DNA Mini Kit

3.1.3 ชุดทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

Gel/PCR DNA fragments extraction kit

3.1.4 โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ประชากร

3.2. การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเนื้อปลาน้ำหนักประมาณ 20–30 มิลลิกรัม มาสกัด total genomic DNA ด้วยชุดสกัด Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN, BIOTECH CORP.)

3.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณ ยีน cytochrome oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ของปลาทรายแดงจากฐานข้อมูล NCBI (GenBank accession number: KY362820.1, Hung *et al.*, 2017) ด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ forward primer NH_COI_H1 5' CCT TTA TCT CTT ATT TGG TGC C 3' และ reverse primer NH_COI_L1 5' GAA GAG ATG TTG ATA AAG AAT GGG 3' ในหลอด พีซีอาร์ ประกอบด้วย 10X *Taq* buffer 5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 7.5 ไมโครลิตร , 2 mM dNTPs mix 4 ไมโครลิตร, 10 μ M primer forward 2 ไมโครลิตร, 10 μ M primer reverse 2 ไมโครลิตร , *Taq* DNA polymerase (RBCbiosciences, USA) 0.5 ไมโครลิตร (2.5 unit), DNA template 5 ไมโครลิตร (50-100 ng) และ ultrapure water 24 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วย เครื่อง Mastercycler, Eppendorf (Germany) เริ่มต้นโดยการแยกสาย ดีเอ็นเอ (initial denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที จากนั้น แยกสาย ดีเอ็นเอ (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 40 วินาที ลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าคู่กับ ดีเอ็นเอ ต้นแบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส 1 นาที และ เพิ่มอุณหภูมิเพื่อต่อสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาทีรวมเป็นจำนวน 35 รอบ และ ใช้อุณหภูมิสุดท้ายเพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

3.2.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลการทำปฏิกิริยา พีซีอาร์ ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis นำผลผลิต พีซีอาร์ ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN, BIOTECH CORP.) จากนั้นส่งดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการ (1ST Base Laboratory, Malaysia)

3.3. การจัดการข้อมูลและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

3.3.1 การจัดการข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

เชื่อมต่อข้อมูลชิ้นส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม CAP3 software (Huang and Madan, 1999) ทำการ alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW version 2.0.12 (Larkin *et al.*, 2007) แล้วปรับด้วยสายตาอีกครั้ง

3.3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยหาค่า nucleotide diversity (π ; Nei, 1987), haplotype diversity (h ; Nei, 1987) และค่า mean number of nucleotide differences ระหว่าง แฮปโลไทป์ ทั้งหมดด้วยโปรแกรม DnaSP version 5.00 (Librado and Rozas, 2009)

3.4. การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

3.4.1 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

วิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธี analysis of molecular variance (AMOVA) เพื่อเปรียบเทียบระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรโดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations วิเคราะห์ค่า F -statistic ได้แก่ Φ_{CT} , Φ_{SC} และ Φ_{ST} ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยทำการวิเคราะห์เป็น 6 แบบ ได้แก่

การวิเคราะห์แบบที่ 1 แบ่งประชากรเป็น 9 กลุ่มประชากรตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง (single region) ได้แก่ จังหวัดสงขลา จังหวัด นครศรีธรรมราช จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดชลบุรี จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา

การวิเคราะห์แบบที่ 2 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทย ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสงขลา จังหวัด นครศรีธรรมราช จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดชลบุรี, กลุ่มทะเลอันดามันประกอบด้วยประชากรจาก จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา

การวิเคราะห์แบบที่ 3 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสามกลุ่มได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทย ตอนล่างประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสุราษฎร์ธานี , กลุ่มทะเลอ่าวไทยตอนบนประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดชลบุรี , กลุ่มทะเลอันดามันประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา

การวิเคราะห์แบบที่ 4 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทย ตอนล่างประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสุราษฎร์ธานี , กลุ่มทะเลอันดามันประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา

การวิเคราะห์แบบที่ 5 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทย ตอนบนประกอบด้วยประชากรจากจังหวัด สมุทรสงคราม และจังหวัดชลบุรี , กลุ่มทะเลอันดามัน ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา

การวิเคราะห์แบบที่ 6 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทย ตอนล่างประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสุราษฎร์ธานี , กลุ่มทะเลอ่าวไทยตอนบนประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดชลบุรี

3.4.2 ระยะห่างทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรด้วย วิธี pairwise F_{ST} ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010)

3.5. การวิเคราะห์ประวัติประชากร

3.5.1 ทดสอบ neutrality test

วิเคราะห์ค่า Tajima's D (Tajima, 1989) และ Fu's F_s (Fu, 1997) เพื่อทดสอบการเบี่ยงเบนของประชากรจาก neutral population ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010)

3.5.2 ทดสอบ mismatch distribution

วิเคราะห์ mismatch distribution เพื่อศึกษาการขยายขนาดของประชากรภายใต้สมมติฐาน sudden expansion model โดยใช้ค่าทดสอบ Harpending Raggedness index (Harpending, 1994) และ sum of squared deviations (SSD) เพื่อทดสอบ goodness-of-fit ใช้การทำซ้ำ 10,000 permutations โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010) ประเมินขนาดของประชากรด้วยพารามิเตอร์ θ_0 และ θ_1 เมื่อ θ_0 และ θ_1 เท่ากับ $2N\mu$ เมื่อ N คือค่า effective female population size

3.5.3 ทหาระยะเวลาในการขยายขนาดประชากร

หาเวลาในการขยายขนาดประชากร (t) โดยใช้สูตร $t = \tau/2\mu$ เมื่อ τ คือ expansion time และ $2\mu = \mu \times \text{generation time} \times \text{number of bases}$ เมื่อค่า μ คือค่า mutation rate และมีค่าเท่ากับ 1-2 % per million year (Di Battista *et al.*, 2013) โดยมี generation time เท่ากับ 1 ปี

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาในปี พ.ศ. 2558

4.1.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit I ของปลาทรายแดงมีลำดับเบส 419 คู่เบส มีตำแหน่ง align sites 419 ตำแหน่ง แบ่งเป็น monomorphic sites 405 ตำแหน่ง polymorphic sites 14 ตำแหน่ง (singleton variable site 3 ตำแหน่ง และ parsimony variable site 11 ตำแหน่ง) มีแฮพลไทป์ทั้งหมด 18 แฮพลไทป์ ประกอบไปด้วยแฮพลไทป์ที่เป็น shared haplotype จำนวน 13 แฮพลไทป์โดยแบ่งเป็นแฮพลไทป์ที่เป็น shared haplotype ระหว่างประชากร 11 แฮพลไทป์และ shared haplotype ภายในประชากร 2 แฮพลไทป์ โดยแฮพลไทป์ H07_58, และ H10_58 เป็นแฮพลไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกจังหวัดในฝั่งทะเลอ่าวไทย และแฮพลไทป์ H02_58 เป็นแฮพลไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกจังหวัดในฝั่งทะเลอันดามัน (ตารางที่ 1) พบ rare haplotype รวม จำนวน 5 แฮพลไทป์ (H12_58, H_14_58, H_16_58, H_17_58, H_18_58) โดย จังหวัด ชลบุรี มี rare haplotype มากที่สุด คือ 3 แฮพลไทป์ และจังหวัดสงขลากับจังหวัดสมุทรสงคราม มี rare haplotype น้อยที่สุดคือ 1 แฮพลไทป์ สำหรับค่า haplotype diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.133 – 0.792 ส่วนค่า nucleotide diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.000 – 0.003 โดยค่า haplotype diversity ของประชากรทั้งหมดมีค่า 0.802 ± 0.022 และค่า nucleotide diversity ของประชากรทั้งหมดมีค่า 0.003 ± 0.000 สำหรับค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมได้แก่ จำนวนแฮพลไทป์ , จำนวน polymorphic sites, haplotype diversity (h) และ nucleotide diversity (π) แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 การกระจายของแฮพลোটไปป์ในแต่ละจังหวัดที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2558

Haplotype	SK	NS	SR	SM	CH	ST	TG	KB	PN	Total
H01_58	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2
H02_58	3	-	-	-	-	12	11	10	14	50
H03_58	-	-	-	-	-	2	2	-	-	4
H04_58	-	-	-	-	-	1	1	3	-	5
H05_58	-	-	-	-	-	-	1	1	1	3
H06_58	-	-	-	-	-	-	3	1	-	4
H07_58	7	8	10	1	5	-	-	-	-	31
H08_58	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2
H09_58	1	-	2	-	-	-	-	-	-	3
H10_58	2	5	2	7	7	-	-	-	-	23
H11_58	1	1	1	-	-	-	-	-	-	3
H12_58	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H13_58	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5
H14_58	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H15_58	-	-	-	1	1	-	-	-	-	2
H16_58	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H17_58	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H18_58	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Total	16	14	16	15	16	17	18	15	15	142

หมายเหตุ : อักษรย่อคือจังหวัดที่เก็บตัวอย่างซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2558

Locality	Code	<i>N</i>	No. haplotypes	No. polymorphic sites	Haplotype diversity (<i>h</i>) (mean ± SD)	Nucleotide diversity (π) (mean ± SD)
Songkhla	SK	16	7	6	0.792±0.089	0.003±0.000
Nakhon Si Thammarat	NS	14	3	2	0.582±0.092	0.001±0.000
Surat Thanee	SR	16	5	3	0.608±0.130	0.002±0.000
Samut Songkram	SM	15	5	3	0.705±0.088	0.002±0.000
Chonburee	CH	16	6	5	0.742±0.084	0.002±0.000
Satun	ST	17	4	3	0.500±0.135	0.001±0.000
Trang	TG	18	5	4	0.614±0.117	0.001±0.000
Krabi	KB	15	4	3	0.543±0.133	0.001±0.000
Phang Nga	PN	15	2	1	0.133±0.112	0.000±0.000
Total		142	18	13	0.802±0.022	0.003± 0.000

4.1.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรเมื่อทำการวิเคราะห์แบบต่างๆตามสภาพภูมิศาสตร์ได้ผลดังนี้

การวิเคราะห์แบบที่ 1 แบ่งประชากรเป็น 9 กลุ่มประชากรตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง (single region) ได้แก่จังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดชลบุรี จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา พบว่า เกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมโดย มีค่า $\Phi_{ST} = 0.460$ ($p = 0.000$) ค่าความแปรปรวนภายในประชากรมีค่า 53.92 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

การวิเคราะห์แบบที่ 2 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทย ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดชลบุรี, กลุ่มทะเลอันดามันประกอบด้วยประชากรจาก จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา พบว่า เกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมโดย มีค่า $\Phi_{CT} = 0.547$ ($p = 0.008$), ค่าความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยมีค่า $\Phi_{SC} = 0.096$ ($p = 0.000$) และค่าความแตกต่างภายในประชากรมีค่า $\Phi_{ST} = 0.591$ ($p = 0.000$) ค่าความแปรปรวนภายในประชากรมีค่า 40.90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

การวิเคราะห์แบบที่ 3 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสามกลุ่มได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทยตอนล่าง ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสุราษฎร์ธานี , กลุ่ม

ทะเลอ่าวไทยตอนบนประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดชลบุรี , กลุ่มทะเลอันดามันประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา พบว่าเกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมโดย มีค่า $\Phi_{CT} = 0.525$ ($p=0.000$), ค่าความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยมีค่า $\Phi_{SC} = 0.031$ ($p=0.064$) และค่าความแตกต่างภายในประชากรมีค่า $\Phi_{ST} = 0.540$ ($p=0.000$) ค่าความแปรปรวนภายในประชากรมีค่า 45.93 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

การวิเคราะห์แบบที่ 4 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทยตอนล่าง ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสุราษฎร์ธานี , กลุ่มทะเลอันดามันประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา พบว่าเกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมโดย มีค่า $\Phi_{CT} = 0.605$ ($p=0.028$), ค่าความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยมีค่า $\Phi_{SC} = 0.023$ ($p=0.125$) และค่าความแตกต่างภายในประชากรมีค่า $\Phi_{ST} = 0.615$ ($p=0.000$) ค่าความแปรปรวนภายในประชากรมีค่า 38.48 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

การวิเคราะห์แบบที่ 5 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทยตอนบน ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดชลบุรี, กลุ่มทะเลอันดามันประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา พบว่า เกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมโดยมีค่า $\Phi_{CT} = 0.599$ ($p=0.038$), ค่าความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยมีค่า $\Phi_{SC} = 0.034$ ($p=0.054$) และค่าความแตกต่างภายในประชากรมีค่า $\Phi_{ST} = 0.613$ ($p=0.000$) ค่าความแปรปรวนภายในประชากรมีค่า 38.69 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

การวิเคราะห์แบบที่ 6 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทยตอนล่าง ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสุราษฎร์ธานี , กลุ่มทะเลอ่าวไทยตอนบนประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดชลบุรี พบว่า ไม่เกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมโดยมีค่า $\Phi_{CT} = 0.133$ ($p=0.098$), ค่าความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยมีค่า $\Phi_{SC} = 0.030$ ($p=0.094$) และค่าความแตกต่างภายในประชากรมีค่า $\Phi_{ST} = 0.167$ ($p=0.000$) ค่าความแปรปรวนภายในประชากรมีค่า 82.23 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

ผลการวิเคราะห์ค่า pairwise F_{ST} พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง ประชากร ในแต่ละจังหวัด ได้แก่จังหวัดสงขลา กับจังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา, จังหวัดนครศรีธรรมราชกับจังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา, จังหวัดสุราษฎร์ธานีกับจังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดชลบุรี จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา, จังหวัดสมุทรสงครามกับจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา, จังหวัดชลบุรีกับจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยวิธี AMOVA ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2558

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	p-value
1) Single region					
Among populations	8	48.772	0.359Va	46.08	$\Phi_{ST} = 0.460^*$ ($p=0.000$)
Within populations	133	56.024	0.421Vb	53.92	
Total	141	104.796	0.781		
2) Gulf of Thailand and Andaman sea					
Among groups	1	40.891	0.563Va	54.76	$\Phi_{CT} = 0.547^*$ ($p=0.008$)
Among populations within groups	7	7.881	0.044Vb	4.35	$\Phi_{SC} = 0.096^*$ ($p=0.000$)
Within populations	133	56.024	0.421Vc	40.90	$\Phi_{ST} = 0.591^*$ ($p=0.000$)
Total	141	104.796	1.029		
3) Lower Gulf of Thailand, upper Gulf of Thailand and Andaman sea					
Among groups	2	44.961	0.482Va	52.60	$\Phi_{CT} = 0.525^*$ ($p=0.000$)
Among populations within groups	6	3.811	0.013Vb	1.48	$\Phi_{SC} = 0.031$ ($p=0.064$)
Within populations	133	56.024	0.421Vc	45.93	$\Phi_{ST} = 0.540^*$ ($p=0.000$)
Total	141	104.796	0.917		
4) Lower Gulf of Thailand and Andaman sea					
Among groups	1	33.909	0.619Va	60.58	$\Phi_{CT} = 0.605^*$ ($p=0.028$)
Among populations within groups	5	2.729	0.009Vb	0.94	$\Phi_{SC} = 0.023$ ($p=0.125$)
Within populations	104	40.911	0.393Vc	38.48	$\Phi_{ST} = 0.615^*$ ($p=0.000$)
Total	110	77.550	1.022		
5) Upper Gulf of Thailand and Andaman sea					
Among groups	1	24.034	0.559Va	59.93	$\Phi_{CT} = 0.599^*$ ($p=0.038$)
Among populations within groups	4	2.268	0.012Vb	1.38	$\Phi_{SC} = 0.034$ ($p=0.054$)
Within populations	90	32.479	0.360Vc	38.69	$\Phi_{ST} = 0.613^*$ ($p=0.000$)
Total	95	58.781	0.932		
6) Lower and upper Gulf of Thailand					
Among groups	1	4.070	0.086Va	13.37	$\Phi_{CT} = 0.133$ ($p=0.098$)
Among populations within groups	3	2.623	0.021Vb	3.41	$\Phi_{SC} = 0.030$ ($p=0.094$)
Within populations	72	38.657	0.536Vc	83.23	$\Phi_{ST} = 0.167^*$ ($p=0.000$)
Total	76	45.351	0.645		

หมายเหตุ : * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 ค่า pairwise F_{ST} ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2558

	Gulf of Thailand					Andaman sea				
	SK	NS	SR	SM	CH	ST	TG	KB	PN	
SK	-									
Gulf of Thailand	NS	0.011 (0.289)	-							
	SR	0.042 (0.175)	0.016 (0.250)	-						
	SM	0.179* (0.001)	0.245* (0.004)	0.351* (0.000)	-					
	CH	0.046 (0.119)	0.011 (0.287)	0.143* (0.014)	0.064 (0.104)	-				
	ST	0.416* (0.000)	0.652* (0.000)	0.662* (0.000)	0.574* (0.000)	0.559* (0.000)	-			
Andaman sea	TG	0.421* (0.000)	0.655* (0.000)	0.655* (0.000)	0.577* (0.000)	0.561* (0.000)	0.022 (0.243)	-		
	KB	0.422* (0.000)	0.676* (0.000)	0.678* (0.000)	0.591* (0.000)	0.572* (0.000)	-0.008 (0.444)	0.003 (0.392)	-	
	PN	0.496* (0.000)	0.796* (0.000)	0.746* (0.000)	0.668* (0.000)	0.639* (0.000)	0.069 (0.099)	0.032 (0.195)	0.050 (0.223)	-

หมายเหตุ : * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

อักษรย่อคือจังหวัดที่เก็บตัวอย่างซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 2

ค่าในวงเล็บคือค่า p -value

4.1.3 ประวัติประชากร

จากการทดสอบการเบี่ยงเบนไปจาก neutral population พบว่าค่า D statistic มีค่า -0.962 ($p=0.036$) และค่า F_s statistic มีค่า -9.550 ($p=0.001$) ซึ่งเบี่ยงเบนไปจาก neutral population สำหรับการทดสอบ mismatch distribution พบว่าสอดคล้องกับ sudden expansion model โดยค่า SSD มีค่า 0.006 ($p=0.059$) และค่า Harpending Raggedness index มีค่า 0.063 ($p=0.116$) ค่าพารามิเตอร์ θ , มีค่า 99999.000 และค่าพารามิเตอร์ θ_0 , มีค่า 0.000 (ตารางที่ 5) เมื่อคำนวณระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรพบว่าประชากรมีการขยายขนาดมาประมาณ $190,000 - 390,000$ ปีที่ผ่านมา

ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากร ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2558

Locality	Tajima's <i>D</i>	Fu' s <i>F_s</i>	τ^a	θ_0^b	θ_1^c	<i>SSD</i> ^d	Rag
SK	-0.331 (0.403)	-2.356* (0.045)	1.837	0.000	16.235	0.007 (0.576)	0.053 (0.712)
NS	0.178 (0.648)	0.055 (0.374)	0.843	0.000	99999.000	0.021 (0.197)	0.178 (0.211)
SR	0.067 (0.579)	-1.625 (0.051)	0.933	0.000	99999.000	0.001 (0.876)	0.062 (0.834)
SM	0.157 (0.606)	-1.598 (0.055)	1.101	0.000	99999.000	0.017 (0.291)	0.152 (0.278)
CH	-0.576 (0.316)	-2.360* (0.025)	1.210	0.000	99999.000	0.011 (0.406)	0.126 (0.295)
ST	-0.438 (0.361)	-0.827 (0.167)	1.404	0.000	11.247	0.003 (0.808)	0.083 (0.852)
TG	-1.128 (0.145)	-2.095 (0.017)	0.912	0.000	99999.000	0.022 (0.114)	0.179 (0.140)
KB	-1.009 (0.179)	-1.419 (0.060)	0.765	0.000	99999.000	0.019 (0.262)	0.172 (0.339)
PN	-1.159 (0.151)	-0.648 (0.104)	2.982	0.112	12.045	0.037 (0.094)	0.555 (0.388)
Total	-0.962* (0.036)	-9.550* (0.001)	1.634	0.000	99999.000	0.006* (0.029)	0.063 (0.116)

หมายเหตุ : * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

อักษรย่อคือจังหวัดที่เก็บตัวอย่างซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 2

ค่าในวงเล็บคือค่า p -value

4.2 ผลการศึกษาในปี พ.ศ. 2560

4.2.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit I ของปลาทรายแดงมีลำดับเบส 419 คู่เบส มีตำแหน่ง align sites 419 ตำแหน่ง แบ่งเป็น monomorphic sites 381 ตำแหน่ง polymorphic sites 38 ตำแหน่ง (singleton variable site 25 ตำแหน่ง และ parsimony variable site 13 ตำแหน่ง) มีแฮพลไทป์ทั้งหมด 42 แฮพลไทป์ ประกอบไปด้วยแฮพลไทป์ที่เป็น shared haplotype จำนวน 13 แฮพลไทป์โดยแบ่งเป็นแฮพลไทป์ที่เป็น shared haplotype ระหว่างประชากร 11 แฮพลไทป์และ shared haplotype ภายในประชากร 2 แฮพลไทป์ โดยแฮพลไทป์ H18_60, และ H21_60 เป็นแฮพลไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกจังหวัดในฝั่งทะเลอ่าวไทย และแฮพลไทป์ H02_60 เป็นแฮพลไทป์ที่มีสมาชิกจากทุกจังหวัดในฝั่งทะเลอันดามัน (ตารางที่ 6) พบ rare haplotype ในทุกจังหวัด รวมจำนวน 29 แฮพลไทป์ โดย จังหวัด ชลบุรี มี rare haplotype มากที่สุดคือ 6 แฮพลไทป์, จังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดชลบุรี จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา มี rare haplotype จำนวน 3 แฮพลไทป์ และจังหวัดสตูล มี rare haplotype จำนวน 3 แฮพลไทป์ สำหรับค่า haplotype diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.368 – 0.852 ส่วนค่า nucleotide diversity มีค่าอยู่ในช่วง 0.001 – 0.004 โดยค่า haplotype diversity ของประชากรทั้งหมดมีค่า 0.848 ± 0.022 และค่า nucleotide diversity ของประชากรทั้งหมดมีค่า 0.004 ± 0.000 สำหรับค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมได้แก่ จำนวนแฮพลไทป์, จำนวน polymorphic sites, haplotype diversity (h) และ nucleotide diversity (π) แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 การกระจายของแฮโลไทป์ในแต่ละจังหวัดที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2560 (ต่อ)

Haplotype	SK	NS	SR	SM	CH	ST	TG	KB	PN	Total
H29_60	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
H30_60	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
H31_60	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
H32_60	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5
H33_60	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H34_60	-	-	-	1	1	-	-	-	-	2
H35_60	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H36_60	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H37_60	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H38_60	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H39_60	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H40_60	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H41_60	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H42_60	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Total	21	17	20	20	19	19	21	20	20	177

หมายเหตุ : อักษรย่อคือจังหวัดที่เก็บตัวอย่างซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2560

Locality	Code	N	No. haplotypes	No. polymorphic sites	Haplotype diversity (h) (mean \pm SD)	Nucleotide diversity (π) (mean \pm SD)
Songkhla	SK	21	9	9	0.852 \pm 0.055	0.004 \pm 0.000
Nakhon Si Thammarat	NS	17	6	5	0.735 \pm 0.077	0.002 \pm 0.000
Surat Thanee	SR	20	8	6	0.700 \pm 0.109	0.002 \pm 0.000
Samut Songkram	SM	20	7	5	0.711 \pm 0.089	0.002 \pm 0.000
Chonburee	CH	19	9	8	0.819 \pm 0.069	0.003 \pm 0.000
Satun	ST	19	6	5	0.602 \pm 0.124	0.002 \pm 0.000
Trang	TG	21	8	7	0.719 \pm 0.099	0.001 \pm 0.000
Krabi	KB	20	7	6	0.637 \pm 0.116	0.001 \pm 0.000
Phang Nga	PN	20	5	4	0.368 \pm 0.135	0.001 \pm 0.000
Total		177	42	38	0.848\pm0.018	0.004\pm0.000

4.2.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรเมื่อทำการวิเคราะห์แบบต่างๆตามสภาพภูมิศาสตร์ได้ผลดังนี้

การวิเคราะห์แบบที่ 1 แบ่งประชากรเป็น 9 กลุ่มประชากรตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง (single region) ได้แก่จังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัด สมุทรสงคราม จังหวัดชลบุรี จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา พบว่า เกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมโดย มีค่า $\Phi_{ST} = 0.390$ ($p = 0.000$) ค่าความแปรปรวนภายในประชากรมีค่า 60.91 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

การวิเคราะห์แบบที่ 2 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทย ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสงขลา จังหวัด นครศรีธรรมราช จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัด สมุทรสงคราม และจังหวัดชลบุรี, กลุ่มทะเลอันดามันประกอบด้วยประชากรจาก จังหวัดสตูล จังหวัด ตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา พบว่า เกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมโดย มีค่า $\Phi_{CT} = 0.474$ ($p = 0.007$), ค่าความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยมีค่า $\Phi_{SC} = 0.084$ ($p = 0.000$) และค่าความแตกต่างภายในประชากรมีค่า $\Phi_{ST} = 0.518$ ($p = 0.000$) ค่าความแปรปรวนภายในประชากรมีค่า 48.13 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

การวิเคราะห์แบบที่ 3 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสามกลุ่มได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทยตอนล่าง ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสุราษฎร์ธานี , กลุ่มทะเลอ่าวไทยตอนบนประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดชลบุรี , กลุ่มทะเลอันดามันประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา พบว่า เกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมโดย มีค่า $\Phi_{CT} = 0.441$ ($p = 0.000$), ค่าความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยมีค่า $\Phi_{SC} = 0.044$ ($p = 0.003$) และค่าความแตกต่างภายในประชากรมีค่า $\Phi_{ST} = 0.466$ ($p = 0.000$) ค่าความแปรปรวนภายในประชากรมีค่า 53.39 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

การวิเคราะห์แบบที่ 4 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทยตอนล่าง ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสุราษฎร์ธานี , กลุ่มทะเลอันดามันประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา พบว่าเกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมโดย มีค่า $\Phi_{CT} = 0.507$ ($p = 0.030$), ค่าความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยมีค่า $\Phi_{SC} = 0.042$ ($p = 0.008$) และค่าความแตกต่างภายในประชากรมีค่า $\Phi_{ST} = 0.528$ ($p = 0.000$) ค่าความแปรปรวนภายในประชากรมีค่า 47.12 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

การวิเคราะห์แบบที่ 5 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทยตอนบน ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดชลบุรี, กลุ่มทะเลอันดามันประกอบด้วย ประชากรจากจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา พบว่า เกิดโครงสร้างทาง

พันธุกรรมโดยมีค่า $\Phi_{CT} = 0.536$ ($p=0.045$), ค่าความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยมีค่า $\Phi_{SC} = 0.028$ ($p=0.022$) และค่าความแตกต่างภายในประชากรมีค่า $\Phi_{ST} = 0.549$ ($p=0.000$) ค่าความแปรปรวนภายในประชากรมีค่า 45.07 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

การวิเคราะห์แบบที่ 6 แบ่งกลุ่มประชากรเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทะเลอ่าวไทยตอนล่าง ประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสงขลา จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสุราษฎร์ธานี , กลุ่มทะเลอ่าวไทยตอนบนประกอบด้วยประชากรจากจังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดชลบุรี พบว่า ไม่เกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมโดยมีค่า $\Phi_{CT} = 0.080$ ($p=0.100$), ค่าความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยมีค่า $\Phi_{SC} = 0.064$ ($p=0.005$) และค่าความแตกต่างภายในประชากรมีค่า $\Phi_{ST} = 0.139$ ($p=0.000$) ค่าความแปรปรวนภายในประชากรมีค่า 86.07 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

ผลการวิเคราะห์ค่า pairwise F_{ST} พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง ประชากร ในแต่ละจังหวัด ได้แก่จังหวัดสงขลา กับจังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดชลบุรี จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา, จังหวัดนครศรีธรรมราชกับจังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา, จังหวัดสุราษฎร์ธานีกับจังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดชลบุรี จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา , จังหวัดสมุทรสงครามกับจังหวัดชลบุรี จังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา , จังหวัดชลบุรีกับจังหวัดสตูล จังหวัดตรัง จังหวัดกระบี่ และจังหวัดพังงา, จังหวัดสตูลกับจังหวัดพังงา (ตารางที่ 9)



ตารางที่ 8 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยวิธี AMOVA ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2560

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	p-value
1) Single region					
Among populations	8	58.624	0.345Va	39.09	$\Phi_{ST} = 0.390^*$ ($p=0.000$)
Within populations	168	90.404	0.538Vb	60.91	
Total	176	179.028	0.883		
2) Gulf of Thailand and Andaman sea					
Among groups	1	48.019	0.530Va	47.43	$\Phi_{CT} = 0.474^*$ ($p=0.007$)
Among populations within groups	7	10.605	0.049Vb	4.45	$\Phi_{SC} = 0.084^*$ ($p=0.000$)
Within populations	168	90.404	0.538Vc	48.13	$\Phi_{ST} = 0.518^*$ ($p=0.000$)
Total	176	149.028	1.007		
3) Lower Gulf of Thailand, upper Gulf of Thailand and Andaman sea					
Among groups	2	52.421	0.444Va	44.11	$\Phi_{CT} = 0.441^*$ ($p=0.000$)
Among populations within groups	6	6.203	0.025Vb	2.50	$\Phi_{SC} = 0.044^*$ ($p=0.003$)
Within populations	168	90.404	0.538Vc	53.39	$\Phi_{ST} = 0.466^*$ ($p=0.000$)
Total	176	149.028	1.007		
4) Lower Gulf of Thailand and Andaman sea					
Among groups	1	38.884	0.563Va	50.78	$\Phi_{CT} = 0.507^*$ ($p=0.030$)
Among populations within groups	5	4.918	0.023Vb	2.11	$\Phi_{SC} = 0.042^*$ ($p=0.008$)
Within populations	131	68.510	0.522Vc	47.12	$\Phi_{ST} = 0.528^*$ ($p=0.000$)
Total	137	111.312	1.109		
5) Upper Gulf of Thailand and Andaman sea					
Among groups	1	29.291	0.544Va	53.62	$\Phi_{CT} = 0.536^*$ ($p=0.045$)
Among populations within groups	4	2.892	0.013Vb	1.31	$\Phi_{SC} = 0.028^*$ ($p=0.022$)
Within populations	113	51.749	0.457Vc	45.07	$\Phi_{ST} = 0.549^*$ ($p=0.000$)
Total	118	83.933	1.016		
6) Lower and upper Gulf of Thailand					
Among groups	1	4.4010	0.061Va	8.02	$\Phi_{CT} = 0.080$ ($p=0.100$)
Among populations within groups	3	4.596	0.045Vb	5.91	$\Phi_{SC} = 0.064^*$ ($p=0.005$)
Within populations	92	60.549	0.658Vc	86.07	$\Phi_{ST} = 0.139^*$ ($p=0.000$)
Total	96	69.546	0.746		

หมายเหตุ : * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 9 ค่า pairwise F_{ST} ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2560

	Gulf of Thailand						Andaman sea			
	SK	NS	SR	SM	CH	ST	TG	KB	PN	
SK	-									
Gulf of Thailand	NS	0.046 (0.081)	-							
	SR	0.099* (0.012)	0.027 (0.152)	-						
	SM	0.134* (0.000)	0.184* (0.001)	0.317* (0.009)	-					
	CH	0.050* (0.043)	0.001 (0.318)	0.115* (0.000)	0.056* (0.049)	-				
	ST	0.318* (0.000)	0.578* (0.000)	0.614* (0.000)	0.531* (0.000)	0.511* (0.000)	-			
Andaman sea	TG	0.319* (0.000)	0.565* (0.000)	0.603* (0.000)	0.519* (0.000)	0.502* (0.000)	0.013 (0.263)	-		
	KB	0.324* (0.000)	0.582* (0.000)	0.617* (0.000)	0.534* (0.000)	0.514* (0.000)	0.003 (0.326)	0.001 (0.408)	-	
	PN	0.355* (0.000)	0.652* (0.000)	0.673* (0.000)	0.596* (0.000)	0.571* (0.000)	0.044* (0.015)	0.031 (0.051)	0.024 (0.170)	-

หมายเหตุ : * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

อักษรย่อคือจังหวัดที่เก็บตัวอย่างซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 2

ค่าในวงเล็บคือค่า p -value

4.2.3 ประวัติประชากร

จากการทดสอบการเบี่ยงเบนไปจาก neutral population พบว่าค่า D statistic มีค่า -2.183 ($p=0.000$) และค่า F_s statistic มีค่า -27.759 ($p=0.000$) ซึ่งเบี่ยงเบนไปจาก neutral population สำหรับการทดสอบ mismatch distribution พบว่าสอดคล้องกับ sudden expansion model โดยค่า SSD มีค่า 0.003 ($p=0.059$) และค่า Harpending Raggedness index มีค่า 0.060 ($p=0.070$) ค่าพารามิเตอร์ θ , มีค่า 99999.000 และค่าพารามิเตอร์ θ_0 มีค่า 0.000 (ตารางที่ 10) เมื่อคำนวณระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรพบว่าประชากรมีการขยายขนาดมาประมาณ $190,000 - 390,000$ ปีที่ผ่านมา

ตารางที่ 10 ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากร ของปลาทรายแดงที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2560

Locality	Tajima's <i>D</i>	Fu' s <i>F_s</i>	τ^a	θ_0^b	θ_1^c	<i>SSD</i> ^d	Rag
SK	-0.693* (0.027)	-3.174* (0.026)	1.873	0.000	17.004	0.015 (0.183)	0.085 (0.250)
NS	-1.044* (0.018)	-2.557* (0.009)	1.173	0.000	99999.000	0.022 (0.167)	0.165 (0.115)
SR	-1.054* (0.016)	-4.462* (0.000)	1.175	0.010	99999.000	0.008 (0.913)	0.057 (0.699)
SM	-0.774* (0.025)	-3.353 (0.004)	1.167	0.000	99999.000	0.006 (0.531)	0.098 (0.385)
CH	-1.445* (0.045)	-3.434* (0.000)	1.451	0.000	99999.000	0.014 (0.276)	0.128 (0.185)
ST	-1.777* (0.008)	-2.720* (0.009)	0.976	0.000	99999.000	0.004 (0.888)	0.053 (0.869)
TG	-1.591* (0.044)	-4.922* (0.000)	1.144	0.000	99999.000	0.017 (0.183)	0.146 (0.133)
KB	-1.570* (0.043)	-4.143* (0.000)	0.968	0.000	99999.000	0.007 (0.398)	0.107 (0.382)
PN	-1.867* (0.011)	-3.654* (0.000)	0.472	0.000	99999.000	0.003 (0.627)	0.181 (0.501)
Total	-2.183* (0.000)	-27.759* (0.000)	1.806	0.000	99999.000	0.003 (0.059)	0.060 (0.070)

หมายเหตุ : * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

อักษรย่อคือจังหวัดที่เก็บตัวอย่างซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 2

ค่าในวงเล็บคือค่า p -value

บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

5.1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากผลการวิจัยในปี พ.ศ. 2558 พบแฮปโลไทป์จำนวน 18 แฮปโลไทป์ และเพิ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2560 เป็น 42 แฮปโลไทป์ แสดงว่าประชากรปลาทรายแดงในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้น อีกทั้งพบว่าในปี พ.ศ. 2560 มีจำนวน rare haplotype เพิ่มขึ้นทุกจังหวัด และเป็นแฮปโลไทป์เฉพาะของแต่ละจังหวัดซึ่งแสดงว่าปลาทรายแดงในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเพิ่มสูงขึ้นกว่าปี พ.ศ. 2558 และจากการที่มีจำนวนของ rare haplotype จำนวนมากในประชากรแสดงว่าประชากรปลาทรายแดงในประเทศไทยมีเพศเมียที่มีความสามารถในการขยายพันธุ์เป็นจำนวนมากจึงทำให้มีจำนวนแฮปโลไทป์ที่มีความแตกต่างกัน เป็นจำนวนมาก (Lewontin, 1974) สอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปูแสมก้ามม่วง (*E. mederi*) ในอ่าวไทย (Supmee *et al.*, 2012a) ที่พบว่ามีจำนวน rare haplotype เป็นจำนวนมาก เช่นเดียวกับปูแสมก้ามขาว (*E. versicolor*) ในทะเลอันดามัน (Supmee *et al.*, 2012b) และการที่ทุกกลุ่มประชากรในแต่ละจังหวัดมี rare haplotype เฉพาะท้องถิ่นนั้นสามารถใช้ ระบุแหล่งที่มาของสายพันธุ์หรือแหล่งทางพันธุกรรม (genetic stock) ของปลาทรายแดง ได้เนื่องจากจะมีความจำเพาะเจาะจงกับแหล่งที่อยู่ (Xu *et al.*, 2009) สำหรับค่า haplotype diversity, nucleotide diversity และค่า polymorphic site พบว่าในปี พ.ศ. 2560 มีค่าสูงกว่าในปี พ.ศ. 2558 ในทุกจังหวัดและในประชากรรวม แสดงว่าประชากรปลาทรายแดงในประเทศไทยกำลังมีการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม สำหรับค่า haplotype diversity ที่มีค่าสูง ในขณะที่ค่า nucleotide diversity มีค่าต่ำ แสดงว่าประชากรกำลังมีการขยายขนาด (population expansion) โดยสาเหตุเกิดจากการที่ประชากรกำลังเริ่มมีการกลายพันธุ์เรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่ผ่านมา (Avice *et al.*, 1984) ซึ่งลักษณะแบบนี้สามารถพบได้ในสัตว์ทะเลที่อาศัยบริเวณชายฝั่งทะเล เช่น กุ้ง fleshy shrimp (Kong *et al.*, 2010) และปูก้ามดาบ (*Uca sindensis*) (Shih *et al.*, 2015) เป็นต้น

ผลการศึกษาครั้งนี้จะแสดงว่าการปฏิรูปการประมงโดยการออกพระราชบัญญัติการประมงปี พ.ศ. 2558 ส่งผลให้มีการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทรายแดงในประเทศไทยเพิ่มขึ้น และยังส่งผลให้มีแนวโน้มในการขยายขนาดประชากรในอนาคต

5.2 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากผลการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยวิธี AMOVA พบว่าทั้งในปี พ.ศ. 2558 และปี พ.ศ. 2560 ประชากรปลาทรายแดงในประเทศไทยมีผลความแตกต่างทางพันธุกรรม เหมือนกัน โดยประชากรจากจังหวัดในทะเลอันดามันมีความแตกต่างกับประชากรในอ่าวไทย แสดงว่าปัจจัยทางภูมิศาสตร์ของภาคใต้ระหว่างทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามันที่ถูกแบ่งแยกด้วยคาบสมุทรมลายู มีผลในการขัดขวางการผสมพันธุ์ระหว่างประชากรซึ่งเป็นการขัดขวางการแลกเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างประชากรทั้งสองฝั่งทะเล ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรสัตว์น้ำในทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามันสามารถพบได้ เช่น ใน กุ้ง shovel-nosed lobster (*Thenus indicus*) (Iamsuwansuk and Denduangboripant, 2011), หอย Asian moon scallop (*Amusium pleuronectes*) (Mahidol et al., 2007) และ ม้าน้ำ spotted seahorse (*Hippocampus kuda*) (Panithanarak et al., 2010) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในอ่าวไทยโดยแบ่งประชากรออกเป็นสองกลุ่มจากรวมประชากร ของทุกจังหวัดในอ่าวไทยตอนล่างและจังหวัดในอ่าวไทยตอนบนเข้าด้วยกันพบว่าไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งน่าจะเกิดจากตำแหน่งที่ตั้งของถิ่นอาศัยยังอยู่ในเขตทะเลเดียวกันจึงทำให้ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเกิดขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปูแสมก้ามม่วง (*E. mederi*) ในอ่าวไทย (Supmee et al., 2012a) ที่พบว่าไม่มีความแตกต่างของโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรระหว่างอ่าวไทยตอนล่างและอ่าวไทยตอนบนเช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในทะเลอันดามันกับอ่าวไทยตอนล่างพบว่ามีความแตกต่างกัน ซึ่งคาดว่าน่าจะมีการขัดขวาง การแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมกันระหว่างประชากรทั้งสองฝั่งทะเลโดยคาบสมุทรมลายู เมื่อเมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในทะเลอันดามันกับอ่าวไทยตอนบนซึ่งมีระยะทางที่ไกลกว่าอ่าวไทยตอนล่าง พบว่ามีความแตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปัจจัยจากระยะทางที่อยู่ห่างกันมากน่าจะส่งผลในการขัดขวางการผสมพันธุ์ระหว่างประชากรซึ่งจะเป็นการขัดขวางการแลกเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างประชากรด้วย ซึ่งเป็นการยืนยันว่าปัจจัยจากระยะทางและภูมิศาสตร์น่าจะส่งผลต่อความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาทรายแดงในประเทศไทย

สำหรับผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยวิธี pairwise F_{ST} พบว่าทั้งในปี พ.ศ. 2558 และปี พ.ศ. 2560 ประชากรปลาทรายแดงจาก ทะเลอ่าวไทย มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง ประชากรจาก ทะเลอันดามัน เช่นเดียวกับวิธี AMOVA ซึ่งเป็นการยืนยันว่า ปัจจัยทางภูมิศาสตร์ของภาคใต้ระหว่างทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามันที่ถูกแบ่งแยกด้วยคาบสมุทรมลายู

ผลการศึกษานี้ น่าจะแสดงว่าปัจจัยจากการเกิดปรากฏการณ์คอขวดจากการประมงเกินขนาดมาเป็นเวลานานยังไม่ส่งผลกระทบต่อ การเกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลาทรายแดงในประเทศไทย ซึ่งอาจเป็นเพราะปลาทรายแดงมีการผสมพันธุ์โดยการปฏิสนธิภายนอก (external fertilization) และมีการกระจายของตัวอ่อนจำนวนมาก ดังนั้นการประมงปลาทรายแดงในปริมาณมากจึงยังไม่ถึงระดับที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

5.3. ประวัติประชากร

จากผลการศึกษาประวัติประชากร พบว่าทั้งในปี พ.ศ. 2558 และปีพ.ศ. 2560 ประชากรปลาทรายแดงในประเทศไทยมีกำลังมีการขยายขนาดประชากร สอดคล้องกับการทดสอบตามวิธีการดังนี้ 1) การทดสอบ neutrality test พบว่าค่า Tajima's D มีค่าเบี่ยงเบนไปจาก neutral state โดยมีค่าติดลบแสดงว่าประชากรน่าจะมีการคัดเลือกแบบ purifying selection หรืออาจเกิดการขยายขนาดของประชากรมาก่อน (Yang, 2006) อีกทั้งพบว่าค่า Fu's F_s ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการขยายขนาดของประชากร (Ramirez-Soriano *et al.*, 2008) มีค่าติดลบด้วยเช่นกันจึงเป็นการยืนยันว่าประชากรปูแป้นน่าจะเคยมีการขยายขนาดประชากรมาก่อน 2) ผลการทดสอบด้วยการวิเคราะห์วิธี mismatch distribution ที่สอดคล้องกับสมมติฐาน sudden expansion model และยังสอดคล้องกับค่า θ , ซึ่งมีค่ามากกว่า θ_0 ในทุกกลุ่มประชากร แสดงว่าประชากรกำลังมีการขยายขนาดประชากรจากขนาดเล็กสู่ขนาดใหญ่ เมื่อนำค่าพารามิเตอร์ τ มาคำนวณระยะเวลาในการขยายขนาดประชากรพบว่าทั้งในปี พ.ศ. 2558 และปีพ.ศ. 2560 มีผลการคำนวณการขยายขนาดประชากรเหมือนกัน คือขยายขนาดประชากรเมื่อประมาณ 190,000 – 390,000 ปีที่ผ่านมาสอดคล้องกับรายงานของ Sinsakul (2000) ที่รายงานว่าชายฝั่งทะเลในประเทศไทยเริ่มกำเนิดในยุคไพลสโตซีน (Pleistocene) ประมาณ 250,000 ปีที่ผ่านมาโดยในช่วงนี้ระดับน้ำทะเลจะท่วมสูงเนื่องมาจากการละลายของน้ำแข็งจากขั้วโลกหลังจากนั้นระดับน้ำทะเลจะเริ่มลดระดับลงเรื่อยๆจนเข้าสู่ยุคโฮโลซีน (Holocene) ประมาณ 10,000 ปีที่ผ่านมา ซึ่งในช่วงนี้เริ่มมีการทับถมของตะกอนเกิดขึ้นเป็นพื้นที่ชายฝั่งและกลายเป็นแหล่งที่อยู่ของปลาทรายแดง ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าประชากรปลาทรายแดงในประเทศไทยน่าจะมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของแหล่งที่อยู่

5.4. แนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

5.4.1 การอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในแหล่งน้ำธรรมชาติ

การปล่อยพันธุ์สัตว์น้ำลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติที่มีประชากรชนิดนั้นอาศัยอยู่ 'อาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรธรรมชาติได้ โดยจะเกิดการแข่งขันกันในระบบนิเวศระหว่างสัตว์น้ำในธรรมชาติและสัตว์น้ำที่ทำการปล่อย นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อโดยตรงต่อพันธุกรรม เช่น อาจเกิดการแยกกลุ่มย่อยทางพันธุกรรม หรือการเกิดการผสมข้ามระหว่างประชากร ซึ่งการจัดการทางการประมงในปัจจุบันนี้มักจะไม่ได้ให้ความสำคัญต่อกรณีดังกล่าว ดังนั้นในกรณีที่ต้องการปล่อยสัตว์น้ำลงสู่ธรรมชาติควรทำในลักษณะบำรุงพันธุ์และรักษาพันธุกรรมดั้งเดิมซึ่งทำได้ โดยใช้พันธุ์ท้องถิ่นที่มีอยู่ในธรรมชาติปล่อยลงสู่แหล่งน้ำและต้องมีการตรวจสอบค่าทางพันธุกรรม ต่าง ๆ เช่น ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความถี่ของแอลลีลในประชากร (Alendorf, 1986)

จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่ามีความแตกต่างของโครงสร้างพันธุศาสตร์ ประชากร ของปลาทรายแดงในประเทศไทยแสดงให้เห็นว่าประชากรในแต่ละจังหวัดมีรูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่างกัันดังนั้นแนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถทำได้โดยใช้แม่พันธุ์ของในจังหวัดนั้นๆ ปล่อยลงสู่ธรรมชาติเพื่อขยายพันธุ์ภายในประชากรเดียวกัน เพื่อคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมเอาไว้ และจากผลการทดลองที่พบว่าประชากรปลาทรายแดงกำลังมีการขยายขนาดประชากรอยู่นั้นวิธีที่สามารถจัดการคือ การรักษากลุ่มที่อยู่ตามธรรมชาติเอาไว้โดยการไม่ทำลายแหล่งที่อยู่หรืออาจจัดการโดยการงดจับปลาตัวเมียที่กำลังวางไข่เนื่องจากเป็นการขัดขวางการขยายขนาดประชากร และงดการใช้เครื่องมือทำลายล้างที่มีความรุนแรง รวมถึงการบังคับใช้กฎหมายอย่างเคร่งครัดต่อไป

5.4.2 การจัดการประชากรในระบบการเลี้ยง

การลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรมอาจส่งผลกระทบต่อความอยู่รอดของประชากรโดยเฉพาะประชากรในระบบการเลี้ยง (Frankham *et al.*, 2002) โดยตามปกติทั่วไปนั้นการเพาะเลี้ยงหรือการปรับปรุงพันธุ์จะทำให้องค์ประกอบพันธุกรรมของประชากรพื้นฐาน (base population) มีการลดลงทุกครั้งที่มีการเพาะพันธุ์แต่ละรุ่น (พนม และคณะ , 2555) ซึ่ง การลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรมมาจากการใช้ประชากรเริ่มต้นจำนวนน้อยและได้มาจากประชากรเดียวกันมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ส่งผลกระทบต่อประชากรรุ่นต่อมาที่เกิดใน ระบบ เพาะเลี้ยงโดยก่อให้เกิดความผิดปกติเนื่องจากการผสมภายในเครือญาติ (inbreeding depression) ซึ่งเป็นผลของปรากฏการณ์คอขวดอย่างรุนแรง ซึ่งการจัดการประชากรสัตว์น้ำในระบบเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ต้องมีขนาดประชากรที่ขนาดใหญ่เพียงพอที่จะ ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบจาก เจเนติกส์ดริฟท์ นอกจากนี้

ประชากรต้องมีการผสมพันธุ์แบบสุ่มเพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม และมี อัตราส่วนระหว่างเพศในอัตราส่วนที่เท่ากันเพื่อรักษา effective population sizes ในแต่ละรุ่นให้มากที่สุด

จากการศึกษาในครั้งนี้แนะนำว่าการจัดการปลาทรายแดงในระบบเพาะเลี้ยงหรือเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ต้องเริ่มจากพ่อแม่พันธุ์ที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงพอสมควร โดยพนมและคณะ (2548) ระบุว่าปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรเริ่มต้นอย่างน้อยที่สุดไม่ควรต่ำกว่าหรืออยู่ในระดับเดียวกันเมื่อเทียบกับประชากรที่อยู่ในธรรมชาติ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปูแป้นในประเทศไทยมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์ของประชากรในระบบเพาะเลี้ยงจึงควรสร้างประชากรพ่อแม่พันธุ์ที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับในธรรมชาติโดยอาจมีการผสมระหว่างประชากรหรือนำประชากรจากธรรมชาติเข้ามาผสมเพื่อให้ได้ประชากรพ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพทางพันธุกรรมที่สมบูรณ์และมีศักยภาพที่ยั่งยืนในการเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ดี และจากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าปลาทรายแดงจาก จังหวัด ชลบุรี จังหวัดสงขลา และจังหวัดตรังมี ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีจำนวน rare haplotype มากที่สุด

เหมาะสมสำหรับการนำพ่อแม่พันธุ์มาใช้ในการสร้างโปรแกรมเพื่อคัดเลือกพันธุ์สำหรับการเพาะเลี้ยงหรือใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เนื่องจากมีโอกาสที่จะคัดเลือกแฮปโลไทป์ที่เหมาะสมเพื่อนำมาปรับปรุงพันธุ์ได้และยังคงรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระบบการเลี้ยงได้มากที่สุด

5.5 สรุปผลการวิจัย

1. การบังคับใช้กฎหมายตามพระราชบัญญัติประมง พ.ศ. 2558 เป็นระยะเวลาประมาณหนึ่งปีส่งผลให้ประชากรปลาทรายแดงในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้น
2. การเกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปลาทรายแดงในประเทศไทยเป็นผลมาจากปัจจัยจากการขัดขวางการเกิดการถ่ายเทยีนจากสภาพภูมิประเทศที่มีแหลมมลายูขวางกั้นซึ่งไม่ได้เกิดจากการเกิดปรากฏการณ์คอขวดจากการทำประมงผิดกฎหมายมาเป็นเวลานาน
3. ประชากรปลาทรายแดงในประเทศไทยกำลังมีการขยายขนาดประชากร

เอกสารอ้างอิง

- เกศินี รักรวิชัย.2520.ชีวประวัติบางประการของปลาทรายแดง *Nemipterus hexodon* ในอ่าวไทย. รายงานงานปลาหน้าดิน เล่มที่ 1/2520. กองประมงทะเล กรมประมง.
- กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง .2555.สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ.2553. เอกสารฉบับที่ 12 / 2555. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ .
- จักรี ทองเรือง. 2544. ชูริมิ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข สุภาพ ไพโรพนาพงศ์ นิพนธ์ เสนอินทร์ ศรีรัตน์ สอดศุข และ พลชาติ ผิวณธร. 2555. การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในประชากรปลากะพงขาวจากแหล่งเพาะพันธุ์ . Thai Journal of Genetics. 5 (22) : 166-182.
- วันศุกร์ เสนานานู และจิราภรณ์ ไตรศักดิ์. 2551. การประยุกต์ใช้พันธุศาสตร์ประชากรในการจัดการทรัพยากรประมง. พันธุศาสตร์ประชากรเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และกองทุนสนับสนุนการทำวิจัย. กรุงเทพฯ.
- สมโภชน์ อัครคทวีรัตน์. 2547. คู่มือประชาชนการจำแนกชนิดสัตว์น้ำที่เป็นอาหารปลอดภัย (Food Safety). สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง , สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง
- อุดม ปาเตีย และวีระ บุญรักษ์.2522. งานรวบรวมข้อมูลสถิติชีวะของปลาทรายแดง-ทรายขาว. รายงานปลาหน้าดิน. สถานีประมงจังหวัดภูเก็ต กองประมงทะเล กรมประมง.
- Alendorf, F.W. 1986. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. Zoo. Biol. 5 : 181-190.
- An. H.S., J. W. Lee., S.W. Hong. and J. I. Myeong . 2013. Population genetic structure of the Korean threadsail filefish (*Stephanolepis cirrhifer*) based on microsatellite marker analysis. Biochemical Systematics and Ecology 50 : 397-405.
- Antoro, S., Na-Nakorn, U., Koedprang, W. 2006. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* from Thailand and Indonesia using microsatellite markers. Mar. Biotechnol. 8: 17-26.
- Avise, J.C., Neigel, J.E. and Arnold, J. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. J Mo. Evol . 20 : 99-105.

- Avise, J.C., G.S. Helfman, N.C. Saunders and L.S. Hales. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 4350-4354.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution.* Chapman and Hall, New York.
- Ayala, F.J. 1982. *Population and Evolutionary Genetics: A Primer.* The Benjamin Cummings Pub. Co. Inc, California.
- Bernal-Ramirez, J.H., Adcock, G.J., Hauser, L., Carvalho, G.R. and Smith, P.J. 2003. Temporal stability of genetic population structure in the New Zealand snapper, *Pagrus auratus*, and relationship to coastal currents. *Mar. Biol.* 142: 567-574.
- Boore, J. L. 1999. Survey and summary animal mitochondria genome. *Nucleic acids research.* 27(8) : 1767-1780.
- Borsa, P., I. S. Arlyza., M. Laporte . and P. Berrebi . 2012. Population genetic structure of blue-spotted maskray *Neotrygon kuhlii* and two other Indo-West Pacific stingray species (Myliobatiformes: Dasyatidae), inferred from size-polymorphic intron markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 438 : 32-40.
- Bowen, B.W., Bass, A.L. , Rocha, L.A. , Grant, W.S. and Robertson, D.R. 2001. Phylogeography of the trumpetfishes (*Aulostomus*): ring species complex on a global scale. *Evolution.* 55 : 1029-1039.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. and Wilson, A. C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates, tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18: 225-239.
- Carmill, P., Umbanhowar, C.E. , Teed, R., Geiss, C.E. , Aldinger, J., Dvorak, L., Kenning, J., Limmer, J. and Walkup, K. 2003. Late-glacial and Holocene climatic effects on fire and vegetation dynamics at the prairie-forest ecotone in south-central Minnesota. *Journal of Ecology.* 91: 822-836.

- Cassone, B.J. and Boulding, E.G. 2006. Genetic structure and phylogeography of the lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes*, along the northeastern and western Pacific coasts. *Marine Biology*. 149: 213-226.
- Crease, T.J. 1999. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene*. 233: 89-99.
- Di Battista, J.D., Berumen, M.L., Gaither, M.R., Rocha, L.A., Eble, J.A., Choat, J.H., Craig, M.T., Skillings, D.J. and Bowen, B.W. 2013. After continents divide: comparative phylogeography of reef fishes from the Red Sea and Indian Ocean. *J. Biogeogr.* 40: 1170-1181.
- Evans, R.D., L. van Herwerden., G.R. Russ. And A.J. Frisch. 2010. Strong genetic but not spatial subdivision of two reef fish species targeted by fishers on the Great Barrier Reef. *Fisheries Research* 102 : 16–25.
- Excoffier, L. and Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10 : 564-567.
- Frankham, R., Briscoe, D. A. and Ballou, J. D. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, New York, New York, USA.
- Fu, F.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147: 915–925.
- Guarnieo, I., Franzellitti, S., Ungaro, N., Tommasini, S., Piccinetti, C. and Tinti, F. 2002. Control region haplotype variation in the central Mediterranean common sole indicates geographical isolation and population structuring in Italian stocks. *J. Fish. Biol.* 60: 1459-1474.
- Guo, E., Li, X., Liu, Y., Cheng, Y. and Wu, C.X. 2011. Genetic variation and population structure of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) inferred from mitochondrial control region. *Mol Biol Rep.* doi 10.1007/s11033-011-0882-3.
- Harpending, R.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66: 591-600.

- Hoffman, E.A., Kolm, N., Berglund, A., Arguello, J.R. and Jones, A.G. 2005. Genetic structure in the coral-reef-associated Banggai cardinal fish, *Pterapogon kauderni*. *Mol. Ecol.* 14: 1367-1375.
- Huang, X. and Madan, A. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9 : 868–877.
- Hung, K., Russell, B.C. and Chen, W. 2017. Molecular systematics of threadfin breams and relatives (Teleostei, Nemipteridae). *Zool. Scr.* 46(5): 536-551.
- Iamsuwansuk, A. and J. Denduangboripant. 2011. Phylogenetic study of shovel-nosed lobster *Thenus indicus* in Thailand. In The 37th Congress on Science and Technology of Thailand. 10-12 October 2011. Bangkok, Thailand.
- Klinbunga, S., K. Khetpu, B. Khamnamtong and P. Menasveta. 2007. Genetic heterogeneity of the blue swimming crab (*Portunus pelagicus*) in Thailand determined by AFLP analysis. *Biochem. Genet.* 45: 725-736.
- Kong, X.Y., Li, Y. L. and Kong, W.S.J. 2010. Genetic variation and evolutionary demography of *Fenneropenaeus chinensis* populations, as revealed by the analysis of mitochondrial control region sequences. *Genetics and Molecular Biology.* 33(2): 379-389.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D. , Gibson T.J. and Higgins, D.G. 2007. Sequence analysis Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics Applications Note.* 23 (21), 2947-2948.
- Lewontin, R.C. 1974. The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press, New York.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25, 1451-1452.
- Lim, H., A.T. Ahmad., A.A. Nuruddin and S.A.M. Nor. 2014. Genetic relationships among five nemipterid fish species from the Indian coast using allozyme analysis. Mitochondrial DNA. doi: 10.3109/19401736.2014.908354
- Mahidol, C., U. Na-Nakorn, S. Sukmanomon, N. Taniguchi and T.T.T. Nguyen. 2007. Mitochondrial DNA diversity of the Asian moon scallop, *Amusium pleuronectes* (Pectinidae), in Thailand. *Marine Biotechnology.* 9 : 352-359.

- Menezes, M. R., U. Arolkar and V. Rathod. 2002. Genetic relationships among five nemipterid fish species from the Indian coast using allozyme analysis. *Journal of Fish Biology*. 60(5) :1326–1330.
- Mousset, S., Derome, N. and Veuille, M. 2004. A neutrality test based on the mismatch distribution. *Mol. Biol. Evol.* 21: 724-731.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Olsson, J., Florin, A., Mo, K., Aho, T. and Ryman, N. 2012. Genetic structure of whitefish (*Coregonus maraena*) in the Baltic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 97: 104-113.
- Quithavon, K. 2009. *Molecular Phylogenetic Relationships among Thai Deer (Subfamily Cervinae)*. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.
- Panithanarak, T. Karuwancharoen, R., Na-Nakorn, U. and Nguyen, T. T.T. 2010. Population Genetics of the Spotted Seahorse (*Hippocampus kuda*) in Thai Waters: Implications for Conservation. *Zoological Studies*. 49(4) : 564-576.
- Phinchongsakuldit, J., P.Chaipakdee., J. F. Collins., M. Jaroensutasinee., J. F. Y. Brookfield. 2013. Population genetics of cobia (*Rachycentron canadum*) in the Gulf of Thailand and Andaman Sea: fisheries management implications. *Aquacult Int.* 21:197–217.
- Ramirez-Soriano A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., F. l and Navarro, A. 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*. 179: 555-567.
- Ravitchandirane, V., G. Vaithianathan, R. Vijayan, J. Bilavendiran, T.Muthusamy, S. Jayachandran, R.Vellaichamy and G. Takshnamurthy . 2012. Molecular Identification and Phylogenetic Relationships of Threadfin Breems (Family: Nemipteridae) Using mtDNA Marker. *Not. Sci. Biol.* 4(2): 13-18.
- Rogers, A.R. and Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the Distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552-569.
- Roldan, M.I., Perrotta, M., Cortey, R.G. and Pla, C. 2000. Molecular and morphologic approaches to discrimination of variability patterns in chub mackerel, *Scomber japonicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 253: 63-74.

- Roman, J. and Palumbi, S. R. 2004. A global invader at home : population structure of the green crab, *Crcinus maenas*, in Europe. *Molecular Ecology*. 13: 2891-2898.
- Russell, B.C., 1990. FAO Species Catalogue. Vol. 12. Nemipterid fishes of the world. (Threadfin breams, whiptail breams, monocle breams, dwarf monocle breams, and coral breams). Family Nemipteridae. An annotated and illustrated catalogue of nemipterid species known to date. FAO Fish. Synop. 125(12):149p. Rome: FAO. (Ref. 3810).
- Shih, H., Saher, N. U., Kamrani, E., Ng, P. K., Lai, Y. and Liu, M. 2015. Population genetics of the fiddler crab *Uca sindensis* (Alcock, 1900) (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae) from the Arabian Sea. *Zoological Studies*. 54, 1 DOI 10.1186/s40555-014-0078-3.
- Sinsakul, S. 2000. Late Quaternary geology of the Lower Central Plain, Thailand. *Journal of Southeast Asian Earth Science*. 18: 415–426.
- Slatkin, M. 1987. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*. 39(1) : 53-65.
- Song, N., Zhang, X. and Gao, T. 2010. Genetic diversity and population structure of spottedtail goby (*Synechogobius ommaturus*) based on AFLP analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*. 38: 1089–1095.
- Supmee, V., Ngernsiri L., Swatdipong A., Wonnapijit, P., Sangthong, D. and Sangthong, P. 2012a. A single population of Thai vinegar crab (*Episesarma mederi*) living in the Gulf of Thailand. In *Proceeding of the 38th Congress on Science and Technology of Thailand (STT38)*. 17-19 October 2012. Chiang Mai, Thailand.
- Supmee, V., Ngernsiri L., Swatdipong A., Wonnapijit, P., Sangthong, D. and Sangthong, P. 2012b. A single population of Thai vinegar crab (*Episesarma mederi*) living in the Gulf of Thailand. In *Proceeding of the 38th Congress on Science and Technology of Thailand (STT38)*. 17-19 October 2012. Chiang Mai, Thailand.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585–595.

- Tudela, S., Garcia-Marynn, J.L. and Pla, C. 1999. Genetic structure of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*, in the north-west Mediterranean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 234: 95-109.
- Xu, Q., Liu, R. and Liu, Y. 2009. Genetic population structure of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the East China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 371: 121-129.
- Yang, Z. 2006. *Computational molecular evolution.* Oxford University Press, New York.





ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีราชย์

ภาคผนวกที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแฮโลไทป์จำนวน 18 แฮโลไทป์ที่ได้จากการศึกษา

ในปี พ.ศ. 2558

>H01_58

TTTTCTTTATAGCAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
 CCCCTGATATGGCATTTCCTCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
 TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
 ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
 TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
 CGCCCTATTTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
 CCGGG

>H02_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
 CCCCTGATATGGCATTTCCTCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
 TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
 ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
 TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
 CGCCCTATTTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
 CCGGG

>H03_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
 CCCCTGATATGGCATTTCCTCCGAATAAATAACATGAACTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
 TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
 ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
 TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
 CGCCCTATTTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
 CCGGG

>H04_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
 CCCCTGATATGGCATTTCCTCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
 TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
 ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
 TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
 CGCCCTATTTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
 CCGGG

>H05_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
 CCCCTGATATGGCATTTCCTCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
 TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
 ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
 TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
 CGCCCTATTTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
 CCGGG

>H06_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
 CCCCTGATATGGCATTTCCTCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
 TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
 ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
 TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
 CGCCCTATTTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
 CCGGG

>H07_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCTGCTTAGCAG
CCGGG

>H08_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTGTTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCTGCTTAGCAG
CCGGG

>H09_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTGTTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCTGCTTAGCAG
CCGGG

>H10_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCTGCTTAGCAG
CCGGG

>H11_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTGTTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCTGCTTAGCAG
CCGGG

>H12_58

TTTTCTTAATAGGAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTATTTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCTGCTTAGCAG
CCGGG

>H13_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGAG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H14_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACTTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H15_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACTTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H16_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGA
AACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCA
ATTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
ACGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCA
GCCGGG

>H17_58

TTTTCTTTATTGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H18_58

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACTTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

ภาคผนวกที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแฮโลไลพ์จำนวน 42 แฮโลไลพ์ที่ได้จากการศึกษา

ในปี พ.ศ. 2560

>H01_60

TTTTCTTTATAGCAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
 CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
 TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
 ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
 TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
 CGCCCTATTTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
 CCGGG

>H02_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
 CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
 TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
 ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
 TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
 CGCCCTATTTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
 CCGGG

>H03_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
 CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAACTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
 TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
 ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
 TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
 CGCCCTATTTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
 CCGGG

>H04_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
 CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
 TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
 ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
 TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
 CGCCCTATTTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
 CCGGG

>H05_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
 CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
 TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
 ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
 TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
 CGCCCTATTTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
 CCGGG

>H06_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
 CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
 TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
 ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
 TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
 CGCCCTATTTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
 CCGGG

>H07_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCCCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H08_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCCTGTTGATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCCCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H09_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCCTGTTGATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCCCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H10_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCCCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H11_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCCTGTTGATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCCCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H12_60

TTTTCTTAATAGGAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCCCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H13_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGAG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H14_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACTTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H15_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACTTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H16_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGA
AACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCA
ATTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
ACGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCCTGTCTTAGCA
GCCGGG

>H17_60

TTTTCTTTATTGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H18_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACTTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCTATTTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H19_60

TTTTCTTTATAGCAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H20_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H21_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAACTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H22_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H23_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H24_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H25_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H27_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTGTTGATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H28_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTGTTGATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H29_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H30_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTGTTGATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H31_60

TTTTCTTAAATAGGAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGAGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTCTCTTCTGTCTTAGCAG
CCGGG

>H32_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGAG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H33_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACTTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H34_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACTTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H35_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGA
AACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCA
ATTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
ACGCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCA
GCCGGG

>H36_60

TTTTCTTTATTGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H37_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACTTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H38_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACTTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H39_60

TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATGAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
AACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
ATTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
ACGCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCA
GCCGGG

>H40_60

TTTTCTTTATTGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

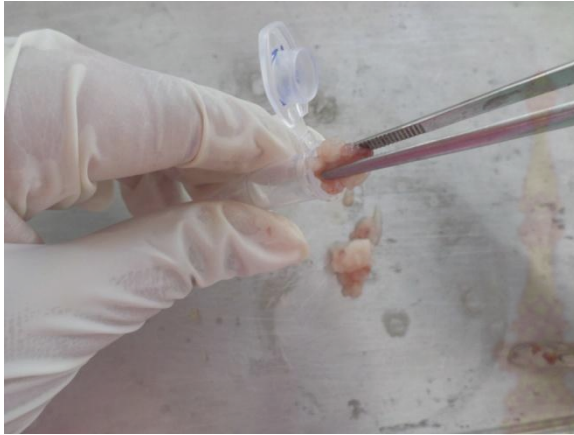
>H41_60

TTTTCTTTATTGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

>H42_60

TTTTCTTTATTGTAATACCAATTATGATCGGCGGGTTTGAAACTGATTGATCCCGCTCATGATCGGGG
CCCCTGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCTTACCCCTTCTTTCTCTTAC
TTCTCGCCTCATCTGGCATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGTTGGACAGTATATCCCCCTCTTGCAGGAA
ACCTGGCACACGCAGGGGCATCTGTTGACTTAACTATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTATTTCTTCAA
TTTTAGGAGCTATTAACCTTCATCACTACCATTATTAACATGAAACCTCCAGCCATTTCCAGTACCAA
CGCCCCTATTCGTATGGGCAGTACTTATTACAGCCGTTCTACTCCTTCTTTCTCTTCCGTCTTAGCAG
CCGGG

ภาคผนวกที่ 3 ภาพกิจกรรมในการทำงานวิจัย



การบรรจุเนื้อเยื่อลงหลอดทดลอง



ตัวอย่างเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง



การสกัดดีเอ็นเอ



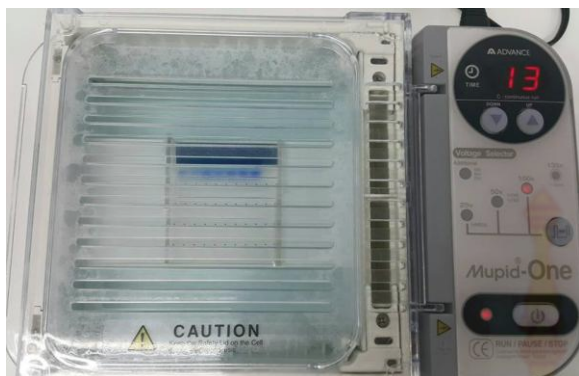
การบดเนื้อเยื่อ



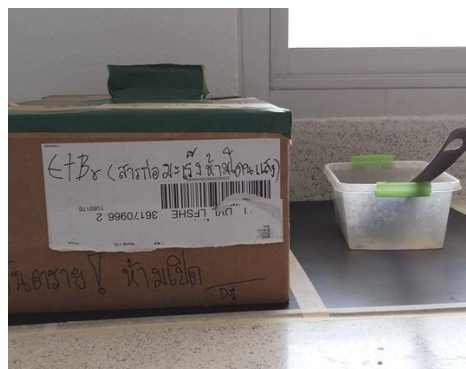
เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม



การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม



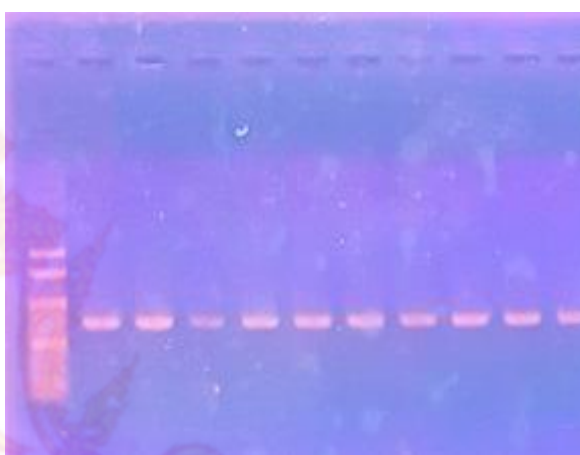
การแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า



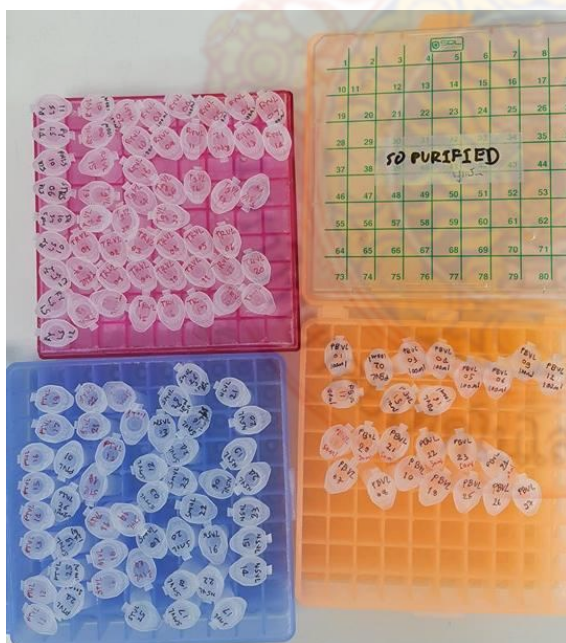
การย้อมสีดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์



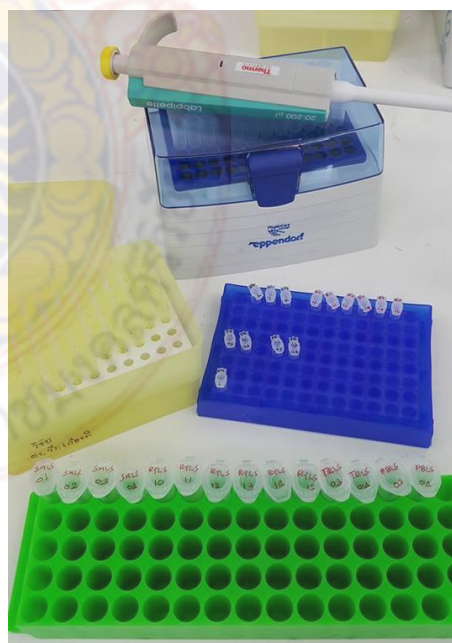
เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอ



ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอ



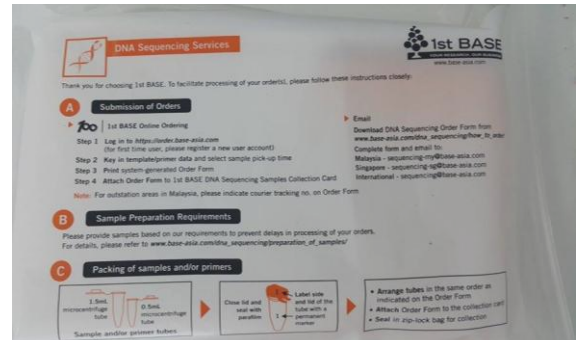
ตัวอย่างดีเอ็นเอที่รอการทำให้บริสุทธิ์



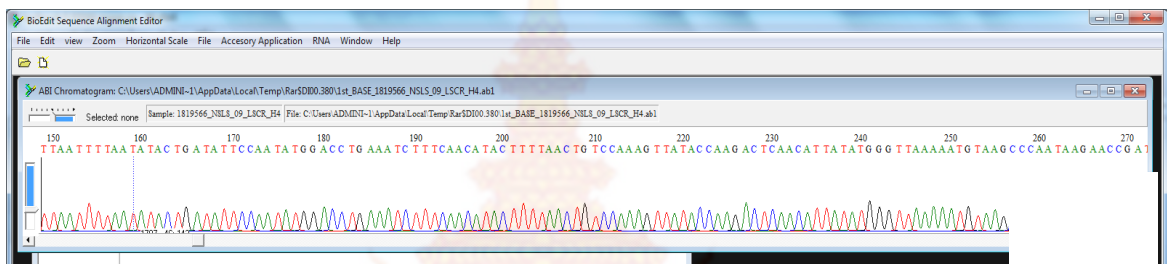
การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์



การเตรียมตัวอย่างเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์



ตัวอย่างดีเอ็นเอที่พร้อมส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์



ผลลำดับนิวคลีโอไทด์อ่านโดยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor

