

การสำรวจเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในปลาตระกูลตะเพียน โดยวิธีการทดสอบพีซีอาร์ข้ามชนิด

Microsatellite markers investigation in Cyprinid species by cross-species PCR
วิศรุต ชัยเลิศฤทธิ์^{1*} อนงค์ นิมลมะย์² พนม กระจ่างพจน์ สอดสุข² คงภพ อัมพลศักดิ์¹ และอุดม สารชาติ¹
Visarut Chailertit^{1*} Anong Nimlamai² Panom K. Sodsuk² Kongphop Ampolsak¹ and Udom Saracharti¹

¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำปทุมธานี กองวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง

¹Pathumthani Aquaculture Genetics Research and Development Center,

Aquaculture Genetics Research and Development Division, Department of Fisheries.

² กองวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง

²Aquaculture Genetics Research and Development Division, Department of Fisheries.

*Corresponding author: ku_bcv@hotmail.com

บทคัดย่อ

ปลาตระกูลตะเพียนเป็นปลาน้ำจืดที่มีจำนวนชนิดและแพร่กระจายมากที่สุดในประเทศไทย และเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญมากต่อเศรษฐกิจและระบบนิเวศ สำหรับการศึกษานี้ได้นำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 50 ตำแหน่งที่พัฒนาจากปลา 5 ชนิด ได้แก่ ปลาตะเพียน ปลาน้ำใน ปลากาดำ ปลาเยี่ยง และปลาเยี่ยงเทศ มาทดสอบข้ามชนิดกับปลาตระกูลตะเพียนจำนวน 16 ชนิด พบว่าเครื่องหมายจำนวน 49 ตำแหน่งสามารถสร้างผลผลิตพีซีอาร์ได้จำนวน 14 – 32 ตำแหน่งต่อชนิดของปลา และพบเครื่องหมายที่ให้ผลเป็น polymorphic จำนวน 3 – 20 ตำแหน่งต่อชนิดของปลา นำผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์กับปลาจำนวน 16 ชนิด ไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉลี่ยต่อตำแหน่ง ประกอบด้วยจำนวนอัลลีลที่ปรากฏ (apparent alleles, A_a) จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่แท้จริง (effective number of alleles, A_e) ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (observed heterozygosity, H_o) และค่าคาดคะเนเฮเทอโรไซโกซิตี (expected heterozygosity, H_e) มีค่า $A_a = 2.33 - 5.00$, $A_e = 1.83 - 3.92$, $H_o = 0.18 - 0.67$ และ $H_e = 0.34 - 0.69$ จากผลการศึกษาที่ได้แสดงถึงศักยภาพในการนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาจากแหล่งเพาะเลี้ยงและจากแหล่งธรรมชาติต่อไป

คำสำคัญ: พีซีอาร์ข้ามชนิด ไมโครแซทเทลไลท์ ปลาตระกูลตะเพียน

Abstract

Cyprinid species are the most abundant and largest species of freshwater fish in Thailand and these species are economic and ecological importance. In the present study, fifty microsatellite loci in *Barbodes gonionotus*, *Cyprinus carpio*, *Labeo chrysophekadion*, *Probarbus jullieni* and *Labeo rohita* were tested for cross-species amplification in sixteen cyprinid species in Thailand. The PCR products were recorded in 14 to 32 loci, depending on species. Three to twenty loci were found polymorphic. Genetic variation for 16 Cyprinid species was presented in four different

parameters (on average per loci), i.e., apparent alleles (A_a), effective number of alleles (A_e), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e). The results indicated that these four parameters differed, depending on species ($A_a = 2.33-5.00$, $A_e = 1.83-3.92$, $H_o = 0.18-0.67$ and $H_e = 0.34-0.69$). This study presents a potential result of cross-species amplification to establish genetic marker sets for genetic diversity research in hatchery and natural populations.

Keywords: cross-species PCR, microsatellites, Cyprinid species.

คำนำ

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์น้ำ อีกทั้งยังนำมาใช้ในการศึกษาหาความแตกต่างทางพันธุกรรมและใช้ในการแยกกลุ่มประชากรในสัตว์น้ำ ใช้ศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของประชากรในโรงเพาะฟักที่อาจเกิดมาจากการจัดการพ่อแม่พันธุ์ที่ไม่เหมาะสม ซึ่งส่งผลต่อการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม และการตรวจสอบการผสมเลือดชิด ทำให้ใช้ประโยชน์ในการวางแผนจัดการพ่อแม่พันธุ์ต่อไปได้ นอกจากนี้ เนื่องจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายที่มีพอลิมอร์ฟิซึมสูง จึงมักใช้ศึกษาหา linkage กับยีนที่สนใจได้ดี และในลักษณะปริมาณที่เป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ ถ้าทราบยีนที่มีผลต่อลักษณะดังกล่าว ก็สามารถทำ QTL (Quantitative trait loci) ได้ เพื่อใช้ติดตามยีนที่สนใจ (Poompuang, 2015)

ปัจจุบันการผลิตพันธุ์สัตว์น้ำสำหรับการเพาะเลี้ยงได้เล็งเห็นปัญหาจากการจัดการพ่อแม่พันธุ์ที่ไม่ถูกต้องตามหลักพันธุศาสตร์ โดยมีการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นจากประชากรพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งสามารถนำผลที่ได้ไปใช้บริหารจัดการพ่อแม่พันธุ์เพื่อลดปัญหาการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม และผลของการผสมเลือดชิดที่จะเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้สำหรับการวางแผนงานในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ เพื่อเพิ่มความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ (Poompuang, 2015) อีกทั้งยังใช้สำหรับการผลิตพันธุ์สัตว์น้ำสำหรับปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อเพิ่มผลผลิตการประมงและฟื้นฟูทรัพยากรการประมงที่เสื่อมโทรมในแหล่งน้ำนั้นๆ โดยไม่ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแหล่งน้ำเปลี่ยนแปลงไป

สำหรับพันธุ์สัตว์น้ำจืดที่หน่วยงานภายใต้กรมประมงได้ผลิตเพื่อการเพาะเลี้ยงและปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาตินั้นมีอยู่หลายชนิด สัตว์น้ำส่วนใหญ่เป็นปลาในวงศ์ Cyprinidae เช่น ปลาดุกเพียน ปลาดุกเพียนทอง ปลายี่สกเทศ ปลานวลจันทร์เทศ ปลาส้มร้อยขาว ปลาบ้า เป็นต้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกิจกรรมการจัดการพ่อแม่พันธุ์ และการผลิตพันธุ์สัตว์น้ำสำหรับปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติให้มากขึ้น จึงควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์น้ำเหล่านี้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดการพันธุ์สัตว์น้ำ แต่เนื่องด้วยปลาในวงศ์ Cyprinidae มีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ไว้แล้วหลายชนิดเช่น ปลาดุกเพียน (McConnell *et al.*, 2001; Kamonrat *et al.*, 2002) ปลาไน (Crooijmans *et al.*, 1997) ปลากาดำ (Nguyen, in press) ปลายี่สก (Sukumasavin *et al.*, 2004) ปลายี่สกเทศ (Das *et al.*, 2005) เป็นต้น และมีรายงานว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้กับสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกันได้ (Das *et al.*, 2005; Chailertit

et al., 2014) อีกทั้งยังพบว่ามีการศึกษาการทดสอบข้ามชนิดในปลาตระกูลตะเพียน (Cyprinid) ในยุโรปหลายชนิด (Holmen et al., 2009, Dubut et al., 2010) และในเอเชีย (Lal et al., 2004, Sukumasavin et al., 2004, Das et al., 2005) ดังนั้นจึงควรนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่มีรายงานเหล่านี้มาทดสอบในปลา กลุ่มใกล้เคียงกัน เนื่องจากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่มีต้นทุนที่สูง และการนำเครื่องหมายที่พัฒนาได้จากปลาที่มีความใกล้เคียงกันมาทดสอบเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่สำหรับใช้ศึกษาได้

การศึกษานี้จะทำการทดสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาจากปลาตะเพียนขาว ปลาไน ปลากาดำ ปลายี่สก และปลายี่สกเทศ ซึ่งเป็นปลาในวงศ์ Cyprinidae รวมจำนวน 50 ตำแหน่ง โดยนำมาทดสอบพีซีอาร์กับปลาตระกูลตะเพียนจำนวน 16 ชนิด ซึ่งเป็นปลาในวงศ์เดียวกัน เพื่อนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเหล่านี้ต่อไป

วิธีดำเนินการ

การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างครีบปลาจำนวน 16 ชนิดได้แก่ ปลาตะเพียน (*Barbonymus gonionotus*) ปลาตะเพียนทอง (*Barbonymus altus*) ปลาตะโกก (*Cyclocheilichthys enoplos*) ปลานวลจันทร์เทศ (*Cirrhinus cirrhosus*) ปลาไน (*Cyprinus carpio*) ปลากาดำ (*Labeo chrysophekadion*) ปลายี่สกไทย (*Probarbus jullieni*) ปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) ปลาสร้อยขาว (*Henicorhynchus siamensis*) ปลาบ้า (*Leptobarbus hoevenii*) ปลากระแห (*Barbonymus schwanefeldii*) ปลากระแห (*Catlocarpio siamensis*) ปลาลิ้น (*Hypophthalmichthys molitrix*) ปลาแก้มขี้ (*Systomus rubripinnis*) ปลาทรงเครื่อง (*Epalzeorhynchus bicolor*) และปลากระมัง (*Puntioplites proctozystron*) จำนวนชนิดละ 15 ตัวอย่าง (ยกเว้นปลากระแหมีจำนวน 13 ตัวอย่าง) จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำอุตรดิตถ์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำปทุมธานี สกัดดีเอ็นเอโดยประยุกต์จากวิธีการของ Boom et al. (1990), Höss and Pääbo (1993), Höss (1994) และ Kemp et al. (2006) วัดปริมาณดีเอ็นเอจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) บนอะกาโรสเจล (agarose gel) เข้มข้น 1% เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสำรวจเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เบื้องต้น

ทดสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 50 ตำแหน่ง (Table 1) ที่พัฒนาจากปลาตะเพียนจำนวน 10 ตำแหน่ง ปลาไน จำนวน 13 ตำแหน่ง ปลากาดำ จำนวน 9 ตำแหน่ง ปลายี่สก จำนวน 6 ตำแหน่ง และปลายี่สกเทศ จำนวน 12 ตำแหน่ง กับตัวอย่างปลาจำนวน 16 ชนิด ชนิดละ 3 ตัวอย่าง เพื่อค้นหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ในปลาแต่ละชนิด ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 10 μ l มีสารต่าง ๆ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 10 ng, ไพรมเมอร์อย่างละ 0.5 μ M, 1x PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs (Biotechrabbit, Hennigsdorf, Germany), 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Promega,

Madison, WI, USA) ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 denaturation 95 °C 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 denaturation 95 °C 30 วินาที annealing ที่ T_a °C (Table 1) 30 วินาที extension 72 °C 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ และขั้นตอนที่ 3 extension 72 °C 5 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 6% denaturing polyacrylamide gel ในบัฟเฟอร์ TBE ที่ระดับกระแสไฟฟ้า 50 วัตต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นย้อมดีเอ็นเอด้วยวิธี silver nitrate (Benbouza *et al.*, 2006) อ่านผลโดยเทียบขนาดกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 DNA ladders (Invitrogen, CA, USA) และหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยการปรับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ให้มีความเหมาะสม จากนั้นคัดเลือกชนิดปลาที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

วิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของปลาตระกูลตะเพียนจำนวน 16 ชนิด โดยให้ตำแหน่งที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้มีค่าเท่ากับ 1 และไม่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ค่าเท่ากับ 0 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity for qualitative data) โดยวิธี Jaccard's coefficient จัดกลุ่มความสัมพันธ์ (clustering) ด้วยวิธี UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) และแสดงผลในรูปแบบ dendrogram โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.0 (Rohlf, 1998)

การทดสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่คัดเลือกได้กับประชากรปลาแต่ละชนิด

นำชนิดของปลาที่คัดเลือกได้จากการทดสอบกับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เบื้องต้นมาทดสอบกับปลาจำนวน 15 ตัวอย่างต่อชนิด โดยนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แยกแต่ละตัวอย่าง และนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 6 % denaturing polyacrylamide gel นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลต่อไป การวิเคราะห์จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์และความหลากหลายทางพันธุกรรมรายชนิด

นำผลที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสมาวิเคราะห์หาจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยจะต้องให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และอ่านผลง่ายในปลาแต่ละชนิด จากนั้นวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉลี่ยต่อตำแหน่ง ได้แก่ จำนวนอัลลีลที่ปรากฏ (apparent alleles, A_p) จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่แท้จริง (effective number of alleles, A_e) ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (observed heterozygosity, H_o) ค่าคาดคะเนเฮเทอโรไซโกซิตี (expected heterozygosity, H_e) และทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์กด้วยวิธี Chi-square goodness-of-fit test (P_{HWE}) โดยใช้โปรแกรม Popgen v.1.31 (Yeh *et al.*, 1999)

Table 1 Fifty microsatellite makers used in this study: locus, sequence of primer, PCR product size, annealing temperature, species and reference

Locus	Primer (5'-3')	Size (bp)	T _a (C°)	Species/Reference
Bgon2	F: ATACACCCAAAGTATGTGTGCC R: AGAAGTTAAACAGGTGCATTGC	101 – 153	56	<i>Barbodes gonionotus</i> / McConnell <i>et al.</i> , 2001
Bgon8	F: GATAGATTCATTGAGCTGGCTG R: ACGTTTGTGTATGTGGATGTGC	120 – 148	60	
Bgon12	F: TATTGAATTGAAATTGCAAACCTTTG R: TAGCTATACTGTATATATGTAACC	116 – 162	53	
Bgon13	F: CCCGTGCAATTCAATATG R: TAAGTAGCACAGATGTGAGG	108 – 254	53	
Bgon18	F: TCATTATGTCCTGCCAAGATG R: GGTAATCACTCACACTCACC	75 – 159	53	
<i>Bgon-17</i>	F: TTACAAGGGTTACATACTG R: CAGTCTCATATTTGAAAGCAG	108 – 182	49	<i>Barbodes gonionotus</i> / Kamonrat <i>et al.</i> , 2002
<i>Bgon-22</i>	F: TCTTGTTGATCACACGGACG R: GTGACTGTATCAATGAGTCTG	73 – 99	49	
<i>Bgon-69</i>	F: GCAAAGGTTCTGTCAAGG R: GTATCCAGAAACATGTTCCAG	87 – 103	49	
<i>Bgon-75</i>	F: CTGGTAAAGACTTCAGATGC R: GCATGCAAATGAGAAAGGCT	96 – 118	53	
<i>Bgon-79</i>	F: GCCAGACTGGAGCGAGG R: GTTCGGTGAAGCCATGAGG	101 – 137	53	
MFW1	F: GTCCAGACTGTCATCAGGAG R: GAGGTGTACTGAGTCACGC	212	55	<i>Cyprinus carpio</i> / Crooijmans <i>et al.</i> , 1997
MFW2	F: CACACCGGGCTACTGCAGAG R: GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC	200	55	
MFW7	F: TACTTTGCTCAGGACGGATGC R: ATCACCTGCACATGGCCACTC	186	55	
MFW9	F: GATCTGCAAGCATATCTGTCCG R: ATCTGAACCTGCAGCTCCTC	117	55	
MFW11	F: GCATTTGCCCTTGATGGTTGTG R: TCGTCTGGTTTGTAGAGTGTGC	202	55	
MFW13	F: ATGATGAGAACATTGTTTACAG R: TGAGAGAACAATGTGGATGAC	184	50	
MFW15	F: CTCCTGTTTTGTTTTGTGAAA R: GTTCAACAAGGTCATTTCCAGC	264	55	

Table 1 (continue)

Locus	Primer (5'-3')	Size (bp)	T _a (C°)	Species/Reference
MFW16	F: GTCCATTGTGTCAAGATAGAG R: TCTTCATTTGAGGCTGCAAAG	171	55	<i>Cyprinus carpio</i> Crooijmans <i>et al.</i> , 1997
MFW17	F: CTCAACTACAGAGAAATTTTCATC R: GAAATGGTACATGACCTCAAG	315	55	
MFW20	F: CAGTGAGACGATTACCTTGG R: GTGAGCAGCCACATTGAAC	249	55	
MFW24	F: GCTCCAGATTGCACATTATAG R: CTACACACACGCAGAGCCTTTC	231	55	
MFW26	F: CCCTGAGATAGAAACCACTG R: CACCATGCTTGATGCAAAG	136	55	
MFW29	F: GTTGACCAAGAAACCAACATGC R: GAAGCTTTGCTCTAATCCACG	158	55	
LcB04	F: CGCGTGGACTAACAACACAT R: TGTTGGCAGTTGTCACAGGT	284 – 294	57	<i>Labeo chrysophekadion</i> Nguyen, in press
LcB10	F: CCAGCAGGAGTTCATGTGTT R: CTCTGCCTGTGTTTTGCAG	223 – 227	57	
LcD11	F: GGCATAGGGGAAAGTCCATT R: GCATCATTGCTGCTGCATTT	123 – 125	57	
LcF10	F: CCAGAGAGATGCACCAATCA R: CTCTATGCTGCAGGGGATTC	207 – 273	57	
LcF12	F: TGCGAGACATTTTGAAGGACT R: GGATGTCCCCAGTAGGGAGT	120 – 154	57	
LcG03	F: TGTGGGAGTGTGCGACTAAG R: ACGTCACAATGCACTTCACA	95 – 113	57	
LcG06	F: CTTGTTTCCACCCTGCACTT R: AAACACCCGTGGGTTTTACA	196 – 200	57	
LcG09	F: GCATGAATAGCGGGAGACAT R: CTGCTGATGAGATCCCTGGT	274 – 296	57	
LcH09	F: TTGGAGCTCTTTAGGCCTCTC R: TCAGCTAAAGCACTGCAGGA	283 – 287	57	
Proji-1	F: ATGGCTGAGACCAGCAAGACAG R: GAGTGGATGTTGTGTGCATGAG	207 – 239	60	
Proji-3	F: GGAATGATCTCTGGATGGAT R: GGAGCTCAAACCCAC AAA	114 – 138	53	

Table 1 (continue)

Locus	Primer (5'-3')	Size (bp)	T _a (C°)	Species/Reference
Proji-6	F: AGCAGGACGAGCCATCTTGA R: GGGTGGAGTAATGAGGCGGTATT	158 – 180	57	<i>Probarbus jullienil</i> Sukumasavin <i>et al.</i> , 2004
Proji-8	F: TCCCTCGGTAACAAGCTTTCTC R: GAGCTTCATCCAGCCTCCATC	224 – 256	53	
Proji-9	F: GATGCGGCTCGGTCTAAGAG R: CTGTCAGTGGGTCATTGTGAGG	188 – 208	57	
Proji-12	F: CTCTGTACAGTGACAGGCCGAAG R: ACCATTACGCCTATGGAGAGTCC	230 – 282	60	
Lr1	F: GACCCTTAACCCTTGACCTT R: TGGGATAATGCAGGGAAAAC	171	58	<i>Labeo rohital</i> Das <i>et al.</i> , 2005
Lr3	F: ATCTGGCTGCCTATTCACC R: CATCGGCGACTGCACTGGA	152	58	
Lr6	F: TATCCTGGCTGAAAACCTTG R: CCCCTACAGGAACAACCAT	160	56	
Lr10	F: GATCTTCAGCGCCAGCGTG R: GAGGACCTGCCAGCATG	250	59	
Lr12	F: CACCGCTGCTGTCCATCA R: AGGTCGGCCAGATACACG	161	58	
Lr14a	F: GATCAACTGCTGCCACAC R: GGTGGTTGTTCCCATGTG	183	55	
Lr14b	F: TCACATGGGAACAACAACC R: CCGCCGCTTACCCATCAC	172	58	
Lr20	F: GCCCGCTGCCGTCTGAC R: CAATAACTCAGCATGTGGAG	144	58	
Lr21	F: GATCAGAGGGTCAATGTGG R: CAGCAGAGTACTATGGAAGA	148	58	
Lr23	F: GGAAATTACAAATGTGCTGATG R: AGCGCTGCTGTCACCTCTGT	186	60	
Lr24	F: CAAGGCCAAAAGTGTCCAT R: AGGAAATTGGTAAAGTGTTC	170	56	
Lr26	F: CCAGGGAGCTGCTAAGAAT R: AGCGCTTCATGCAGTCTAC	151	56	

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างครีบบปลาในตระกูลตะเพียนจำนวน 16 ชนิด นำมาสกัดดีเอ็นเอ เมื่อนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm พบว่าคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพที่ดี เนื่องจากมีค่าอัตราส่วน A260/A280 อยู่ระหว่าง 1.9 – 2.1 และมีความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 100 – 1,200 ng/ μ l

การสำรวจเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เบื้องต้น

หากอนุมานว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 50 ตำแหน่ง สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ทั้งหมดในปลา 16 ชนิด จะได้ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็น 800 ตำแหน่ง (15 ตำแหน่ง x 16 ชนิด) การสำรวจเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เบื้องต้นพบว่าสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ รวมจำนวน 471 ตำแหน่ง หรือคิดเป็น 58.88% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมด

เมื่อนำผลที่ได้จากการทดสอบกับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เบื้องต้นจำนวน 471 ตำแหน่งมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในแต่ละชนิดด้วยวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.0 (Rohlf, 1998) พบว่ามีความสัมพันธ์ที่สอดคล้องกันตามหลักอนุกรมวิธาน (Figure 1) คือ ปลาเยี่ยงเทศ (*L. rohita*) และปลากาดำ (*L. chrysophekadion*) มีความสัมพันธ์กันมากที่สุด ซึ่งทั้ง 2 ชนิดนี้อยู่ในสกุลเดียวกัน (*Labeo*) และเช่นเดียวกันในปลาตะเพียน (*B. gonionotus*) กับปลากะแห (*B. schwanenfeldii*) แต่เมื่อพิจารณาปลาตะเพียนทอง (*B. altus*) ซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกับปลาตะเพียนและปลากะแหพบว่ามีความสัมพันธ์กันน้อยมาก ทั้งนี้ Yue *et al.* (2010) ได้กล่าวว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากการวิวัฒนาการ ในบริเวณตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลท์สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งบริเวณขนบข้าง (flanking region) และบริเวณลำดับเบสซ้ำ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวทำให้การวิเคราะห์ผลได้ผลที่ไม่ชัดเจน เนื่องจากไม่สามารถทราบถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับนิวคลีโอไทด์ อาจส่งผลให้เกิดข้อผิดพลาดในการศึกษา ดังนั้นจึงควรศึกษาถึงระดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำไปสู่การศึกษาถึงความสัมพันธ์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

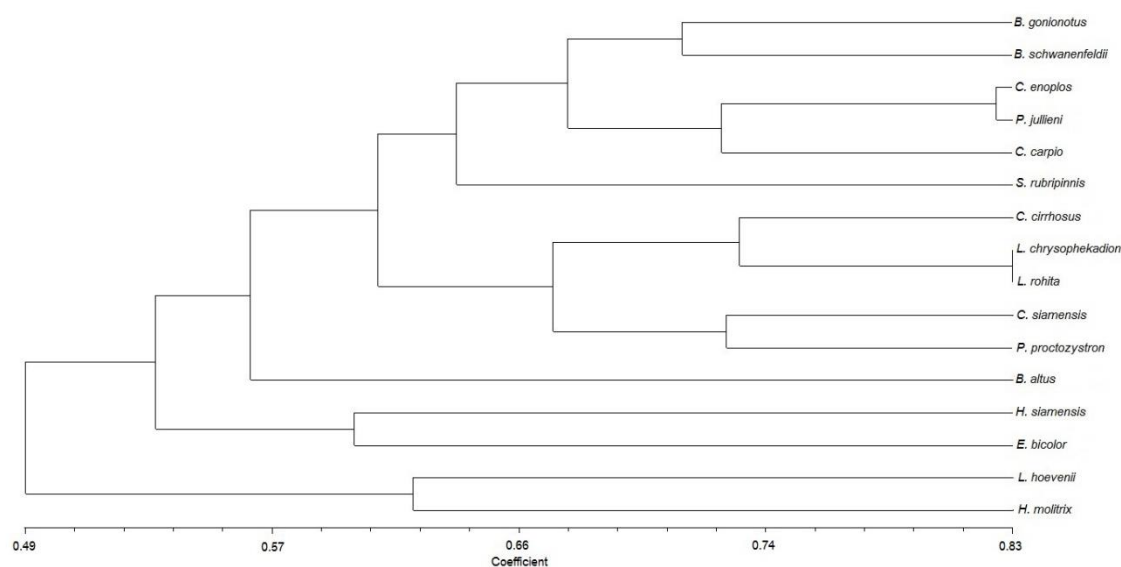


Figure 1 Phylogenetic relationship among the sixteen Cyprinid species with UPGMA method.

การทดสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่คัดเลือกได้กับประชากรปลาแต่ละชนิด

นำชนิดของปลาที่คัดเลือกได้จากการทดสอบกับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เบื้องต้นจำนวน 471 ตำแหน่ง ทดสอบประสิทธิภาพกับปลาจำนวน 15 ตัวอย่างต่อชนิด ยกเว้นปลากระโทงแทงจำนวน 13 ตัวอย่าง พบว่ามีเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และอ่านผลได้ง่ายจำนวน 346 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 43.25% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมด แบ่งเป็นตำแหน่งที่ให้ผลเป็น polymorphic จำนวน 165 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 20.63% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมด และตำแหน่งที่ให้ผลเป็น monomorphic จำนวน 181 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 22.63% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมด (Table 2 และ Table 3)

โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ 50 ตำแหน่ง สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้จากปลาตั้งแต่ 0 – 14 ชนิด และไม่มีเครื่องหมายใดสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จากปลาทั้ง 16 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา (Table 2) เมื่อพิจารณารายตำแหน่ง พบว่าตำแหน่ง Bgon-17 ไม่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ในปลาทุกชนิด รวมถึงปลาตะเพียนเอง ทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาที่ใช้ในการศึกษานี้กับปลาที่ใช้ในการพัฒนาเครื่องหมาย สำหรับบางตำแหน่งพบว่าสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้เฉพาะกับชนิดของปลาที่พัฒนามาเช่น ตำแหน่ง Bgon 2, Bgon 12, Bgon-79 ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการกลายพันธุ์บริเวณที่ขนานข้างลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลท์ (flanking region) ในขั้นตอนการวิวัฒนาการ (Primmer *et al.*, 2005) ซึ่งเป็นบริเวณที่ไพรเมอร์มาจับในการทำพีซีอาร์ ถ้าบริเวณดังกล่าวเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจะทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้ามาจับได้ นอกจากนี้ยังพบเครื่องหมายบางตำแหน่งสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้กับปลาหลายชนิดเช่น ตำแหน่ง LcG09 และตำแหน่ง Lr 12 สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ถึง 14 ชนิดจากจำนวนชนิดปลา 16 ชนิด ทั้งนี้เนื่องมาจากบริเวณขนานข้าง (flanking region) ในตำแหน่งดังกล่าวเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ซึ่งบริเวณดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ (Yue *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2013)

การวิเคราะห์จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์และความหลากหลายทางพันธุกรรมรายชนิด

เมื่อพิจารณารายชนิดของปลา พบว่ามีเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และอ่านผลง่ายในแต่ละชนิดตั้งแต่ 14 – 32 ตำแหน่ง ต่อชนิด หรือเท่ากับ 28 – 64% จากจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ทดสอบทั้งหมด ซึ่งในที่นี้ให้ผลเป็น polymorphic ตั้งแต่ 3 – 20 ตำแหน่งต่อชนิด และให้ผลเป็น monomorphic ตั้งแต่ 4 – 21 ตำแหน่งต่อชนิด (Table 3) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Maduna *et al.* (2014) ที่ศึกษาการทดสอบข้ามชนิดในกลุ่มปลากระดูกอ่อน (Elasmobranch) ในแอฟริกาใต้จำนวน 16 ชนิด โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาได้จากปลาในกลุ่มเดียวกันจำนวน 5 ชนิด รวมจำนวน 35 ตำแหน่ง พบ 28.6 – 71.4% จากจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ทดสอบทั้งหมดสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้

ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉลี่ยต่อตำแหน่งซึ่งประกอบด้วย จำนวนอัลลีลที่ปรากฏ (apparent alleles, A_u) จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่แท้จริง (effective number of alleles, A_e) ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี

(observed heterozygosity, H_o) และค่าคาดคะเนเฮเทอโรไซโกซิตี (expected heterozygosity, H_e) ให้ผลเท่ากับ $A_o = 2.33 - 5.00$, $A_e = 1.83 - 3.92$, $H_o = 0.18 - 0.67$ และ $H_e = 0.34 - 0.69$ (Table 3) ซึ่งความหลากหลายที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในกลุ่มใกล้เคียงที่มีการศึกษาในประเทศไทย (Sodsuk *et al.*, 2013; Pannusa *et al.*, 2015; Sodsuk *et al.*, 2016) เมื่อพิจารณาค่าทดสอบสมมติฐานฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (P_{HWE}) พบว่ามีปลา 2 ชนิดที่ไม่อยู่ในสมมติฐานได้แก่ปลาตะโกก (*C. enoplos*) และปลายี่สกไทย (*P. jullieni*) ทั้งนี้เนื่องจากมีเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์บางตำแหน่งที่พบค่า H_o และ H_e แตกต่างกันมาก ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างที่มีจำนวนที่น้อย หรืออีกสาเหตุอาจเกิดจากตัวอย่างเป็นประชากรเพาะเลี้ยงที่อาจมีการจัดการใด ๆ ที่ส่งผลให้ประชากรไม่อยู่ในสมมติฐาน

จากการทดสอบพบจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่ต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่มีจำนวนน้อย (13 – 15 ตัวต่อชนิด) และแหล่งที่เก็บตัวอย่างเป็นแหล่งเดียวกันในแต่ละชนิด ทั้งนี้ในบางตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พบว่าให้ผลเป็น monomorphic อาจพบว่าเป็น polymorphic ได้ถ้านำไปใช้ทดสอบกับปลาในประชากรอื่น ๆ ต่อไป

Table 2 Results of fifty microsatellite loci showing the number of alleles per locus for the sixteen Cyprinid fish

Species	Bgon 2	Bgon 8	Bgon 12	Bgon 13	Bgon 18	Bgon- 17	Bgon- 22	Bgon- 69	Bgon- 75	Bgon- 79	MFW 1	MFW 2	MFW 7	MFW 9	MFW 11	MFW 13	MFW 15
<i>B. gonionotus</i>	6	3	4	7	2	.	2	4	6	4	1	.	1	3	.	3	3
<i>B. altus</i>	.	1	2	.	.	.	1	8
<i>C. enoplos</i>	.	2	2	.	1	.	1	.	2	2	.	1	1
<i>C. cirrhosus</i>	2	1	1	1	.	2
<i>C. carpio</i>	2	.	3	.	.	4	.	2	4	5	4
<i>L. chrysophekadion</i>	1	1	6	.	.	1	.	1	.	.	.
<i>P. jullieni</i>	2	1	1	.	2	.	3	.	.	1	1
<i>L. rohita</i>	.	1	1	.	1	.	.	1	.	1	1	.	3
<i>H. siamensis</i>	2	4
<i>L. hoevenii</i>	1	.	1	1	.	.	1	1
<i>B. schwanefeldii</i>	.	1	3	.	1	.	2	.	.	.	1	1	2
<i>C. siamensis</i>	1	1	.	1	.	.	1	.	.	.
<i>H. molitrix</i>	1	.	1	2
<i>S. rubripinnis</i>	.	1	.	.	1	.	1	1	1	.	.	1	3
<i>E. bicolor</i>	.	1	1	1	.	1	.	.	1
<i>P. proctozystron</i>	.	1	.	3	.	.	5	.	3	.	1	4

Table 2 (continue)

Species	MFW 16	MFW 17	MFW 20	MFW 24	MFW 26	MFW 29	LcB 04	LcB 10	LcD 11	LcF 10	LcF 12	LcG 03	LcG 06	LcG 09	LcH 09	Proji- 1	Proji- 3
<i>B. gonionotus</i>	.	1	1	1	.	7	.	.	1	2	.	3	4
<i>B. altus</i>	1	.	4	.	.	.	4	.	1	3
<i>C. enoplos</i>	1	3	.	3	1
<i>C. cirrhosus</i>	.	1	1	1	7	.	1	.	1	1	1	3
<i>C. carpio</i>	2	.	1	4	4	.	1	1	.	6	.	.	.	1	.	.	4
<i>L. chrysophekadion</i>	.	3	1	.	4	.	1	1	1	5	3	2	1	4	1	1	1
<i>P. jullieni</i>	.	1	1	.	2	.	1	1	.	6	.	.	.	3	.	.	6
<i>L. rohita</i>	.	1	.	.	2	.	1	.	1	.	.	1	1	1	1	1	.
<i>H. siamensis</i>	.	1	.	5	.	.	.	1	5	5	.	.	.	1	.	.	3
<i>L. hoevenii</i>	.	1	1	1	1	.	.	.
<i>B. schwanefeldii</i>	1	.	3	.	.	.	3	.	3	3
<i>C. siamensis</i>	2	.	1	1	.	1	.	.	.	3	1	1	1
<i>H. molitrix</i>	.	1	.	3	.	1	1	1	2	.	.	.	1	.	.	1	.
<i>S. rubripinnis</i>	1	1	.	1	.	.	1	2	.	3	.
<i>E. bicolor</i>	.	1	1	1	7	1	1
<i>P. proctozystron</i>	.	5	2	9	.	3	3

Table 2 (continue)

Species	Proji-6	Proji-8	Proji-9	Proji-12	Lr1	Lr3	Lr6	Lr10	Lr12	Lr14a	Lr14b	Lr20	Lr21	Lr23	Lr24	Lr26
<i>B. gonionotus</i>	.	2	1	6	6	.	.	.	5	.	1	1
<i>B. altus</i>	.	4	1	.	.	3	.	3	5	.	.	.	5	.	.	.
<i>C. enoplos</i>	1	2	1	1	.	1	.	3	2	.	1	.	.	3	2	1
<i>C. cirrhosus</i>	1	.	2	.	.	1	2	2	4	.	.	1	1	1	2	1
<i>C. carpio</i>	2	2	4	2	.	1
<i>L. chrysophekadion</i>	.	.	1	3	1	2	2	1	1	3	1	.	2	1	2	1
<i>P. jullieni</i>	.	7	2	2	1	1	4	.
<i>L. rohita</i>	.	1	2	1	1	3	2	1	1	3	3	1	2	2	4	1
<i>H. siamensis</i>	.	4	3	.	.	4	5	1	.	.
<i>L. hoevenii</i>	.	.	1	.	.	1	1	.	2	.	.	.	3	.	.	2
<i>B. schwanefeldii</i>	.	1	1	.	.	1	2	2	2	.	.	.	3	2	.	1
<i>C. siamensis</i>	4	2	2	.	1	2	1	1	1	.	.	.	3	.	1	1
<i>H. molitrix</i>	.	.	.	2	.	3	1	.	1	1
<i>S. rubripinnis</i>	.	3	1	.	.	2	.	3	3	.	5	.	.	.	4	3
<i>E. bicolor</i>	.	1	1	.	.	3	.	1	1	.	1	.	.	.	1	5
<i>P. proctozystron</i>	1	2	1	.	.	2	.	5	4	.	2	.	.	5	.	1

Table 3 Results of cross-species amplification for sixteen Cyprinid species: number of loci were amplification (TT), number of loci were polymorphism (PM), number of loci were monomorphism, apparent alleles (A_a), effective number of alleles (A_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and P-value of Hardy-Weinberg equilibrium (P_{HWE})

Species	TT	PM	MM	A_a^*	A_e^*	H_o^*	H_e^*	P_{HWE}
<i>B. gonionotus</i>	29	20	9	4.05 ± 1.731	2.70 ± 0.947	0.49 ± 0.219	0.59 ± 0.187	0.5626
<i>B. altus</i>	15	10	5	4.10 ± 1.663	2.85 ± 1.340	0.55 ± 0.172	0.63 ± 0.122	0.9196
<i>C. enoplos</i>	23	11	12	2.36 ± 0.505	1.85 ± 0.426	0.33 ± 0.266	0.45 ± 0.117	0.0064
<i>C. cirrhosus</i>	25	9	16	3.00 ± 1.658	2.32 ± 1.376	0.36 ± 0.258	0.51 ± 0.153	0.2079
<i>C. carpio</i>	21	16	5	3.44 ± 1.209	2.53 ± 1.043	0.49 ± 0.286	0.55 ± 0.208	0.1966
<i>L. chrysophekadion</i>	32	13	19	2.92 ± 1.038	2.28 ± 0.701	0.45 ± 0.195	0.54 ± 0.145	0.4107
<i>P. jullieni</i>	21	11	10	3.64 ± 1.859	2.73 ± 1.371	0.49 ± 0.254	0.56 ± 0.220	0.0494
<i>L. rohita</i>	31	10	21	2.60 ± 0.699	1.79 ± 0.511	0.40 ± 0.171	0.41 ± 0.174	0.9387
<i>H. siamensis</i>	14	10	4	4.20 ± 1.229	2.70 ± 0.876	0.41 ± 0.188	0.61 ± 0.155	0.4749
<i>L. hoevenii</i>	15	3	12	2.33 ± 0.577	1.86 ± 0.409	0.18 ± 0.188	0.46 ± 0.111	0.0633
<i>B. schwanenfeldii</i>	21	12	9	2.50 ± 0.522	1.83 ± 0.258	0.38 ± 0.194	0.46 ± 0.076	0.1783
<i>C. siamensis</i>	23	7	16	2.57 ± 0.787	2.42 ± 0.762	0.38 ± 0.267	0.57 ± 0.133	0.3033
<i>H. molitrix</i>	16	5	11	2.60 ± 0.894	1.60 ± 0.530	0.35 ± 0.239	0.34 ± 0.186	0.3959
<i>S. rubripinnis</i>	21	10	11	3.10 ± 0.876	2.08 ± 0.910	0.44 ± 0.243	0.47 ± 0.205	0.8467
<i>E. bicolor</i>	19	3	16	5.00 ± 2.000	3.92 ± 2.096	0.67 ± 0.145	0.69 ± 0.239	0.8527
<i>P. proctozystron</i>	20	15	5	3.80 ± 1.859	2.75 ± 1.594	0.41 ± 0.263	0.57 ± 0.188	0.2005
Total	346	165	181	-	-	-	-	-

* Mean ± SD

สรุปผลการศึกษา

ผลการสำรวจเครื่องมือไมโครแซทเทลไลท์เบื้องต้นพบว่าสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ รวมจำนวน 471 ตำแหน่ง จากจำนวน 800 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 58.88% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมดทั้งหมด และนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับปลาจำนวน 15 ตัวอย่างต่อชนิด (ยกเว้นปลากะโห้มีจำนวน 13 ตัวอย่าง) พบว่ามีเครื่องมือไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และอ่านผลได้ง่ายจำนวน 346 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 43.25% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมดทั้งหมด แบ่งเป็นตำแหน่งที่ให้ผลเป็น polymorphic จำนวน 165 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 20.63% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมดทั้งหมด และตำแหน่งที่ให้ผลเป็น monomorphic จำนวน 181 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 22.63% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมดทั้งหมด เมื่อพิจารณารายชนิด พบว่ามีเครื่องมือทางพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และอ่านผลง่ายในแต่ละชนิดตั้งแต่ 14 – 32 ตำแหน่งต่อชนิดหรือเท่ากับ 28 – 64% จาก

จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ทดสอบทั้งหมด ซึ่งในที่นี้ให้ผลเป็น polymorphic ตั้งแต่ 3 – 20 ตำแหน่งต่อชนิด และให้ผลเป็น monomorphic ตั้งแต่ 4 – 21 ตำแหน่งต่อชนิด

ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉลี่ยต่อตำแหน่ง $A_u = 2.33 - 5.00$, $A_e = 1.83 - 3.92$, $H_o = 0.18 - 0.67$ และ $H_e = 0.34 - 0.69$ ซึ่งความหลากหลายที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในกลุ่มใกล้เคียงที่มีการศึกษาในประเทศไทย จากการทดสอบพบจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่ต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่มีจำนวนน้อย (13 – 15 ตัวต่อชนิด) และแหล่งที่เก็บตัวอย่างเป็นแหล่งเดียวกันในแต่ละชนิด ในบางตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พบว่าให้ผลเป็น monomorphic อาจพบว่าเป็น polymorphic ได้ถ้านำไปใช้ทดสอบกับปลาในประชากรอื่น ๆ ต่อไป

ดังนั้นผลการทดสอบพีซีอาร์ข้ามชนิดกับปลาตระกูลตะเพียนที่ได้สามารถนำไปใช้ได้กับปลาตระกูลตะเพียนจำนวน 16 ชนิด ซึ่งเป็นปลาในวงศ์เดียวกัน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเหล่านี้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณว่าที่ร้อยตรีสมนึก คงทรัพย์ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ อุดรดิตต์ รวมถึงเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์ฯ สำหรับการสนับสนุนตัวอย่างปลาในงานวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำกองวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ และศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำปทุมธานี ทุกท่านที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudin, J.P. and Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotech. Agron. Soc. Environ.* 10: 77–81.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E. and Van der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28: 495–503.
- Chailertit, V., Swatdipong, A., Peyachoknagul, S., Salaenoi, J. and Srikulnath, K. 2014. Isolation and characterization of novel microsatellite markers from Siamese fighting fish (*Betta splendens*, Osphronemidae, Anabantoidei) and their transferability to related species, *B. smaragdina* and *B. imbellis*. *Genet. Mol. Res.* 13: 7157–7162.
- Crooijmans, R.P.M.A., Bierbooms, V.A.F., Komen, J., Van der Poel, J.J. and Groenen, M.A.M. 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animal Genetics* 28: 129–134.

- Das, P., Barat, A., Meher, P.K., Ray, P.P. and Majumdar, D. 2005. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite in *Labeo rohita* and their cross-species amplification in related species. *Mol. Ecol. Notes*. 5: 231–233.
- Dubut, V., Sinama, M., Martin, J.F., Meglecz, E., Fernandez, J., Chappaz, R., Gilles, A. and Costedoat, C. 2010. Cross-species amplification of 41 microsatellite in European cyprinids: A tool for evolutionary, population genetics and hybridization studies. *BMC Research Notes*. 3: 135.
- Holmen, J., Volestad, L.A., Jakobsen, K.S. and Primmer, C.R. 2009. Cross-species amplification of 36 cyprinid microsatellite loci in *Phoxinus phoxinus* (L.) and *Scardinius erythrophthalmus* (L.). *BMC Research Notes*. 2: 248.
- Höss, M. 1994. More about the silica method. *Ancient DNA Newsl.* 2: 10–12.
- Höss, M. and Pääbo, S. 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucl. Acids Res.* 21: 3913–3914.
- Kamonrat, W., McConnell, S.K.J. and Cook, D.I. 2002. Polymorphic microsatellite loci from the Southeast Asian cyprinid, *Barbodes gonionotus* (Bleeker). *Mol. Ecol. Notes*. 2: 89–90.
- Kemp, B.M., Monroe, C. and Smith, D.G. 2006. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. *J. Archaeol. Sci.* 33: 1680–1689.
- Lal, K.K., Chauhan, T., Mandal, A., Singh, R.K., Khulbe, L., Ponniah, A.G. and Mohindra, V. 2004. Identification of microsatellite DNA markers for population structure analysis in Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton-Buchanan, 1882). *J. Appl. Ichthyol.* 20: 87–91.
- Maduna, S.N., Rossouw, C., Roodt-Wilding, R. and Merwe, A.E.B. 2014. Microsatellite cross-species amplification and utility in southern African elasmobranch: A valuable resource for fisheries management and conservation. *BMC Research Notes* 7: 352.
- McConnell, S.K.J., Skibinski, D.O.F. and Mair, G.C. 2001. Microsatellite markers from a commercially important South-east Asian cyprinid, the silver barb (*Barbodes gonionotus* Bleeker). *Mol. Ecol. Notes*. 1: 135–136.
- Nguyen, T.T.T. in press. Characterization of microsatellite DNA markers for the black shark minnow, *Labeo chrysophekadion* (Cyprinidae). *Molecular Ecology Resources*. in press.
- Oliveira, G.A.F., Padua, J.G., Costa, J.L., Jesus, O.N., Carvalho, F.M. and Oliveira, E.J. 2013. Cross-species Amplification of Microsatellite Loci Developed for *Passiflora edulis* Sims. In *Related Passiflora Species*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56(5): 785–792.

- Pannusa, S., Poompuang, S. and Kamonrat, W. 2015. Genetic and morphological variation among hatchery stocks of Thai silver barb *Barbonymus gonionotus* (Bleeker, 1850). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 49: 856–867.
- Poompuang, S. 2015. Genomics for improvement of aquaculture species. Magic Publication co., Ltd., Bangkok. Thailand. 236 p. [in Thai]
- Primmer, C.R., Painter, J.N., Koskinen, M.T., Palo, J.U. and Merilä, J. 2005. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*. 36(4): 348–360.
- Rohlf, F.J. (1998) NTSyS-p.c. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2.0). Exeter Software Publishers Ltd., Setauket.
- Sodsuk, P.K., Khemklad, S., Rattanatriwong, W., Sodsuk, S., Pewnain, P. and Utlert, T. 2013. Genetic variation among cultured, selectively bred and natural populations of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822), in Thailand. *Thai J. Genet.* 6(2): 150–167.
- Sodsuk, P.K., Chalertrit, V., Ampholsak, K. and Sodsuk, S. 2016. Genetic diversity in redbtail sharkminnow, *Epalzeorhynchus bicolor* (Smith, 1931), from Ratchaburi province hatchery stocks. *Thai Fisheries Gazette*. 69 (2): 167–177. [in Thai]
- Sukumasavin, N., Nakajima, M. and Taniguchi, N. 2004. Identification and characterization of microsatellite DNA markers developed in an endangered cyprinid of the Mekong River, the seven-line barb (*Probarbus jullieni* Suavage, 1880). *Mol. Ecol. Notes*. 4: 465–467.
- Yeh, F.C., Yang, R. and Boyle, T. 1999. POPGENE version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/>).
- Yue, G.H., Kovacs, B. and Orban, L. 2010. A New Problem with Cross-Species Amplification of Microsatellites: Generation of Non-Homologous Products. *Zoological Research* 31(2): 131–140.