การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมปลาท้องถิ่นบางชนิดในแม่น้ำน่าน

เชาวลีย์ ใจสุข* อมรชัย ล้อทองคำ จุลทรรศน์ คีรีแลง และ สุภาวดี ศรีแย้ม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา น่าน
*corresponding author e-mail: chaowalee2009@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ สำหรับใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาท้องถิ่น 4 ชนิด ได้แก่ ปลาน้ำหมึก (*Barilius pulchellus*) ปลาเลียหิน (*Garra cambodgiensis*) ปลาพลวงหิน (*Neolissochilus stracheyi*) และปลามั่ม (*Scaphiodonichthys acanthopterus*) ผลการศึกษาสามารถพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ได้คู่ไพรเมอร์ 7, 4, 4 และ 7 คู่ในปลาแต่ละชนิด ตามลำดับ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใช้ 3 คู่ไพรเมอร์นี้สำหรับปลาแต่ละชนิด ระดับความหลากหลายจากจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีสังเกต (H_o) และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีคาดหวัง (H_e) ในปลาน้ำหมึกพบ 3 - 5 แอลลีล ค่า H_o = 0.111 - 0.800 และค่า H_e = 0.106 - 0.701 ปลาเลียหินพบ 4 - 7 แอลลีล มีค่า H_o = 0.750 - 0.867 และค่า H_e = 0.715 - 0.827 ปลาพลวงหินพบ 3 แอลลีล มีค่า H_o = 0.489 - 0.600 และค่า H_e = 0.423 - 0.560 และปลามั่มพบ 3 - 13 แอลลีล มีค่า H_o = 0.523 - 0.622 และค่า H_e = 0.565 - 0.893 ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบในปลาทั้ง 4 ชนิดนี้ ใกล้เคียงกับปลาชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกันและมีความสอดคล้องกับการแพร่กระจายของปลาแต่ละชนิด เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่พัฒนาได้ในการศึกษานี้เป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างของประชากร การอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ของปลาท้องถิ่นเหล่านี้ ข้อมูลพื้นฐานนี้ยังมีประโยชน์สำหรับการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงและการจัดการปลาท้องถิ่นอย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ปลาท้องถิ่น

Development of microsatellite primers for genetic diversity assessment of local fishes in Nan river

Chaowalee Jaisuk*, Amornchai Lothongkum, Junlatat Keereelang and Supawadee Sriyam
Faculty of Science and Agricultural Technology, Rajamangala
University of Technology Lanna Nan
*corresponding author e-mail: chaowalee2009@hotmail.com

Abstract

Microsatellite loci were developed for 4 local fishes, *Barilius pulchellus*, *Garra cambodgiensis, Neolissochilus stracheyi* and *Scaphiodonichthys acanthopterus*. A total of 7, 4, 4 and 7 primer loci for these species, respectively, were developed. Three loci were used to study genetic diversity in each species (observed heterozygosity = H_O, and expected heterozygosity = H_e). We found that *B. pulchellus* showed the number of alleles per locus of 3-5 alleles, H_o = 0.111 - 0.800 and H_e = 0.106 - 0.701; 4 - 7 alleles, H_o = 0.750 - 0.867 and H_e = 0.715 - 0.827 in *G. cambodgiensis*; 3 alleles, H_o = 0.489 - 0.600 and H_e = 0.423 - 0.560 in *N. stracheyi*; 3 - 13 alleles, H_o = 0.523 - 0.622 and H_e = 0.565 - 0.893 in *S. acanthopterus*. Levels of genetic diversity of these 4 species were similar to those species of the same group and were related to the geographic distribution of each species. The microsatellite markers developed in this study will be useful to study genetic diversity, population structure, conservation and utilization of these local fishes. This basic information could be useful for promoting aquaculture and effective management of local fishes.

keywords: genetic marker, microsatellite DNA, local fishes

บทนำ

บริเวณอำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน ซึ่งเป็นพื้นที่ต้นน้ำของแม่น้ำน่านมีความหลากหลายของชนิดปลาสูงถึง 43 ชนิด เมื่อเทียบกับที่พบในแม่น้ำน่านตอนบนจำนวนทั้งสิ้น 108 ชนิด (อมรชัย, 2551) ปลาท้องถิ่นบางชนิดมีความสำคัญและมีศักยภาพที่จะนำมาเพาะพันธุ์เพื่อเพาะเลี้ยงสร้างอาชีพให้กับชุมชน ได้แก่ (1) ปลาน้ำหมึก (*Barilius pulchellus*) จัดเป็นปลาที่มีขนาดเล็กและมีสีสันสวยงาม โดยเฉพาะปลาเพศผู้ที่สามารถพัฒนาเพาะเลี้ยงเป็นปลาสวยงามได้ (2) ปลาเลียหิน (*Garra cambodgiensis*) เป็นปลาขนาดเล็กสามารถกินได้ทั้งตัว ซึ่งชุมชนมีวัฒนธรรมการกินปลาชนิดนี้ โดยเฉพาะในฤดูวางไข่ เนื่องจากปลามีความมันมากกว่าปกติทำให้รสชาติของเนื้อปลาอร่อยจนได้ชื่อว่า “ปลามัน” ราคาปลามีไข่สูงถึงกิโลกรัมละ 500 บาท นอกจากนี้ปลาเลียหินยังสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงคุณภาพของแหล่งน้ำ (3) ปลาพลวงหิน (*Neolissochilus stracheyi*) ได้รับการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนและสร้างรายได้ให้กับชุมชนพื้นที่สูงในจังหวัดน่าน และ (4) ปลามั่ม (*Scaphiodonichthys acanthopterus*) ใช้เป็นดัชนีบ่งบอกคุณภาพน้ำได้เนื่องจากพบเฉพาะในแหล่งน้ำที่มีคุณภาพดี (อมรชัย และเชาวลีย์, 2552)

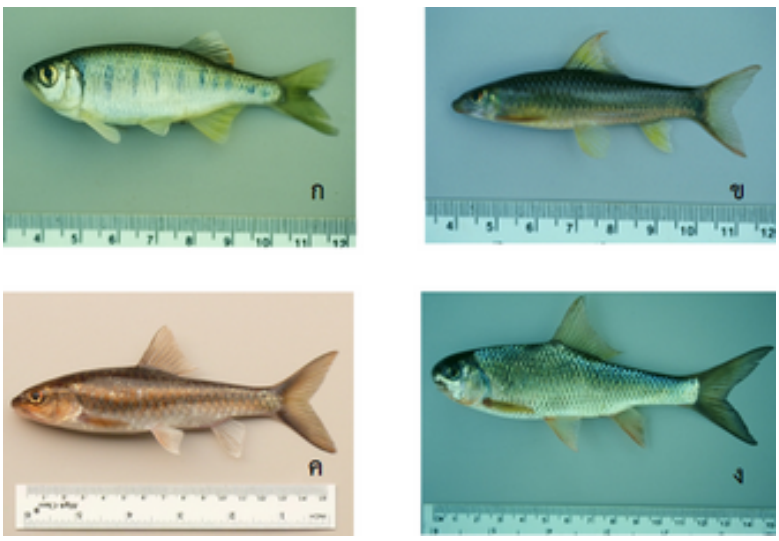
การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในปัจจุบันส่งผลกระทบต่อแหล่งอาศัยของสิ่งมีชีวิตและภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทย (วิสุทธิ์, 2555) ปลาท้องถิ่นเป็นหนึ่งในทรัพยากรชีวภาพ ทำให้นักวิชาการหลายภาคส่วนได้ตระหนักถึงการอนุรักษ์ปลาท้องถิ่น โดยพยายามเพาะพันธุ์และปล่อยลงสู่แหล่งน้ำเพื่อเพิ่มจำนวนประชากรในธรรมชาติ โดยไม่เป็นการทำลายความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในธรรมชาติ ดังนั้นข้อมูลพื้นฐานในระดับพันธุกรรมของปลาท้องถิ่นจึงเป็นสิ่งจำเป็นในเบื้องต้นสำหรับการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ของปลาท้องถิ่นดังกล่าว เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ได้รับความ

นิยมใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับประชากรเนื่องจากมีความแปรผันสูงและสามารถใช้ศึกษาประชากรที่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยได้ผลดี คณะนักวิจัยจึงได้ศึกษาพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ของปลาท้องถิ่นทั้ง 4 ชนิด ดังกล่าวเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. รวบรวมตัวอย่างปลาท้องถิ่นทั้ง 4 ชนิด (ภาพที่ 1) จากแหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่และจากตลาดปลาพื้นเมือง อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน ในเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2555 (ตารางที่ 1) และรวบรวมครีบหางปลาชนิดละ 45 ตัวอย่าง เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ร้อยละ 95
2. พัฒนาเครื่องหมายและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

2.1 พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างครีบโดยวิธี Salt extraction (Aljanabi & Martinez, 1997) ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsal* แล้วเชื่อมด้วย adapter 21 - mer oligonucleotide 3’ ATC AGG TGC GCA TTC GTT CTC 5’ และ 25 – mer oligonucleotide 5’ TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A 3’ ตรวจผลด้วยโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) กระบวนการพีซีอาร์ นำดีเอ็นเอจับกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ 6 ชนิด $(CA)_{15}$ $(CT)_{15}$ $(GA)_{15}$ $(GT)_{13}$ $(AAT)_{14}$ และ $(GATA)_9$ ตรวจผลการจับกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โดยพีซีอาร์ ก่อนเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pTG19-Tและ transformation เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* คัดเลือกโคโลนีโดยใช้ X - gal นำโคโลนีสีขาวมาเพิ่มปริมาณแล้วจึงสกัดพลาสมิด และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์นำมาหาไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Websat



ภาพที่ 1 ปลาท้องถิ่น 4 ชนิด: (ก) ปลาน้ำหมึก (*Barilius pulchellus*) (ข) ปลาเลียหิน (*Garra cambodgiensis*) (ค) ปลาพลวงหิน (*Neolissochilus stracheyi*) (ง) ปลามั่ม (*Scaphiodonichthys acanthopterus*)

ตารางที่ 1 ปลาท้องถิ่นทั้ง 4 ชนิดและบริเวณที่รวบรวมตัวอย่าง

ชนิด*	ชื่อย่อ	บริเวณรวบรวมตัวอย่าง	พิกัด**
ปลาน้ำหมึก	Bp	ห้วยกั๊วะ	N 19° 06' 47.6"
(*Barilius pulchellus* Smith, 1931)		(ลำห้วยสาขาของน้ำมาง)	E 101° 09' 03.7"
ปลาเลียหิน	Gc	น้ำว้า	N 19° 00' 10.3"
(*Garra cambodgiensis* Tirant, 1884)			E 101° 12'50.3"
ปลาพลวงหิน	Soro	น้ำว้า	-
(*Neolissochilus stracheyi* Day, 1871)			
ปลามั่ม	Sa	ตลาดปลาพื้นเมือง	-
(*Scaphiodonichthys acanthopterus* Fowler, 1934)			

หมายเหตุ * จัดจำแนกชนิดปลาตามรายงานของ อมรชัย (2551)

** การรวบรวมตัวอย่างปลาบางชนิดไม่ได้เก็บข้อมูลพิกัดจุดรวบรวมตัวอย่าง

2.2 ทดสอบความหลากรูปแบบ (Polymorphic) และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาแต่ละชนิด โดยตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ที่พัฒนาได้ 3 ตำแหน่งต่อชนิด สกัดดีเอ็นเอจากครีบโดยวิธี Salt extraction วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสผ่านอะกาโรสเจลร้อยละ 1 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในสารละลายพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 1X บัฟเฟอร์ นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) 0.2 มิลลิโมล แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 1.5 มิลลิโมล ไพรเมอร์ Forward และ Reverse อย่างละ 0.2 ไมโครโมล และ *Taq* Polymerase 0.12 ไมโครลิตร (Vivantis; 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิที่ไพรเมอร์มาเกาะกับสายดีเอ็นเอตั้งต้น (annealing temperature; T_a) 52 - 59 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3) นาน 1 นาที 30 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทั้งหมดจำนวน 29 รอบ และสุดท้ายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยเครื่อง Thermal cycle (BioRad, MJ Mini Cycler, Italy) ตรวจสอบดีเอ็นเอผ่าน 6% denaturing polyacrylamide gel ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิสแนวตั้ง (SCIE-PLAS SEQ3341, United Kingdom) ย้อมดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Silver Staining (Promega, USA) อ่านขนาดแอลลีล (Base Pair, bp) โดยเทียบมาตรฐานของลำดับเบส pGEM - 3Zf (+) Vector (Promega, USA)

2.3 วิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรจากจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (number of alleles per locus) และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) โปรแกรม GenAlEx version 6.1 (Peakall & Smouse, 2006) ทดสอบสมดุลฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก โดยการประเมินค่า exact *p* - value ด้วยวิธี markov chain (Guo & Thompson, 1992) โดยโปรแกรม GENEPOP version 4 (Rousset, 2008) และปรับระดับความน่าจะเป็น (*p* - value) สำหรับการทดสอบ multiple tests ด้วยวิธี Bonferroni correction (Rice, 1989) และหาค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (*F* - coefficients) โดยโปรแกรม FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2001)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์สำหรับปลาน้ำหมึก ปลาเลียหิน ปลาพลวงหิน และปลามั่ม จาก positive clone จำนวน 16 - 23 โคลน ได้ไพรเมอร์ที่มีรูปแบบเหมาะสมสำหรับศึกษาความหลากหลายในปลาน้ำหมึกและปลามั่ม 7 คู่ ปลาเลียหินและปลาพลวงหิน 4 คู่ (ตารางที่ 2 และ 3) ไพรเมอร์ที่ได้มีจำนวนน้อยกว่าจำนวน positive clone เนื่องจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ positive clone พบทั้งที่มีและไม่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ นอกจากนั้นไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ในทุกบริเวณที่พบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ เนื่องจากลำดับของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเออยู่ติดกับปลายของสายดีเอ็นเอพาหะมากเกินไปและบางโคลนมีลำดับเบสแกนของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่มีจำนวนชุดซ้ำสูงทำให้มีลำดับเบสขนาบข้างไม่เพียงพอในการออกแบบไพรเมอร์ (ศรีจรรยา, 2550) และการศึกษานี้มีไพรเมอร์บางคู่ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ ซึ่งอาจเกิดจากสภาวะพีซีอาร์อาจยังไม่เหมาะสมยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

ตารางที่ 2 จำนวน positive clone ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ที่ออกแบบ และจำนวนไพรเมอร์ ที่มีความหลากรูปแบบสำหรับการนำไปศึกษาความหลากหลายในปลาแต่ละชนิด

ชนิดปลา	positive clone	ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์	ไพรเมอร์ที่ออกแบบ	ไพรเมอร์ที่มีความหลากรูปแบบ
ปลาน้ำหมึก	23	21	11	7
ปลาเลียหิน	16	16	5	4
ปลาพลวงหิน	23	19	12	4
ปลามั่ม	19	22	17	7

จากการพัฒนาไพรเมอร์ได้ 4-7ตำแหน่ง เลือกไพรเมอร์ที่มีผลผลิตพีซีอาร์ของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอขนาด 100 - 250 คู่เบส และมีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม 3 ตำแหน่งต่อชนิด โดยใช้ดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรมจากจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีสังเกต (observed heterozygosity: H_o) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีคาดหวัง (expected heterozygosity: H_e) โดยที่ปลาน้ำหมึกมีจำนวนแอลลีล 3 - 5 แอลลีล ค่า H_o = 0.111 - 0.800 และค่า H_e = 0.106 - 0.701 ปลาเลียหินมีจำนวนแอลลีล 4 - 7 แอลลีล ค่า H_o = 0.750 - 0.867 และค่า H_e = 0.715-0.827 ปลาพลวงหินมีจำนวนแอลลีล 3 แอลลีล ค่า H_o = 0.489 - 0.600 และค่า H_e = 0.423 - 0.560 และปลามั่มมีจำนวนแอลลีล 3 - 13 แอลลีล ค่า H_o = 0.523 - 0.622 และค่า H_e = 0.565 - 0.893 และพบว่าไพรเมอร์ Sa167 และ Sa188 ไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก โดยที่ตำแหน่ง Sa167 เบี่ยงเบนไปในทางที่มีโฮโมไซโกตมากกว่าที่คาดหมาย (F_{is} มีค่าเป็น บวก) ในขณะที่ Sa188 มีเฮตเทอโรไซโกตมากกว่าที่คาดหมาย (F_{is} มีค่าเป็นลบ) (ตารางที่ 4) ทั้งนี้อาจเกิดจากการรวบรวมตัวอย่างปลาชนิดนี้ที่ได้จัดซื้อมาจากตลาดปลาพื้นเมืองซึ่งปลามาจากหลายแหล่งน้ำและอาจมีความแตกต่างทางพันธุกรรมส่งผลให้เบี่ยงเบนออกจากสมดุล นอกจากนั้นการใช้ไพรเมอร์สำหรับไมโครแซทเทลไลท์ที่มีลำดับเบสซ้ำชนิดไดนิวคลีโอท์อาจมีปัญหาการเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นปื้นยาวหรือลักษณะแบบขั้นบันไดที่เรียกว่า stutter band ซึ่งเกิดจากกระบวนการเข้าคู่ผิด

ตำแหน่งของลำดับเบสของไพรเมอร์ในขณะที่มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอในกระบวนการพีซีอาร์ (Litt & Luty, 1989) หรือ เกิดจากการแยกเป็นเส้นเดี่ยวไม่สมบูรณ์ของผลผลิตพีซีอาร์ก่อนนำไปแยกด้วยอะคริลาไมด์เจลทำให้การวิเคราะห์ขนาด และจำนวนแอลลีลผิดพลาด (O'Reilly & Wrigth, 1995) ในขณะที่การพัฒนา ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์สำหรับปลาในวงศ์ปลาตะเพียน (Cyprinidae) เช่น ปลา *G. orientalis* ไพรเมอร์ 14 คู่ จำนวน 23 ตัวอย่าง พบ 8 - 25 แอลลีล (Su et al., 2013) และปลา *P. prochilus* ไพรเมอร์ 15 คู่ จำนวน 30 ตัว พบ 2 - 17 แอลลีล (Shi et al., 2009) จากข้อมูลแสดงถึงความหลากหลายของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาได้ในการศึกษานี้ แม้ว่าในปลาบางชนิดเครื่องหมายบางตำแหน่งจะตรวจพบแอลลีลได้ไม่หลากหลายอาจเป็นผลมาจากความหลากหลายภายในประชากร เนื่องจากระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมจะมีความแตกต่างกันตามจำนวนประชากร ชีววิทยาของปลา และบริบทของพื้นที่ (Castric et al., 2001; Abbas et al., 2010)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทั้ง 4 ชนิด มีความแตกต่างกันซึ่งอาจเกิดจากหลายปัจจัยอย่าง เช่น สภาพภูมิประเทศที่อาจจะมีผลในการขัดขวางการแพร่กระจาย ทำให้ลดโอกาสการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างประชากร (Castric et al., 2001; Abbas et al., 2010) นอกจากนั้นการแพร่กระจายที่แตกต่างกันของปลาแต่ละชนิดเป็นอีกหนึ่งปัจจัย (Barson et al., 2009; Frankham et al., 2009) ดังที่พบในการศึกษานี้ ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงในปลาที่มีการแพร่กระจายกว้าง คือ ปลามั่ม และปลาเลียหิน แอลลีลต่อตำแหน่งเฉลี่ย 6.33 และ 5 แอลลีล ตามลำดับ ปลาทั้ง 2 ชนิดนี้พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำไหลของระบบแม่น้ำน่านตอนบน (อมรชัย, 2551) นอกจากนั้นปลาเลียหินมีพฤติกรรมการอพยพเพื่อการผสมพันธุ์วางไข่ในฤดูน้ำหลากโดยปลาพ่อแม่พันธุ์จะถูกน้ำพัดมารวมกันในบริเวณที่เหมาะสมต่อการวางไข่ซึ่งเป็นบริเวณนาข้าวหรือลำห้วย ซึ่งการมาอยู่รวมกันและผสมพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์จำนวนมากอาจจะส่งผลดีต่อระดับความหลากหลายทางพันธุกรรม ปลาน้ำหมึกมีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งเฉลี่ย 4.33 แอลลีล ปลาชนิดนี้พบได้ในลำห้วยขนาดเล็กบนพื้นที่สูงและการแพร่กระจายไม่กว้าง อย่างไรก็ตามความหลากหลายต่ำสุดพบได้ในปลาพลวงหิน จำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งเฉลี่ย 3 แอลลีล เพราะเป็นปลาที่มีความจำเพาะถิ่นพบเฉพาะในลำน้ำบางแห่งเท่านั้น (อมรชัย, 2551) ประกอบกับปลาพลวงหินได้รับความนิยมบริโภคและส่งออกเป็นปลาสวยงามจึงทำให้มีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว

ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาท้องถิ่นในการศึกษานี้ใกล้เคียงกับการศึกษาอื่น เช่น กลุ่มปลาขนาดเล็ก (minnow) คือ ปลาเลียหินและปลาน้ำหมึกเทียบกับปลา *Gobiocypris rarus* ซึ่งเป็นปลาขนาดเล็กถิ่นเดียว (endemic) ที่พบได้ในลำน้ำ Liusha จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 11 ตำแหน่ง พบว่าปลามีแอลลีลต่อตำแหน่งเฉลี่ย = 5.00 - 5.36 ค่า H_o = 0.42 - 0.52 และค่า H_e = 0.56 - 0.62 ซึ่งเป็นผลมาจากการเป็นปลาถิ่นเดียว นอกจากนั้นการเปลี่ยนแปลงสภาพแหล่งที่อยู่และการปนเปื้อนของสารเคมีในแหล่งน้ำทำให้จำนวนปลาลดลงอย่างมาก (He & Wang, 2010) ระดับพันธุกรรมต่ำของปลาน้ำหมึกและปลาเลียหินอาจจะสะท้อนถึงการได้รับผลกระทบจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมของปลาเช่นเดียวกับ *G. rarus*

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ ลำดับเบสแกน annealing temperature (T_a)°C ขนาดแอลลีล (คู่เบส: base pair) ของปลาท้องถิ่น 4 ชนิด

ชนิด	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ (5' --> 3')	ลำดับเบสแกน	T_a (°C)	ขนาดแอลลีล (bp)
ปลาน้ำหมึก	Bp161	F : TGG AGT AAG TGA GAG GCT GTT G	(TG)14	52	164 - 171
		R : GTT GCT GCT TAT TTT CCC TGT C			
	Bp309	F : CTC ATC AAA ACA CCA TGC ACT T	(TG)6	58	311 - 316
		R : CGC GTG GAC TAA CAT AAG CAT			
	Bp192	F : GCG TGG ACT AAC GCA CAC A	(TG)10	52	178 - 194
		R : GAT TCA AAG ACA TCC GCA ACT C			
	Bp342	F : GCG TGG ACT AAC ACA CCA AAA T	(CA)20	59	342
		R : GGA CTA ACA TGC CTC CAT CAT C			
	Bp153	F : GCA ATG TGA CCT CCT TTG ATT T	(CA)11	52	148 - 156
		R : ACT AAC ACC TGC GCT GCA TT			
	Bp149	F : CGC GTG GAC TAA CTA CAG AGA A	(AGAC)7	58	150 - 171
		R : CTG TTC CCA AAT CAC ACA GCT A			
	Bp242	F : CTA ACA CAC GGA CAC AGA CAC A	(ACAG)8	59	241 - 245
		R : ATT ACC CCA TCA AAT CAA GTC G			
ปลาเลียหิน	Gc203	F : GTTCTCCAGGTGTGGATTTCTC	(CA)7	54	201 - 210
		R : AACATACACTCACAGTTTGGCCT			
	Gc187	F : GTGGACTACCTGCTGAGAAACC	(AC)12	54	179 - 186
		R : GCGTGGACTAACTTTGCTTTTAG			
	Gc289	F : AGA CGC GAA AGT TCT GTA GCA	(TTAAC)2	58	290 - 294
		R : ACG TAG ACA TCC TTT GTG TGT TTC			
	Gc209	F : GCG TGG ACT AAC AGA GAG TGA G	(GACA)7	54	151 - 156
		R : CTA ACC ACT GCC ATG AGA GAG A			
ปลาพลวงหิน	Soro224	F : TTT TCT GTC TTT CTT TCT CCC G	(ATTTC)5	58	230 - 233
		R : ACA AGG TAA TGG ATG AAC GGA C			
	Soro1	F : AGA CTA ACG CTT TGC TTT GTG A	(TCTTC)4	52	128 - 153
		R : GAC TAA CAC GCG AGG AAG AGT			
	Soro200	F : GCG TGG ACT AAC CGT GAA C	(GA)19	59	217 - 224
		R : ACT ACA ACA CCG GCA GTT CTT A			
	Soro396	F : GTG TTG ATA TTG GCC TTG ATT G	(CA)5	59	352 - 356
		R : TGC GTG TGA ATG TGA GTG			
ปลามั่ม	Sa167	F : GCATTGTCTTCTTTCCTCTTCTTC	(AGAC)7	54	165 - 179
		R : GCGTGGACTAACCATTTACTCA			
	Sa209	F : CGTGGACTAACCAACTGTGCT	(TG)13	54	210 - 212
		R : GCGTGGACTAACACAAACAAGA			
	Sa258	F : TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTG	(AC)9(TTTCT	54	260 - 265
		R : AGATTTAGGAGGATGGGTGCTT	C)2(TC)5		
	Sa197	F : TGCACATTTCTCCTCTAGCTCA	(CA)17	54	194 - 201
		R : CAGTGGCCTCCTGTAAGTGTCT			

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชนิด	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ (5' --> 3')	ลำดับเบสแกน	T_a (°C)	ขนาดแอลลีล (bp)
	Sa319	F : AACACTTGGATGGGTTAAATGC	(CA)6	54	320 - 322
		R : AAACTGCTGTGGTTGTATGTCTG			
	Sa146	F : TTGTGAACAGAGGAGGTGAAGA	(AC)6(AC)7	52	146
		R : ACAGAGCAGAGGGAGAGTGTG			
	Sa188	F : AAAGTGTTTGATGGTGTTTCCC	(GT)10(TG)6	52	190 - 193
		R : TGGCATTTCACTGGTTTTAGTG			

ตารางที่ 4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาท้องถิ่น 4 ชนิด จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 3 ตำแหน่ง จำนวนตัวอย่าง (N), ดัชนีแสดงความหลากหลาย ได้แก่ จำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (A), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), Fixation Index (F_{is}) และค่า exact p-value (P)

	ปลาน้ำหมึก			ปลาเลียหิน			ปลาพลวงหิน			ปลามั่ม		
	Bp 149	Bp 153	Bp 161	Gc 203	Gc 187	Gc 209	Soro 1	Soro 224	Soro 200	Sa 197	Sa 167	Sa 188
N	45	45	44	45	45	28	45	45	45	45	44	45
A	5	3	5	7	4	4	3	3	3	3	13	3
H_o	0.800	0.111	0.682	0.756	0.867	0.750	0.489	0.533	0.600	0.600	0.523	0.622
H_e	0.691	0.106	0.701	0.827	0.715	0.728	0.511	0.423	0.560	0.665	0.893	0.565
F_{is}	-0.157	-0.044	0.027	0.086	-0.212	-0.031	0.043	-0.262	-0.072	0.098	0.415	-0.101
P	0.0325	1.0000	0.5119	0.0877	0.4276	0.7915	0.3089	0.1514	0.0278	0.7225	0.0000*	0.0018*

* มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก $p \leq 0.005$

ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาพลวงหินในการศึกษานี้ใกล้เคียงกับการศึกษาของ เชาวลีย์ และคณะ (2555) จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 3 ตำแหน่ง ปลาพลวงหินในพื้นที่อำเภอบ่อเกลือ มีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งเฉลี่ย 2.33 ค่าเฉลี่ย H_o = 0.50 และ H_e = 0.41 และอำเภอแม่จริม มีแอลลีลต่อตำแหน่งเฉลี่ย 2.67 ค่าเฉลี่ย H_o = 0.56 และ H_e = 0.53 ระดับความหลากหลายที่ค่อนข้างต่ำของปลาชนิดนี้อาจเนื่องมาจากปลามีแหล่งที่อยู่ที่ค่อนข้างจำเพาะจึงไม่มีการแลกเปลี่ยนยีนกับแหล่งอื่น อีกทั้งประชากรมีจำนวนลดลงอย่างมากทำให้เพิ่มโอกาสการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างรวดเร็ว

สำหรับปลามั่มมีความหลากหลายของพันธุกรรมมากกว่าปลาชนิดอื่นๆ โดยเครื่องหมาย 2 ตำแหน่ง ไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก อาจเกิดจากตัวอย่างปลาที่ได้มาจากหลายแหล่งน้ำ เมื่อเทียบกับปลากลุ่ม Cyprinidae ปลามั่มมีระดับพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับปลาชนิดอื่น เช่น ปลา *Elopichthys bambusa* ในแม่น้ำ Yangtze ประเทศจีน จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 9 ตำแหน่ง พบว่ามีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งเฉลี่ย 4.80 และค่า H_o = 0.15 - 1.00 (Abbas et al., 2010) และปลา *Cirrhinus mrigala* จำนวน 7 ประชากร ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง มีค่า H_o = 0.38 - 0.41 และ H_e = 0.38 - 0.40 (Chauhan et al., 2007)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาท้องถิ่นทั้ง 4 ชนิด ในแม่น้ำน่านค่อนข้างใกล้เคียงกับความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาน้ำจืดในการศึกษาอื่นๆ และระดับพันธุกรรมมีความสอดคล้องกับการแพร่กระจายของปลา ทั้งนี้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในระบบนิเวศแหล่งน้ำไหลมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น สภาพภูมิประเทศที่ขัดขวางการแพร่กระจาย หรือ การไหลหลากของน้ำที่มีผลในการเพิ่มระดับการแพร่กระจายของปลา (Barson et al., 2009; Frankham et al., 2009) ความต้องการพื้นที่เพื่อการวางไข่หรือแหล่งหาอาหาร (So et al., 2006) การดำเนินงานอนุรักษ์ปลาท้องถิ่นในปัจจุบันที่มุ่งเน้นไปที่การกำหนดเขตพื้นที่อนุรักษ์อาจมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ เช่น Jang et al. (2003) พบว่าปลาอาศัยอยู่ในบริเวณเขตอนุรักษ์เพียงบางช่วงชีวิตแสดงถึงเขตพื้นที่อนุรักษ์ที่ยังไม่ครอบคลุมพื้นที่ที่แท้จริงของปลา ดังนั้นการวางแผนอนุรักษ์จำเป็นต้องมีข้อมูลชีววิทยาและองค์ความรู้หลายด้านเพื่อประสิทธิภาพในการดำเนินงาน (Smith & Jones, 2007; Nithirojpakdee et al., 2012) การศึกษานี้ได้แสดงข้อมูลที่สะท้อนให้ทราบถึงสถานการณ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาท้องถิ่น เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมและการเพาะพันธุ์เพื่อฟื้นฟูประชากรธรรมชาติรวมถึงสร้างประชากรโรงเพาะฟักส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเพื่อชุมชนต่อไป

สรุปผลการวิจัย

1. การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์สำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาท้องถิ่น 4 ชนิด ได้ไพรเมอร์จำนวน 4 - 7 คู่ ที่มีความหลากรูปแบบสำหรับการนำไปศึกษาความหลากหลายในปลาแต่ละชนิด

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันออกไป อาจเป็นผลมาจากจำนวนประชากร การแพร่กระจายและปัจจัยสิ่งแวดล้อม

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และได้รับการสนับสนุนด้านเครื่องมือจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา และภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอ้างอิง

เชาวลีย์ ใจสุข อมรชัย ล้อทองคำ และสุภาวดี ศรีแย้ม. (2555). **รายงานการวิจัยเรื่อง การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรปลาพลวงหินในประชากรธรรมชาติ บริเวณแม่น้ำน่าน โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนาน่าน.

วิสุทธิ์ ใบไม้. (2555). การวิจัยและการศึกษาเพื่อพัฒนาท้องถิ่น. **Journal Rajabhat Journal of Science, Humanities & Social Sciences,** 13(1), 1-8.

ศรีจรรยา สุขมโนมนต์. (2550). **การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์สำหรับปลาดุกอุยและการประยุกต์เพื่อการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรชัย ล้อทองคำ และเชาวลีย์ ใจสุข. (2552). **รายงานการวิจัยเรื่อง การสำรวจความหลากชนิดของปลา สัตว์น้ำ พืชน้ำและการในประโยชน์ในพื้นที่อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน.** มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา น่าน.

อมรชัย ล้อทองคำ. (2551). **ความหลากชนิดของปลาในลุ่มน้ำน่าน (ระบบแม่น้ำเจ้าพระยา) ในเขตจังหวัดน่าน**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abbas, K., Zhou, X., Li, Yang, Gao, Z., & Wang, W. (2010). Microsatellite diversity and population genetic structure of yellowcheek, *Elopichthys bambusa* (Cyprinidae) in the Yangtze River. **Biochemical Systematics and Ecology,** 38, 806-812.

Aljanabi, S.M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research,** 25, 4692-4693.

Barson, N.J., Cable, J., & Oosterhout, C.V. (2009). Population genetic analysis of microsatellite variation of guppies (*Poecilia reticulata*) in Trinidad and Tobago: evidence for a dynamic source–sink metapopulation structure, founder events and population bottlenecks. **Evolution Biology,** 22, 485–497.

Castric, V., Bonny, F., & Bernatchez, L. (2001). Landscape structure and hierarchical genetic diversity in the Brook charr, *Salvelinus fontinalis*. **Evolution,** 55(5), 1016–1028.

Chauhan, T., Lal, K.K., Mohindra, Vindhya, Singh, R.K., Punia, P., Gopalakrishnan, A., Sharma, P.C., & Lakra, W.S. (2007). Evaluating genetic differentiation in wild populations of the Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton–Buchanan, 1882): Evidence from allozyme and microsatellite markers. **Aquaculture**, 269, 135–149.

Frankham, R., Ballou, D.J., & Briscore, A.D. (2009). **Introduction to conservation genetics**. United Kingdom: Cambridge University Press.

Goudet, J. (2001). **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indice (version2.9.3)**. (Computer software). Switzerland: University of Lausanne.

Guo, S., & Thomson, E. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics,** 48, 361-372.

He, Y., & Wang, J. (2010). Temporal variation in genetic structure of the chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) in its type locality revealed by microsatellite markers. **Biochemical Genetics,** 48, 312-325.

Jang, M., Lucas, M.C., & Joo, G. (2003). The fish fauna of mountain streams in South Korean national parks and its significance to conservation of regional freshwater fish biodiversity. **Biological Conservation,** 114, 115-126.

Litt, M., & Luty, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal Human Genetics,** 44, 397- 401.

Nithirojpakdee, P., Plongsesthee, R., Beamish, F. W. H., & Kangrang, P. (2012). Science and conservation of aquatic animals in Thailand. **International Journal of Environmental and Rural Development,** 3, 50-55.

O'Reilly, P., & Wright, J.M. (1995). The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. **Journal of Fish Biology,** 47 (suppl. A), 29-55.

Peakall, R., & Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes,** 6, 288-295.

Rice, W.R. (1989). Analyzing tables of statistical test. **Evolution,** 43, 223-225.

Rousset, F. (2008). GENEPOP: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources,** 8, 103-106.

Shi, F., Xu, N., Xiong, M., Wang, Z., Que, Y., Zhu, B., Hu, J., & Chang, J. (2009). Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in an endemic Chinese cyprinid fish, *Pseudogyrincheilus prochilus*, and their cross- species amplification in 2 related species. **Conservation Genetics Resources,** 1, 397-399.

Smith, K.L., & Jones, M.L. (2007). When are historical data sufficient for making watershed-level stream fish management and conservation decisions?. **Environmental Monitoring Assessment,** 135, 291-311.

So, N., Maes, G., & Volckaert, F. (2006). High genetic diversity in cryptic populations of the migratory sutchi catfish *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong River. **Heredity,** 96, 166–174.

Su, W.L., Liu, Z.Z., Wang, T.C., Zhen, Z., Liu, Y.A., Tang, Q.W., & Yang, Q.J. (2013). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the fish *Garra orientalis* (oriental sucking barb). **Conservation Genetics Resource,** 5, 231-233.