



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากะรังดอกแดง
(*Epinephelus coioides*) ทางภาคใต้ของประเทศไทยโดยวิธีวิเคราะห์ไอโซไซม์
STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF ORANGE SPOTTED GROUPER
(*Epinephelus coioides*) IN SOUTH OF THAILAND USING ISOZYME ANALYSIS

โดย

ดร.วรุณี เกิดปราง

ธันวาคม 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากะรังดอกแดง

(*Epinephelus coioides*) ทางภาคใต้ของประเทศไทยโดยวิธีวิเคราะห์ไอโซไซม์

STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF ORANGE SPOTTED GROUPER

(*Epinephelus coioides*) IN SOUTH OF THAILAND USING ISOZYME ANALYSIS

ดร.วรวิทย์ เกิดปราง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้ และขอกราบขอบพระคุณนักวิจัยที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผู้ให้การสนับสนุนเครื่องมือ และอุปกรณ์การวิจัย รวมทั้งให้คำปรึกษาในการทำวิจัยจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ซึ่งมีได้กล่าวนามในที่นี้ ในการสนับสนุน และให้ความช่วยเหลือการวิจัยครั้งนี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG4 580007

ชื่อโครงการ : การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากะรังดอกแดง (*Epinephelus coioides*) ทางภาคใต้ของประเทศไทยโดยวิธีวิเคราะห์ไอโซไซม์

ชื่อนักวิจัย : ดร.วรวิทย์ เกิดปราง
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

E-mail Address : worawut2000@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 1 ปี

ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลากะรังดอกแดงจากธรรมชาติ ทางภาคใต้ของประเทศไทย ศึกษาจากตัวอย่างประชากรที่รวบรวมจาก 3 อำเภอ ในจังหวัดตรัง คือ สิเกา กันตัง และปะเหลียน ซึ่งอยู่ทางด้านฝั่งทะเลอันดามัน และตัวอย่างประชากรจาก บ้านปากนคร จังหวัดนครศรีธรรมราช ที่อยู่ทางฝั่งอ่าวไทย จากการศึกษาเอนไซม์จำนวน 15 เอนไซม์ (AAT, ACP, EST, GPDH, G6PDH, IDH, LAP, LDH, MDH, ME, MPI, PGM, SDH, SP, 6PGD) กับทั้ง 4 ประชากร พบยืนยันควบคุมการสร้างเอนไซม์ 23 ตำแหน่ง พบยืนยันที่แสดงสภาวะหลายรูปแบบ 2 ตำแหน่ง คือ EST* และ G6PDH* ที่พบได้ในทุกประชากร ตำแหน่ง SDH* พบได้ในประชากรจากนครศรีธรรมราช และปะเหลียน และ ตำแหน่ง 6PGD* พบเฉพาะในประชากรจากนครศรีธรรมราช และอีก 6 ตำแหน่ง (IDH*, MDH-2*, MPI*, PGM*, SDH* and 6PGD*) เป็นวาเรียนท์โลไซ ที่พบได้ในอย่างน้อย 1 ประชากร ความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ โดยมีระดับเฮเทอโรไซโกซิตี ระหว่าง 0.039 ถึง 0.061 มีค่าเฉลี่ย 0.046 ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรมีค่าระหว่าง 0.00 ถึง 0.108 โดยไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรปลากะรังจากจังหวัดตรัง แต่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรปลากะรังจากจังหวัดตรังและนครศรีธรรมราชที่ศึกษาในครั้งนี้

คำหลัก : ความหลากหลายทางพันธุกรรม ไอโซไซม์ ปลากะรัง

Abstract

Project Code : TRG4580007

Project Title : STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF ORANGE SPOTTED GROUPER (*Epinephelus coioides*) in South of Thailand Using Isozyme analysis

Investigator : Dr.Worawut Koedprang
Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala Institute of
Technology

E-mail Address : worawut2000@hotmail.com

Project Period : 1 year

Genetic differentiation among natural populations of orange spotted grouper in south of Thailand was detected. Three populations were collected from Trang province; Sikao, Kantang and Palian (Andaman sea). The another population was collected form Nakhon Si Thammarat province; Ban Pak Nakhon (Golf of Thailand). Fifteen enzymes (AAT, ACP, EST, GPDH, G6PDH, IDH, LAP, LDH, MDH, ME, MPI, PGM, SDH, SP, 6PGD) were examined in four populations. Twenty three isozyme loci were detected. The polymorphic loci revealed 2 loci, *EST**and *G6PDH**, in all populations, locus *SDH** in Nakhon Si Thammarat and Palian populations and locus *6PGD** in Nakhon Si Thammarat population. The other six loci (*IDH**, *MDH-2**, *MPI**, *PGM**, *SDH** and *6PGD**) rare variously appeared in at least one population. The genetic variability of four populations was low level. The observed heterozygosity was in range in 0.039 to 0.061 and 0.046 in average. The genetic distance among four local populations varied from 0.00 to 0.108. The population differentiation presented not significant difference among three populations from Trang but revealed significant between Trang and Nakhon Si Thammarat populations.

Keywords : genetic diversity, Isozyme, grouper

Executive Summary

Title: STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF ORANGE SPOTTED GROUPER (*Epinephelus coioides*) in South of Thailand Using Isozyme Analysis

Abstract: Genetic differentiation among natural populations of orange spotted grouper in south of Thailand was detected. Three populations were collected from Trang province; Sikao, Kantang and Palian (Andaman sea). The another was collected form Nakhon Si Thammarat province; Ban Pak Nakhon (Golf of Thailand). Fifteen enzymes (AAT, ACP, EST, GPDH, G6PDH, IDH, LAP, LDH, MDH, ME, MPI, PGM, SDH, SP, 6PGD) were examined in four populations. Twenty three isozyme loci were detected. The polymorphic loci revealed 2 loci, *EST** and *G6PDH**, in all populations, locus *SDH** in Nakhon Si Thammarat and Palian populations and locus *6PGD** in Nakhon Si Thammarat. The other six loci (*IDH**, *MDH-2**, *MPI**, *PGM**, *SDH** and *6PGD**) rare variously appeared in at least one population. The genetic variability of four populations was low level. The observed heterozygosity was in range in 0.039 to 0.060 and 0.045 in average. The genetic distance among four local populations varied from 0.00 to 0.108. The population differentiation presented not significant difference among three populations from Trang but revealed significant between Trang and Nakhon Si Thammarat populations.

Methodology: The natural orange spotted grouper samples were collected from four different locations, Sikao, Kantang and Palian in Trang province which the distance between each location is approximately 40 kilometers, face to Andaman sea. Another location was in Ban Pak Nakhon, Nakhon Si Thammarat province which face to Golf of Thailand. The eye, liver, kidney, spleen and muscle of collected samples were cut and put in 1.5 ml microcentrifuge tube and stored in -40 °C until analyze. The appropriate tissue and electrode buffer for each enzyme were examined and used to analyze the samples. The 30 samples from each location were enzyme analyzed using electrophoresis and isozyme band was stained with particular enzyme reagent. Fifteen enzymes (AAT, ACP, EST, GPDH, G6PDH, IDH, LAP, LDH, MDH, ME, MPI, PGM, SDH, SP, 6PGD) were examined. The allele frequency, heterozygosity and genetic distance were calculated using GENEPOP ver. 3.3 and PHYLIP 3.6 programs.

Result, Discussion and Conclusion: Twenty three isozyme loci were detected. The polymorphic loci revealed 2 loci, *EST** and *G6PDH**, in all populations, locus *SDH** in Nakhon Si Thammarat and Palian populations and locus *6PGD** in Nakhon Si Thammarat. The other six loci (*IDH**, *MDH-2**, *MPI**, *PGM**, *SDH** and *6PGD**) rare variously appeared in at least one population. The private allele was found in Nakhon Si Thammarat population, locus *IDH** allele *B* and locus *PGM** allele *B* with allele frequency 0.966 and 0.016 respectively. The proportion of polymorphic loci were 0.17 in Nakhon Si Thammarat population, 0.09 in Sikao and Kantang populations, 0.13 in Palian population and 0.12 in average. The genetic variability of four populations presented low level. The observed heterozygosity was in range of 0.039 to 0.061 and 0.046 in average. The genetic distance among four local populations varied from 0.00 to 0.108. Although, the distance of 0.1 considered to be indicate subspecies difference, the population differentiation presented not significant difference among three populations from Trang but revealed significant difference between Trang and Nakhon Si Thammarat populations. The orange spotted grouper populations in present study indicate the difference of local races genetic. However, to estimate accurate genetic diversity and genetic differentiation, more isozyme polymorphic loci should study. Moreover, the other molecular genetic markers, such as microsatellite DNA, mitochondrial DNA and etc., would be conduct to estimate effective genetic information of this species.

Keywords: genetic diversity, isozyme, grouper

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากะรังดอกแดง (*Epinephelus coioides*)
ทางภาคใต้ของประเทศไทยโดยวิธีวิเคราะห์ไอโซไซม์

STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF ORANGE SPOTTED GROUPER (*Epinephelus coioides*)
in South of Thailand Using Isozyme analysis

บทนำ

ปลากะรัง หรือปลาเก๋า หรือปลารำปู จัดเป็นปลาน้ำกร่อย มีชื่อสามัญว่า Grouper จัดอยู่ในครอบครัว Serranidae และชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจส่วนใหญ่จัดอยู่ในครอบครัวย่อยของ Epinephelinae เป็นปลาที่มีแหล่งอาศัยและแพร่กระจายอยู่ในน่านน้ำเขตร้อนอินโดแปซิฟิก มีจำนวนมากถึง 11 สกุล และมีจำนวนชนิดประมาณ 110 ชนิด ซึ่งที่พบในประเทศไทย มีอยู่ประมาณ 40 ชนิด ชนิดที่จับได้ปริมาณมากและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในปัจจุบันนี้มีอยู่ 3 ชนิด คือ ปลากะรังดอกแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822) ซึ่งเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อนุ่ม และมีราคาค่อนข้างสูง ปลากะรังจุดดำ หรือปลาเก๋าดอกดำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *E. malabaricus* (Bloch & Schneider, 1801) และปลาหมอตะเล หรือปลาเก๋าดัง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *E. lanceolatus* (ไพโรจน์, 2536)

ปลากะรังเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเป็นที่ยอมรับบริโภคของชาวเอเชีย ได้แก่ สิงคโปร์ มาเลเซีย ฮองกง ไต้หวัน และไทย การเลี้ยงปลากะรังเป็นอีกอาชีพหนึ่งที่ให้ผลตอบแทนที่ค่อนข้างสูง เกษตรกรจึงนิยมเลี้ยงกันมาก โดยเฉพาะจังหวัดชายทะเลบริเวณภาคใต้ เช่น นครศรีธรรมราช สงขลา พังงา ภูเก็ต สตูล และตรัง เป็นต้น (สมปอง, 2537) ในจังหวัดตรัง พิชิตร์ และคณินุช (2541) รายงานแหล่งการเลี้ยงปลากะรังในกระชังของพื้นที่จังหวัดตรัง โดยพบการเลี้ยงมากที่สุด คือ อำเภอกันตัง รองลงมาคือ อำเภอสิเกา กิ่งอำเภอหาดสำราญ และ อำเภอปะเหลียน ตามลำดับ และชนิดของปลากะรังที่นิยมเลี้ยงมากที่สุดคือ ปลากะรังดอกแดง ปลาเก๋าดอกดำ และปลาหมอตะเล ตามลำดับ โดยพันธุ์ปลาที่นำมาเลี้ยงส่วนใหญ่ รวบรวมได้จาก แหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณใกล้เคียง

ปลากะรังดอกแดง (Figure 1.) มีรูปร่างค่อนข้างยาวแบนข้างเล็กน้อย ส่วนลำตัวค่อนข้างกลม ปากค่อนข้างกว้าง ขากรรไกรล่างยาวกว่าขากรรไกรบน กระดูกหน้าแก้มมีลักษณะเป็นฟันหักละเอียดทางด้านบน ส่วนด้านล่างหักมุมเป็นหยักหนามใหญ่ 2-3 อัน มีฟันที่ขากรรไกรบน 2 แถว ส่วนครีบหลังเป็นแนวยาว มีก้านครีบแข็ง 11 ก้าน ก้านครีบอ่อน 15-16 ก้าน ครีบทุกครีบกลมมน ลำตัวจะมีสีน้ำตาลอ่อน มีแถบสีน้ำตาลพาดขวางลำตัว 5-6 แถบ มีจุดสีส้มประอยู่ตลอดตัว ส่วนท้องและใต้คางจะไม่มีจุดสีปรากฏ (อิทธิพล, 2531)

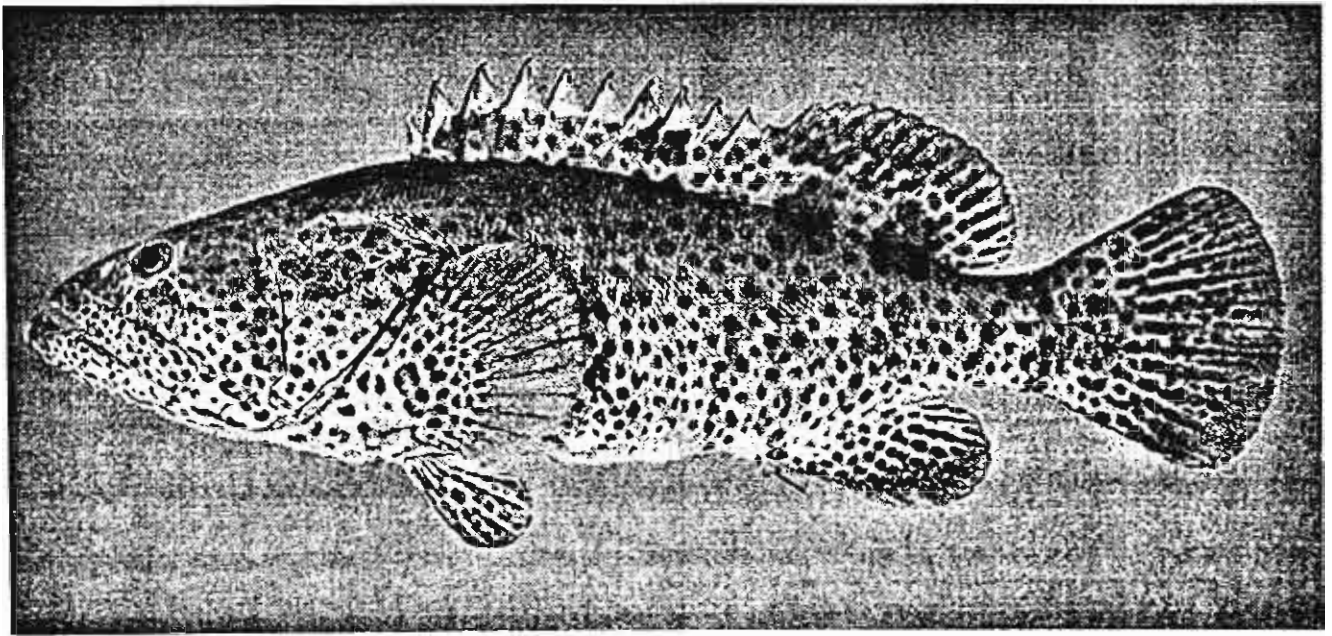


Figure 1. Orange spotted grouper ; *Epinephelus coioides* (Haliton, 1822)

ในปัจจุบัน มีความเจริญก้าวหน้าในเรื่องการศึกษาทางชีวเคมี-พันธุกรรม และมีการพัฒนาเครื่องมือเพื่อการนี้ให้ดีขึ้น เช่น การศึกษาไอโซไซม์ (Isozyme) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เมื่อนำโปรตีน หรือ เอนไซม์ มาแยกด้วยเทคนิคนี้ แล้วย้อมด้วยสีเฉพาะก็จะได้ แถบโปรตีน ที่มีตำแหน่งต่าง ๆ กัน จากแบบแผนของแถบโปรตีนดังกล่าว จะทำให้ทราบจีโนไทป์ (genotype) ของยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ ชนิดใด ๆ ของตัวอย่างนั้น ๆ ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้ เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาโครงสร้างของประชากร และความแตกต่างทางพันธุกรรม ทั้งยังใช้เป็นข้อมูลประกอบการจำแนกชนิด และ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต

จากเทคนิคและแนวทางการวิเคราะห์ดังกล่าว นักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาความแตกต่างระหว่างประชากรของปลาน้ำจืดทั้งปลาน้ำจืดและปลาทะเล เช่น California halibut, *Paralichthys californicus* ซึ่งเป็นปลาทะเลที่มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วอ่าว California โดยแต่เดิมคาดว่าไม่น่าจะแบ่งออกเป็นประชากรย่อย แต่จากการศึกษา isozymes พบว่า ปลา 2 ประชากรที่นำมาศึกษา มี gene ที่มีความถี่แตกต่างกันชัดเจน ถึง 2 ตำแหน่ง (Hedgecock และ Bartley, 1988)

ในประเทศไทยนั้น การศึกษาในเรื่องนี้มีไม่มากนัก รายงานที่น่าสนใจในเรื่องหนึ่งเป็นการศึกษาโครงสร้างประชากรของปลาข้าวสาร (*Oryzias minutillus*) ในประเทศไทย โดยศึกษาในตัวอย่างปลาจากภาคต่าง ๆ ทั่วประเทศไทย รวม 11 ประชากร พบ allele ที่เป็นเอกลักษณ์ของประชากรในยีนตำแหน่งต่าง ๆ โดยปลาจากภาคใต้ (ชุมพร และ ภูเก็ต) มี allele *Pgm** 113 ซึ่งไม่พบในปลาประชากรอื่น ๆ

ปลาจากบัวใหญ่ และ พยัคฆภูมิพิสัย มี allele Me^* 95 และ 77 เป็นเอกลักษณ์ ส่วนที่เหลือ 7 ประชากร ซึ่งเป็นปลาจาก เชียงใหม่ เชียงราย ชัยนาท กรุงเทพฯ ระยอง ฉะเชิงเทรา และ ราชบุรี มี allele เอกลักษณ์ คือ Est^* 100 การแยกกลุ่มโดย allele ที่เป็นเอกลักษณ์นี้ สอดคล้องกับการแยกด้วยค่า genetic distance ทั้งยังสอดคล้องกับผลการศึกษา karyotype อีกด้วย (Takata และคณะ, 1993) อย่างไรก็ตามแม้ค่า genetic distance ที่คำนวณจากบางคู่ของประชากรจะสูงถึง 0.123 ซึ่งเป็นความแตกต่างในระดับ sub-species แต่ยังวิเคราะห์ว่าปลา 11 ประชากรนี้ควรจะเป็นชนิดเดียวกัน ทั้งนี้เพราะประชากรเหล่านี้สามารถผสมพันธุ์กันได้ และให้ลูกที่สืบพันธุ์ได้ตามปกติ

Hara และ Na-Nakorn (1996) ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของปลากะรังปากแม่น้ำ (Greasy grouper; *Epinephelus tauvina*) จากส่วนของเนื้อเยื่อตับ และ กล้ามเนื้อ พบว่ามีความแตกต่างกันที่ยีน 4 ตำแหน่ง จากที่ศึกษาทั้งหมด 19 ตำแหน่ง คือ Acp^* $Gpi-2^*$ $Idh-1^*$ และ $Sod-2^*$ โดยพบความแตกต่างเหล่านี้ จากส่วนของเนื้อเยื่อตับ

ดังนั้นจึงน่าที่จะทำการศึกษาในประชากรปลากะรังดอกแดง ด้วยเทคนิคดังกล่าว ควบคู่ไปกับการศึกษาทางอนุกรมวิธาน โดยใช้สันฐานวิทยา เพื่อให้ทราบชนิด และประชากร ของปลากะรังได้อย่างถูกต้อง จะได้เป็นข้อมูลด้านความหลากหลายทางชีวภาพ ของปลากะรัง สำหรับในการอนุรักษ์สายพันธุ์ และการพัฒนาในด้านอื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์ ของปลากะรังดอกแดง
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรปลากะรังดอกแดง บริเวณภาคใต้ของประเทศไทย (จังหวัดตรัง และนครศรีธรรมราช)

วิธีการทดลอง

การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ และความหลากหลายทางพันธุกรรม ในปลากะรังดอกแดง บริเวณจังหวัดตรัง และนครศรีธรรมราช มีขั้นตอนการดำเนินการวิจัยดังต่อไปนี้

1. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างปลากะรังดอกแดง จากแหล่งน้ำธรรมชาติในจังหวัดตรัง และนครศรีธรรมราช โดยทำการรวบรวมตัวอย่างปลา ด้วยวิธีการซื้อพันธุ์ปลาที่มีการดักจับจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่เชื่อถือได้ จาก 4 แหล่ง คือ อำเภอสิเกา กันตัง และ ปะเหลียน ซึ่งทั้ง 3 อำเภอ มีระยะทางห่างกันพอสมควร ตลอดแนวชายฝั่งทะเลจังหวัดตรัง ทางด้านทะเลอันดามัน และอีก 1 แหล่ง ทางด้านอ่าวไทย บริเวณ บ้านปากนคร อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช (Figure 2.) จำนวนตัวอย่างประชากรละ 35 ตัว ล่าเลี้ยงในสภาพมีชีวิต เพื่อทำการเก็บเนื้อเยื่อส่วน ตา ตับ ไต ม้าม และกล้ามเนื้อ รักษาในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -40 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2. การวิเคราะห์ไอโซไซม์

วิธีการวิเคราะห์ ไอโซไซม์ แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไอโซไซม์ เพื่อศึกษาชนิดของ เนื้อเยื่อ ชนิด และ pH ของ buffer ที่เหมาะสมในการแยกไอโซไซม์ โดยศึกษาตามแนวทางของ May และ Krueger (1990) โดยใช้ตัวอย่างละ 2 ตัว จากแต่ละประชากร ดำเนินการดังต่อไปนี้

- 1) นำเนื้อเยื่อจาก ตา ตับ ไต ม้าม และกล้ามเนื้อ มาบดในน้ำกลั่นปริมาณเท่ากับ ปริมาตรของเนื้อเยื่อ จากนั้นปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นำสารละลายใส (supernatant) ไปใช้
- 2) ใช้กระดาษกรองตัวเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด กว้าง 3 มิลลิเมตร ยาว 10 มิลลิเมตร จุ่ม ในสารละลายที่ได้จนชุ่ม จากนั้นนำไปบรรจุบนแผ่นเจล (11 เปอร์เซ็นต์ starch gel)
- 3) นำไปแยกด้วยไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟesz 40 mA ปลอ่ยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านเจนนาน 4 ชั่วโมง โดยทดลองใช้ buffer 2 ชนิด คือ T-C (Tris Citrate) buffer pH 7.0 และ 8.0 และ C-APM (Citrate Aminopropylmorpholine) buffer pH 6.0 และ 7.0

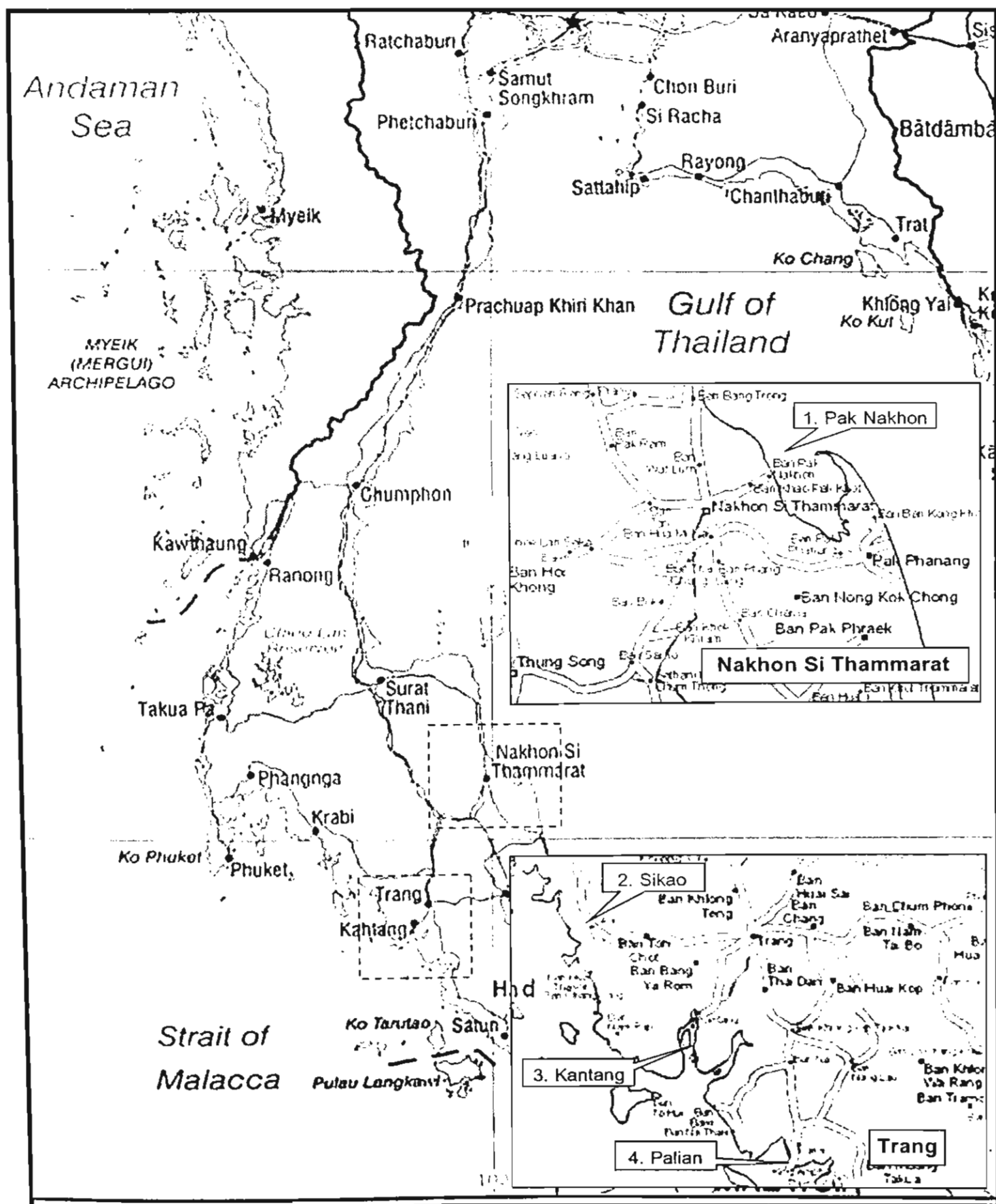


Figure 2. Orange spotted grouper sampling locations; 1. Pak Nakhon (Nakhon Si Thammarat province), 2. Sikao, 3. Kantang and 4. Palian (Trang province)

- 4) เมื่อครบเวลา นำแผ่นเจล มาตัดเป็นแผ่นบาง ๆ (2 มิลลิเมตร) ตามแนวราบ จากนั้น นำไปย้อมด้วยสีตามวิธีของ Morizot และ Schmidt (1990) เปรียบเทียบแถบสีที่ ปรากฏ โดยเปรียบเทียบแถบสีของไอโซไซม์ ชนิดเดียวกันจากปลาตัวเดียวกัน ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ กัน และเมื่อใช้ buffer ต่าง ๆ กัน
- 5) สรุปผลโดยเลือกชนิดของเนื้อเยื่อ ชนิด และ pH ของ buffer ที่แยกไอโซไซม์ ตัวใดตัวหนึ่งได้ชัดเจนที่สุด

การศึกษารังนี้ไอโซไซม์ที่ทำการศึกษา มีทั้งหมด 22 ชนิดเอนไซม์ ดังแสดงใน Table 1.

2.2 การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างประชากร

นำตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมาศึกษาไอโซไซม์ โดยใช้ตัวอย่างประชากรละ 30 ตัว ใช้เนื้อเยื่อ buffer และ pH ที่เหมาะสม (จากผลการศึกษาขั้นที่ 1) จากนั้น ทำการเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ดังนี้

1) ศึกษาค่าแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม

- ศึกษาความถี่ของอัลลีล (allele frequency) ในแต่ละประชากร
- เปรียบเทียบความถี่ของอัลลีล ในปลาต่างประชากรประชากร
- ศึกษาจำนวนยีนในสภาวะหลายรูปแบบ (polymorphic loci) ในแต่ละประชากร ซึ่ง

หมายถึงยีนที่มีความถี่ของอัลลีล สูงสุดไม่เกิน 0.95

- จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อยีน 1 ตำแหน่ง (mean number of alleles per locus) ในแต่ละประชากร

2) ศึกษาสมดุลย์ของประชากร

- คำนวณสัดส่วนของเฮเทอโรไซกัสโนไทป์เฉลี่ยต่อตำแหน่ง ที่คำนวณได้จากการศึกษา (observed heterozygosity; H_o) และ สัดส่วนของเฮเทอโรไซกัสโนไทป์ จากการคาดหมาย (expected heterozygosity; H_e)

- เปรียบเทียบ H_o และ H_e โดยวิธี Chi-square ถ้าค่า H_o ไม่ต่างจาก H_e แสดงว่าประชากรนี้อยู่ในสภาพสมดุลย์ของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium)

3) คำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance; D) ตามวิธีของ Nei (1978)

4) สร้างแผนผัง แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ จากค่า D โดยวิธี UPGMA

(Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averaging)

การคำนวณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม สมดุลย์ของประชากร โดยโปรแกรม GENEPOP ver. 3.3 และค่าระยะห่างทางพันธุกรรม และแผนผังแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยโปรแกรม PHYLIP ver. 3.6

Table 1. Studied enzyme and gene locus for orange spotted grouper

Enzyme	Locus
Adenylate Kinase	<i>AK*</i>
Alkaline Phosphatase	<i>ALP*</i>
Aspartate Aminotransferase	<i>AAT*</i>
Acid Phosphatase	<i>ACP*</i>
Esterase	<i>EST*</i>
Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase	<i>GPDH*</i>
Glucose -6-Phosphate Dehydrogenase	<i>G6PDH*</i>
Fumarase	<i>FM*</i>
Galactose Dehydrogenase	<i>GAD*</i>
Glucose Phosphatic Isomerase	<i>GPI*</i>
Glutamate Dehydorgenase	<i>GDH*</i>
Isocitrate Dehydrogenase	<i>IDH*</i>
Leucine Aminopeptidase	<i>LAP*</i>
Lactate Dehydorgenase	<i>LDH*</i>
Malate Dehydorgenase	<i>MDH*</i>
Malic Enzyme	<i>ME*</i>
Mannose-6-Phosphate Isomerase	<i>MPI*</i>
Phosphoglucomutase	<i>PGM*</i>
Sorbitol Dehydorgenase	<i>SDH*</i>
Superoxide Dismutase	<i>SOD*</i>
Xanthine Dehydorgenase	<i>XDH*</i>
6-Phosphogluconate Dehydrogenase	<i>6PGD*</i>

ผลการทดลอง

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาไอโซไซม์

ผลการทดสอบเนื้อเยื่อ ชนิด และ pH ของ buffer ที่เหมาะสมในการทำอิเล็กโตรโฟเรซิส (electrophoresis) จากการศึกษาทั้งสิ้น 22 เอนไซม์ โดยใช้เนื้อเยื่อส่วน ตา ตับ ไต ม้าม และกล้ามเนื้อ และ buffer 2 ชนิด คือ T-C (Tris Citrate) buffer pH 7.0 และ 8.0 และ C-APM (Citrate Aminopropylmorpholine) buffer pH 6.0 และ 7.0 พบว่า เอนไซม์จำนวน 15 เอนไซม์ ที่แสดงผลอย่างชัดเจน โดยแต่ละเอนไซม์ ใช้เนื้อเยื่อ และ buffer ที่เหมาะสมแตกต่างกันไป โดยจำนวนตำแหน่งของยีน (locus) รวมทั้งสิ้น 23 ตำแหน่ง (Table 2.)

จากผลการทดลอง สามารถทราบสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาไอโซไซม์ จำนวน 15 เอนไซม์ และนำไปใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างประชากรปลากะรังดอกแดง ในการทดลองต่อไป โดย เนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับ เอนไซม์ AAT, EST, GPDH, G6PDH, MPI, PGM, SDH และ 6PGD คือ เนื้อเยื่อตับ และ เอนไซม์ ACP, IDH, LAP, LDH, MDH, ME และ SP คือ เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ ส่วนสารละลาย buffer ที่เหมาะสม และสามารถใช้ได้กับทุกเอนไซม์ คือ T-C pH 8.0

2. การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างประชากร

การศึกษาความถี่ของอัลลีล (allele frequency) ในปลากะรังดอกแดงแต่ละประชากร จาก 15 เอนไซม์ จำนวน 23 ตำแหน่ง พบ 2 ตำแหน่ง คือ *EST** และ *G6PDH** ที่แสดงสภาวะหลายรูปแบบ (polymorphic loci) ซึ่งยีนที่มีความถี่ของอัลลีลสูงสุดไม่เกิน 0.95 ในทุกประชากร (common allele) ตำแหน่ง *SDH** แสดงสภาวะหลายรูปแบบในประชากรจากนครศรีธรรมราช และปะเหลียน และ ตำแหน่ง *6PGD** แสดงสภาวะหลายรูปแบบเฉพาะในประชากรจากนครศรีธรรมราช (Table 3. และ Figure 3.) และ 6 ตำแหน่ง คือ *IDH**, *MDH-2**, *MPI**, *PGM**, *SDH** and *6PGD** เป็นวาเรียนท์โลไซ (variant loci) ซึ่งเป็นอัลลีลที่มีความถี่เกิน 0.95 แต่น้อยกว่า 1 พบได้ในอย่างน้อย 1 ประชากร และอีก 15 ตำแหน่ง พบเพียงอัลลีลเดียว (monomorphic loci) เหมือนกันทุกประชากร และพบอัลลีลเฉพาะ (private allele) คือ ตำแหน่ง *IDH** อัลลีล B และ ตำแหน่ง *PGM** อัลลีล B ในประชากรจาก นครศรีธรรมราช โดยมีความถี่อัลลีล เท่ากับ 0.966 และ 0.016 ตามลำดับ (Table 3.)

Table 2. The appropriate tissue and buffer for isozyme analysis in orange spotted grouper ;
Epinephelus coioides (The alphabet M mean muscle tissue, L mean liver tissue,
 E mean eye tissue and K mean kidney tissue.)

Enzyme	Locus	Tissue	Buffer
Aspartate Aminotrasferase	<i>AAT-1*</i>	M L	T-C pH 7, 8 ; C-APM pH 6,7
	<i>AAT-2*</i>	L	T-C pH 7, 8 ; C-APM pH 6,7
Acid Phosephatase	<i>ACP-1*</i>	M	T-C pH 8
	<i>ACP-2*</i>	M L	T-C pH 8
Esterase	<i>EST*</i>	L	T-C pH 7, 8 ; C-APM pH 6,7
Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase	<i>GPDH-1*</i>	L	T-C pH 8
	<i>GPDH-2*</i>	M L	T-C pH 8
Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase	<i>G6PDH*</i>	L	T-C pH 7, 8
Isocitrate Dehydrogenase	<i>IDH*</i>	M L K	T-C pH 7, 8 ; C-APM pH 6,7
Leucine Aminopeptidase	<i>LAP-1*</i>	M	T-C pH 8
	<i>LAP-2*</i>	M	T-C pH 8
Lactate Dehydrogenase	<i>LDH-1*</i>	M E	T-C pH 7, 8 ; C-APM pH 6,7
	<i>LDH-2*</i>	M E	T-C pH 7, 8
Malate Dehydrogenase	<i>MDH-1*</i>	M L E	T-C pH 8
	<i>MDH-2*</i>	M L E	T-C pH 8
Malic Enzyme	<i>ME*-1</i>	M	T-C pH 7, 8 ; C-APM pH 6
	<i>ME*-1</i>	M	T-C pH 7, 8 ; C-APM pH 6
Mannose-6-Phosphate Isomerase	<i>MPI*</i>	L	T-C pH 7, 8 ; C-APM pH 6,7
Phosphoglucomutase	<i>PGM*</i>	L M	T-C pH 7, 8 ; C-APM pH 6
Sorbital Dehydrogenase	<i>SDH*</i>	L	T-C pH 8
Saproplasmic Protein	<i>SP-1*</i>	M	T-C pH 8
	<i>SP-2*</i>	M	T-C pH 8
6-Phosphogluconate Dehydrogenase	<i>6PGD*</i>	L	T-C pH 7, 8

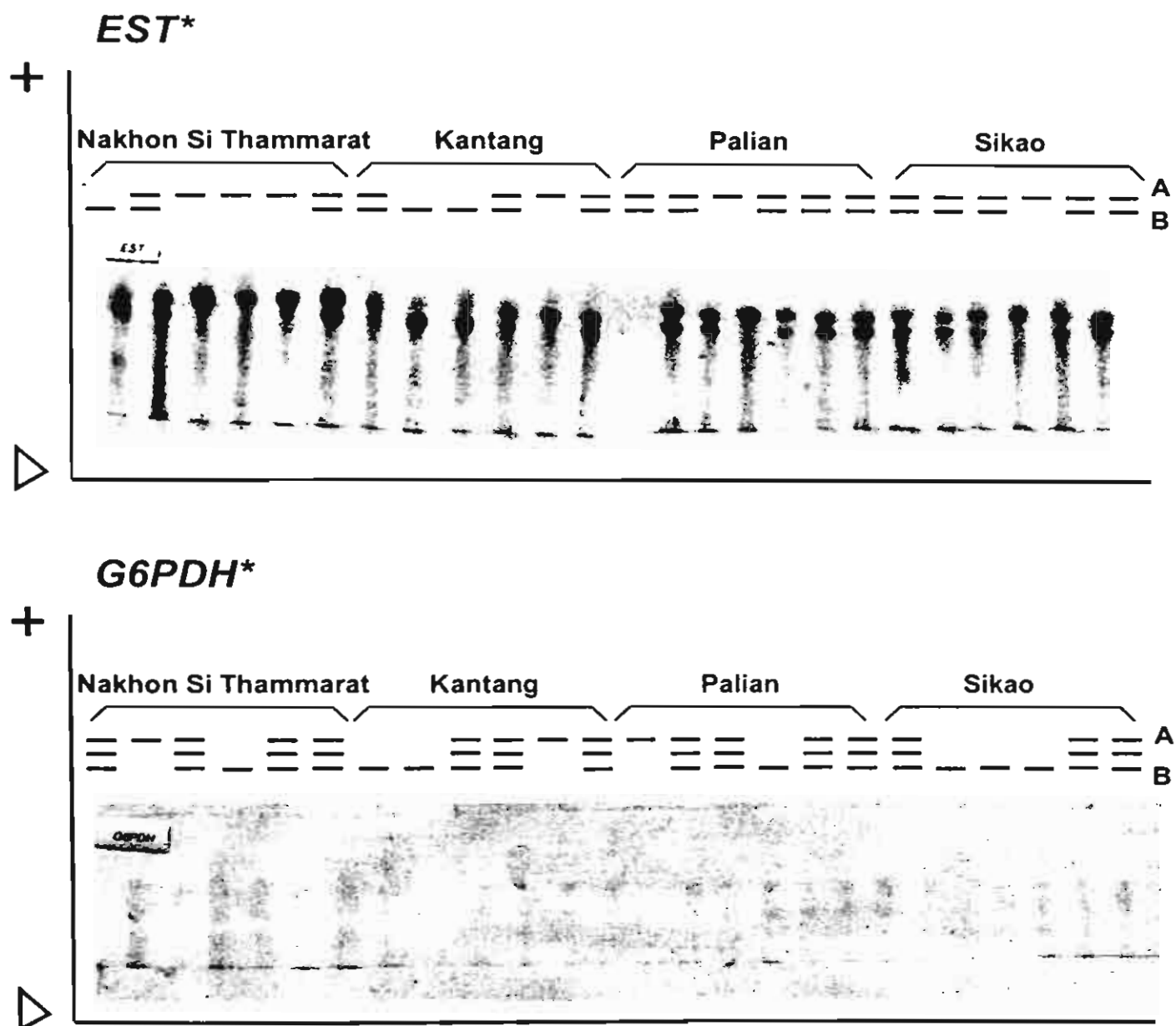


Figure 3. Electrophoretic patterns of *EST** (above) and *G6PDH** (below) loci in each population of Orange spotted grouper

Table 3. Allele frequencies of four populations of orange spotted grouper (n=30)

Locus	Allele	Nakhon Si Thammarat	Sikao	Kantang	Palian
<i>AAT-1*</i>	<i>A</i>	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>AAT-2*</i>	<i>A</i>	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>ACP-1*</i>	<i>A</i>	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>ACP-2*</i>	<i>A</i>	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>EST*</i>	<i>A</i>	0.550	0.552	0.450	0.517
	<i>B</i>	0.450	0.448	0.550	0.483
<i>GPDH-1*</i>	<i>A</i>	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>GPDH-2*</i>	<i>A</i>	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>G6PDH*</i>	<i>A</i>	0.200	0.052	0.083	0.117
	<i>B</i>	0.800	0.948	0.917	0.883
<i>IDH*</i>	<i>A</i>	0.033	1.000	1.000	1.000
	<i>B</i>	0.967	0.000	0.000	0.000
<i>LAP-1*</i>	<i>A</i>	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>LAP-2*</i>	<i>A</i>	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>LDH-1*</i>	<i>A</i>	1.000	1.000	1.000	1.000

Table 3. Allele frequencies of four populations of orange spotted grouper (n=30)

Locus	Allele	Nakhon Si Thammarat	Sikao	Kantang	Palian
<i>AAT-1*</i>	A	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>AAT-2*</i>	A	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>ACP-1*</i>	A	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>ACP-2*</i>	A	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>EST*</i>	A	0.550	0.552	0.450	0.517
	B	0.450	0.448	0.550	0.483
<i>GPDH-1*</i>	A	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>GPDH-2*</i>	A	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>G6PDH*</i>	A	0.200	0.052	0.083	0.117
	B	0.800	0.948	0.917	0.883
<i>IDH*</i>	A	0.033	1.000	1.000	1.000
	B	0.967	0.000	0.000	0.000
<i>LAP-1*</i>	A	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>LAP-2*</i>	A	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>LDH-1*</i>	A	1.000	1.000	1.000	1.000

Table 4. Genetic variability of orange spotted grouper populations

Population	n	P	A	A_p	H_e	H_o	H_o/H_e	P-value
Nakhon Si Thammarat	30	0.17	1.30	2.0	0.069	0.061	0.884	0.073
Sikao	30	0.09	1.22	2.0	0.032	0.041	1.281	0.479
Kantang	30	0.09	1.17	2.0	0.034	0.039	1.147	0.323
Palian	30	0.13	1.22	2.0	0.040	0.041	1.025	0.819
Average	30	0.12	1.23	2.0	0.044	0.046	1.084	-

n = sample size, P = proportion of polymorphic loci, A = mean number of alleles per locus, A_p = mean number of alleles per polymorphic locus, H_e = expected heterozygosity, H_o = observed heterozygosity, P-value = probability of Hardy-Weinberg equilibrium test

สัดส่วนของยีนในสภาวะหลากหลายรูปแบบ (proportion of polymorphic loci) มีค่าเท่ากับ 0.17 ในประชากร นครศรีธรรมราช, 0.09 ในประชากร สีเกา และ กันตัง และ 0.13 ในประชากร ปะเหลียน โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.12 (Table 4.) และมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (mean number of alleles per locus) เท่ากับ 1.30 ในประชากร นครศรีธรรมราช และ 1.22, 1.17 และ 1.22 ในประชากร สีเกา กันตัง และปะเหลียน ตามลำดับ (Table 4.)

สัดส่วนของเฮเทอโรไซโกสียีนในไทป์เฉลี่ยต่อตำแหน่ง ที่คำนวณได้จากการศึกษา (observed heterozygosity; H_o) มีค่าค่อนข้างต่ำ โดยมีค่าเท่ากับ 0.061 ในประชากร นครศรีธรรมราช และ 0.041, 0.039 และ 0.041 ในประชากร สีเกา กันตัง และปะเหลียน ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับค่าสัดส่วนของเฮเทอโรไซโกสียีนในไทป์ จากการคาดหมาย (expected heterozygosity; H_e) ด้วยวิธี ไค-สแควร์ (Chi-square; χ^2) ไม่พบความแตกต่างสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งแสดงว่า ทุกประชากรมีความถี่ของยีนและความถี่ของยีนในไทป์ อยู่ในสภาพสมดุลย์ของฮาร์ดี-ไวน์เบอร์ (Hardy-Weinberg Equilibrium) ดังแสดงใน Table 4.

เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากรด้วยวิธี Markov chain จำนวน 6 คู่ประชากร พบว่า คู่ประชากร ระหว่างประชากร นครศรีธรรมราช กับ ประชากร ตรัง คือ นครศรีธรรมราช-สีเกา นครศรีธรรมราช-กันตัง และนครศรีธรรมราช-ปะเหลียน มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ระหว่างคู่ประชากร ในจังหวัดตรัง คือ สีเกา-กันตัง สีเกา-ปะเหลียน และกันตัง-ปะเหลียน (Table 5.)

Table 5. Probabilities of population differentiation test between each population pair (above diagonal) and genetic distance (Nei) among populations (below diagonal) of orange spotted grouper

	Nakhon Si Thammarat	Sikao	Kantang	Palian
Nakhon Si Thammarat		0.000	0.000	0.000
Sikao	0.107		0.998	0.067
Kantang	0.109	0.000		0.110
Palian	0.080	0.038	0.039	

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างประชากรปลากะรังดอกแดง 4 ประชากร มีค่าอยู่ระหว่าง 0.000-0.109 โดยคู่ประชากรที่มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ ประชากรสีเทากับประชากรกันตัง มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000 ซึ่งจัดเป็นประชากรเดียวกัน และคู่ประชากรที่มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ ประชากรนครศรีธรรมราชกับประชากรกันตัง (Table 5.) จากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมสามารถสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA และพบว่าประชากรปลากะรังดอกแดงที่ศึกษาในครั้งนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ประชากร นครศรีธรรมราช และประชากร ตรัง (Figure 4.)

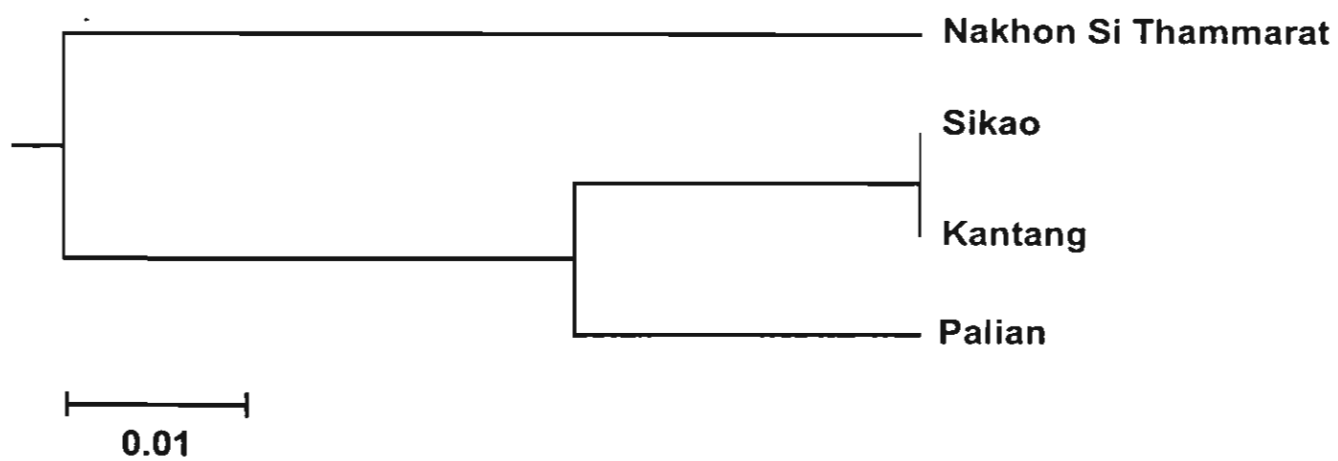


Figure 4. Dendrogram of genetic distance among population of Orange spotted grouper by UPGMA method

วิจารณ์ผล

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาไอโซไซม์

จากการศึกษาชนิดของเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ที่สามารถศึกษาผลได้อย่างชัดเจน คือ เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อดับ เช่นเดียวกับที่ Hara และ Na-Nakorn (1996) ศึกษาเอนไซม์ ในปลากะรัง ชนิด Greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) โดยใช้เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อดับ ส่วน ชนิด และ pH ของ buffer ที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้แตกต่างกันไปตามชนิดของเอนไซม์ที่ศึกษา (Table 2) โดย buffer T-C pH 8 เป็นชนิดที่สามารถใช้ได้กับทุกเอนไซม์ ในขณะที่ Hara และ Na-Nakorn (1996) ใช้ buffer T-C pH 7 ในการศึกษาเอนไซม์ ซึ่งการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาไอโซไซม์ก่อนการทดลองนั้น จำเป็นอย่างยิ่ง ในการศึกษาไอโซไซม์ของสัตว์น้ำแต่ละชนิด เพราะจะทำให้ได้ผลการศึกษาที่ชัดเจน และเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการปฏิบัติงานอีกด้วย

2. การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างประชากร

จากการศึกษาความถี่ของอัลลีล (allele frequency) ในปลากะรังดอกแดงแต่ละประชากร พบอัลลีลที่แสดงสภาวะหลายรูปแบบ เพียงพบ 4 ตำแหน่ง จากที่ศึกษา จำนวน 23 ตำแหน่ง คือ *EST**, *G6PDH**, *SDH** และ *6PGD** เช่นเดียวกับ Hara และ Na-Nakorn (1996) ศึกษาไอโซไซม์ในปลากะรัง ชนิด Greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) จำนวน 15 ตำแหน่ง พบ 3 ตำแหน่งที่แสดงสภาวะหลายรูปแบบ คือ ตำแหน่ง *ACP-1**, *IDH** และ *SOD-2** และ Sugama และคณะ (1999) ศึกษาใน ปลากะรัง ชนิด Humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) จำนวน 15 ตำแหน่ง พบ 3 ตำแหน่งที่แสดงสภาวะหลายรูปแบบ เช่นเดียวกัน คือ ตำแหน่ง *ADH**, *GPI** และ *IDH-1** ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในกลุ่มปลากะรัง มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

จากการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรปลากะรังดอกแดง 4 ประชากร พบว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ โดยมีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งเฉลี่ย ระหว่าง 1.17-1.30 และค่าสัดส่วนของเฮเทอโรไซกอสีโนไทป์ ระหว่าง 0.039-0.061 เช่นเดียวกับที่ Sugama และคณะ (1999) ศึกษาใน ปลากะรัง ชนิด Humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) 4 ประชากร พบว่ามีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งเฉลี่ย ระหว่าง 1.200-1.267 และค่าสัดส่วนของเฮเทอโรไซกอสีโนไทป์ ระหว่าง 0.058-0.089 ขณะที่ Planes และ Lecaillon (1998) ศึกษาไอโซไซม์ในปลากะรัง ชนิด *Cephalopholis argus* ระหว่างประชากร Hawaiian และ ประชากร Polynesian มีค่าสัดส่วนของเฮเทอโรไซกอสีโนไทป์ ของทั้ง 2 ประชากร เท่ากับ 0.0385

ความหลากหลายและความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร หรือระหว่างประชากรที่อยู่ต่างพื้นที่ สามารถศึกษาได้จาก จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งเจลีล และค่าสัดส่วนของเฮเทอโรไซกัสยีนไทป์ ซึ่งค่าสัดส่วนของเฮเทอโรไซกัสยีนไทป์ ที่ศึกษาโดยไอโซไซม์ในปลากระดุกแข็ง จำนวน 51 ชนิด มีค่าเท่ากับ 0.051 ซึ่งจะต่ำกว่าสิ่งมีชีวิตจำพวกพืช สัตว์เลี้ยงลูก และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Nevo, 1978 และ Hamrick, 1979 อ้างโดย Na-Nakorn, 1998)

เมื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร พบว่าไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรภายในจังหวัดตรัง คือ ประชากรสิเกา กันตัง และปะเหลียน มีระยะห่างทางพันธุกรรม ระหว่าง 0.000-0.039 จึงจัดได้ว่าเป็นประชากรเดียวกัน ซึ่งอาจเนื่องจากพื้นที่ของทั้ง 3 กลุ่มไม่ห่างไกลกันนัก และเป็นแนวฝั่งทะเลที่ต่อเนื่องกัน ปลาที่พบในทั้ง 3 พื้นที่ จึงมาจากพ่อแม่ที่เป็นประชากรเดียวกัน และในช่วงที่มีการพัฒนาของตัวอ่อน มีการอพยพเข้าฝั่งโดยสุ่ม ในขณะที่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจังหวัดตรัง กับประชากรจังหวัดนครศรีธรรมราช มีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง 0.080-0.109 โดย 2 ประชากรนี้อยู่ในพื้นที่ที่ห่างไกล และอยู่คนละฝั่งทะเล ที่ถูกขวางกั้นด้วยแหลมมลายูมาเป็นระยะเวลานาน จึงทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างปลากระดุกแดง 2 ประชากรได้ แม้ว่าค่าระยะห่างทางพันธุกรรม 0.1 เป็นค่าความแตกต่างในระดับชนิดย่อย (sub-species) Takata และคณะ, 1993 ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในประชากรปลาข้าวสาร (*Oryzias minutillus*) ในประเทศไทย จำนวน 11 ประชากร พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่าสูงถึง 0.123 ซึ่งเป็นความแตกต่างในระดับชนิดย่อย แต่ยังวิเคราะห์ว่าปลา 11 ประชากรนี้ควรจะเป็นชนิดเดียวกัน ทั้งนี้เพราะประชากรเหล่านี้สามารถผสมพันธุ์กันได้ และให้ลูกที่สืบพันธุ์ได้ตามปกติ ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของปลาน้ำจืด ปลาที่มีการอพยพจากทะเลสู่แหล่งน้ำจืด และปลาทะเล สามารถเกิดขึ้น หรือหายไปได้เนื่องจากสิ่งกีดขวางทางธรรมชาติ (Ward et al., 1994) นอกจากนี้พฤติกรรมผสมพันธุ์ภายในกลุ่มประชากรก็เป็นเหตุให้เกิดความแตกต่างระหว่างประชากรได้เช่นเดียวกัน (May และ Krueger, 1990)

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามี อัลลีลเฉพาะ (private allele) คือ ตำแหน่ง *IDH** อัลลีล *B* และตำแหน่ง *PGM** อัลลีล *B* ในประชากรจากนครศรีธรรมราช ซึ่งอัลลีลนี้อาจสามารถใช้ประโยชน์ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างประชากร เนื่องจากพบได้ในเฉพาะประชากรเท่านั้น ดังเช่น การศึกษาประชากรของปลาข้าวสาร (*Oryzias minutillus*) ในประเทศไทย โดยศึกษาในตัวอย่างปลาจากภาคต่าง ๆ ทั่วประเทศไทย รวม 11 ประชากร พบ อัลลีลที่เป็นเอกลักษณ์ของประชากรในยีนตำแหน่งต่าง ๆ โดยปลาจากภาคใต้ (ชุมพร และ ภูเก็ต) มี อัลลีล *Pgm** 113 ซึ่งไม่พบในปลาประชากรอื่น ๆ ปลาจากบัวใหญ่ และ พยัคฆภูมิพิสัย มี อัลลีล *Me** 95 และ 77 เป็นเอกลักษณ์ ส่วนที่เหลือ 7 ประชากร ซึ่งเป็นปลาจาก เชียงใหม่ เชียงราย ชัยนาท กรุงเทพฯ ระยอง ฉะเชิงเทรา และ ราชบุรี มี อัลลีลเอกลักษณ์ คือ

Est 100* (Takata และคณะ, 1993) แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษากับประชากรปลากะรังจากแหล่งอื่น ๆ อีกเพื่อเป็นการยืนยันความเฉพาะเจาะจง ของลักษณะดังกล่าว และอาจสามารถนำมาใช้ประโยชน์ใน การจำแนกชนิดของปลากะรังได้ต่อไป ดังเช่น การจำแนกชนิดของสัตว์น้ำหลายชนิดที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก โดยการศึกษาไอโซไซม์ เช่น กุ้งน้ำจืด *Palaemon paucidens* (Chow และ Fujio, 1985) ปลาบู่้ำจืด *Rhinogobius brunneus* (Masuda และคณะ, 1989) และ ปลาปากกลม Brook lamprey, *Lethenteron reissneri* (Yamasaki และ Goto, 1996)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยวิเคราะห์ไอโซไซม์ที่ได้ผลชัดเจน และถูกต้อง จำเป็นต้องศึกษาดำเนินงานของยีนที่มีความหลากหลาย และอยู่ในสภาวะหลากหลายรูปแบบจำนวนมากขึ้น และตัวอย่างจากแต่ละประชากรก็มีผลเช่นเดียวกัน เพราะจำนวนประชากร และวิธีการเก็บตัวอย่างที่เป็นตัวแทนที่ดีของประชากร จะทำให้ได้ผลการศึกษาถูกต้องยิ่งขึ้น รวมทั้งการนำเทคนิค อื่น ๆ ที่สามารถใช้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ได้ผลดี เช่น microsatellite DNA marker (Nugroho และคณะ, 1998) และ mitochondria cytochrome b marker (Gilles และคณะ, 2000) มาศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลากะรัง

เอกสารอ้างอิง

- พิสิทธิ์ วัชรมานะกุล และ คณิงนุช หนูวงศ์. 2541. ต้นทุนและผลตอบแทนของการเลี้ยงปลากะรังในกระชัง จังหวัดตรัง. ปัญหาพิเศษ, ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง, สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. ตรัง. 34 น.
- ไพโรจน์ สิริมนตราภรณ์. 2536. ชนิดปลากะรังที่นิยมเลี้ยงในภาคใต้. ใน สัมมนาวิชาการ เรื่องการ เพาะเลี้ยงปลากะรังในกระชัง. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา. สงขลา. 84 น.
- สมปอง หิรัญวัฒน์. 2537. การเลี้ยงปลากะรังในกระชังในประเทศไทย. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพมหานคร. 76 น.
- อิทธิพล จันทรเพ็ญ. 2531. การเพาะเลี้ยงปลากะรัง. โครงการหนังสือสร้างอาชีพสำหรับประชาชน: เพื่อนเกษตรกร. กรุงเทพมหานคร. 80 น.
- Gilles, A., A. Miquelis, J.P. Quignard and E. Faure. 2000. Molecular phylogeography of western Mediteranean dusky grouper *Epinephelus marginatus*. Life Sci. 323:195-205.
- Hara, M. and U. Na-Nakorn. 1996. Study on the genetic character of aquatic animals in Thailand using isozyme analysis. pp. 1-59. In Hara, M. and U. Na-Nakorn. Eds. Development Sustainable Aquaculture Technology in Southeast Asia. JIRCAS, Japan.
- Hedgecock, D and E.M. Bartley. 1988. Allozyme variation in Claifornia halibut, *Paralichthys californicus*. Calif. Fish and Geme., 74(2):119-127.
- Masuda, Y., T. Ozawa and S. Enami. 1989. Genetic differentiation among eight color types of the freshwater goby, *Rhinogobius brunneus*, from western Japan. Japan J. Ichtyol. 36(1):30-41.
- May, B and C.C. Krueger. 1990. Use of allozyme data for population analysis. pp. 157-172. In Whitmore, D.H. ed. Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management. CRC Press, Boston.
- Morizot, D.C. and M.E. Schmidt. 1990. Starch gel electrophoresis and histochemical Visualization of proteins. pp. 23-80. In Whitmore, D.H. ed. Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management. CRC Press, Boston.
- Na-Nakorn, U. 1998. Studies on genetic diversity and chromosome-set manipulation of Thai

walking catfish (*Clarias macrocephalus* Gunther). Ph.D. Thesis, Ehime United Graduated School.

- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number Of individuals. *Genetics*, 23:341-369.
- Nugroho, E., M. Takagi, K. Sugama and N. Taniguchi. 1998. Detection of GT repeats microsatellite loci and their polymorphism for grouper of the genus *Ephinephelus*. *Fish. Sci.* 64(5):836-837.
- Planes, S. and G. Lecaillon. 1998. Consequences of the founder effect in the genetic structure of introduced island coral reef fish populations. *Biol. J. Linn. Soc.* 63:537-552.
- Sugama, K., Tridjoko, Haryanti, S. Budi and F. Cholik. 1999. Genetic variation and population structure in the humpback grouper, *Cromileptes altivelis*, throughout its range in Indonesian waters. *IFR Journal* (1):32-38.
- Takata, K., M. Hoshino, W. Magtoon, N. Nadee and H. Uwa. 1993. Genetic differentiation of *Oryzias minutillus* in Thailand. *Japan J. Ich.*, 39:319-327.
- Ward, R.D., M. Woodwark and D.O. Skibinski. 1994. A comparison of genetic diversity levels marine, freshwater and anadromous fishes. *J. Fish Biol.* 44:213-232.
- Yamasaki, Y. and A. Goto. 1996. Genetic differentiation of *Lethenteron reissneri* population, with reference to the existence of discrete taxonomic entities. *Ichtyol. Res.* 43(3):283-299.

STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF ORANGE SPOTTED GROUPER (*Epinephelus coioides*) IN SOUTH OF THAILAND USING ISOZYME ANALYSIS

Worawut Koedprang¹ and Uthairat Na-Nakorn²

¹ Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala Institute of Technology e-mail : worawut2000@hotmail.com

² Department of Aquaculture, Faculty of Fishery, Kasetsart University e-mail : fmsum@ku.ac.th

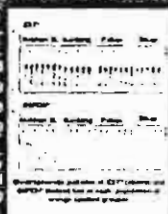
Abstract

Genetic differentiation among natural populations of orange spotted grouper in south of Thailand was detected. Four populations were collected from Sikao, Kantang and Palian (Trang province) and Pak Nakhon (Nakhon Si Thammarat province). Fifteen enzymes (AAT, ACP, EST, GPDH, G6PDH, IDH, LAP, LDH, MDH, ME, MPI, PGM, SDH, SP, 6PGD) were examined. The polymorphic loci revealed 2 loci, *EST** and *G6PDH**, in all populations, locus *SDH** in Nakhon Si Thammarat and Palian populations and locus *6PGD** in Nakhon Si Thammarat. The other six loci (*IDH**, *MDH-2**, *MPI**, *PGM**, *SDH** and *6PGD**) rare variously appeared in at least one population. The observed heterozygosity was in range in 0.039 to 0.060 and 0.045 in average. The genetic distance among four local populations varied from 0.00 to 0.108. The population differentiation presented not significant difference among three populations from Trang but revealed significant between Trang and Nakhon Si Thammarat populations.

Genetic variability of orange spotted grouper population

Population	n	P	A	A ₁	H _o	H _e	H _{o/H_e}	P'
Nakhon Si Thammarat	30	0.17	1.30	2.0	0.088	0.061	0.884	0.073
Sikao	30	0.09	1.22	2.0	0.032	0.041	1.281	0.479
Kantang	30	0.09	1.17	2.0	0.034	0.039	1.147	0.323
Palian	30	0.13	1.22	2.0	0.040	0.041	1.025	0.819
Average	30	0.12	1.23	2.0	0.044	0.048	1.004	

n = sample size, P = proportion of polymorphic loci, A = mean number of alleles per locus, A₁ = mean number of alleles per polymorphic locus, H_o = observed heterozygosity, H_e = expected heterozygosity, H_{o/H_e} = probability of Hardy-Weinberg equilibrium test



Orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*) widely distributed in coastal waters of tropical regions. They are favorite fish of Asian consumer, especially in Hong Kong, Taiwan, Singapore, Malaysia and Thailand. Orange spotted grouper are not only caught from natural waters, but are produced by cage culture. In order to increase the level of sustainable aquaculture production, it is necessary to know the genetic variability of the orange spotted grouper. The genetic population structure, related to the genetic diversity of the species, could be used as a basis for genetic improvement.



Methodology

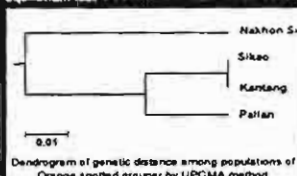
The natural orange spotted grouper samples were collected from four different locations, Sikao, Kantang and Palian in Trang province which the distance between each location is approximately 40 kilometers, face to Andaman sea. Another location was Ban Pak Nakhon in Nakhon Si Thammarat province, face to Gulf of Thailand.

The 30 samples from each location were enzyme analyzed using electrophoresis and isozyme band was stained with particular enzyme reagent. Fifteen enzymes (AAT, ACP, EST, GPDH, G6PDH, IDH, LAP, LDH, MDH, ME, MPI, PGM, SDH, SP, 6PGD) were examined. The allele frequency, heterozygosity and genetic distance were calculated using GENEPOP ver. 3.3 and PHYLIP ver. 3.6 programs.

Results

Twenty three isozyme loci were detected. The polymorphic loci revealed 2 loci, *EST** and *G6PDH**, in all populations, locus *SDH** in Nakhon Si Thammarat and Palian populations and locus *6PGD** in Nakhon Si Thammarat. A locus was considered polymorphic, if the frequency of the most common allele was not greater than 0.95. (Figure)

The other six loci (*IDH**, *MDH-2**, *MPI**, *PGM**, *SDH** and *6PGD**) rare variously appeared in at least one population. The private allele was found in Nakhon Si Thammarat population, locus *IDH** allele B and locus *PGM** allele B with allele frequency 0.966 and 0.016 respectively. The proportion of polymorphic loci were 0.17 in Nakhon Si Thammarat population, 0.09 in Sikao and Kantang populations, 0.13 in Palian population and 0.12 in average.



Dendrogram of genetic distance among populations of orange spotted grouper by UPGMA method

The observed heterozygosity was in range of 0.039 to 0.061 and 0.045 in average. The genetic distance among four local populations varied from 0.00 to 0.108 (Table).

The population differentiation presented not significant difference among three populations from Trang but revealed significant difference between Trang and Nakhon Si Thammarat populations.

Probabilities of population differentiation test between each population pair (above diagonal) and genetic distance (H _o) among populations (below diagonal) of orange spotted grouper	Nakhon Si Thammarat	Sikao	Kantang	Palian
Nakhon Si Thammarat		0.107	0.000	0.000
Sikao	0.107		0.000	0.000
Kantang	0.000	0.000		0.110
Palian	0.000	0.000	0.110	

Conclusion

The genetic variability of four populations presented low level of observed heterozygosity. However, allele frequency of all populations were equilibriums. Although, the distance of 0.1 considered to be indicate subspecies difference. The orange spotted grouper populations in present study indicate the difference of local races genetic among Trang and Nakhon Si Thammarat populations. They are isolated from each other by geographical reasons. Furthermore, to estimate accurate genetic diversity and genetic differentiation, more isozyme polymorphic loci should study. Moreover, the other molecular genetic markers, such as microsatellite DNA, mitochondrial DNA and etc., would be conduct to estimate effective genetic information of this species.

Acknowledgments

We would like to gratitude to the Thailand Research fund and Rajamangala Institute of Technology who supported a grant for this research.