

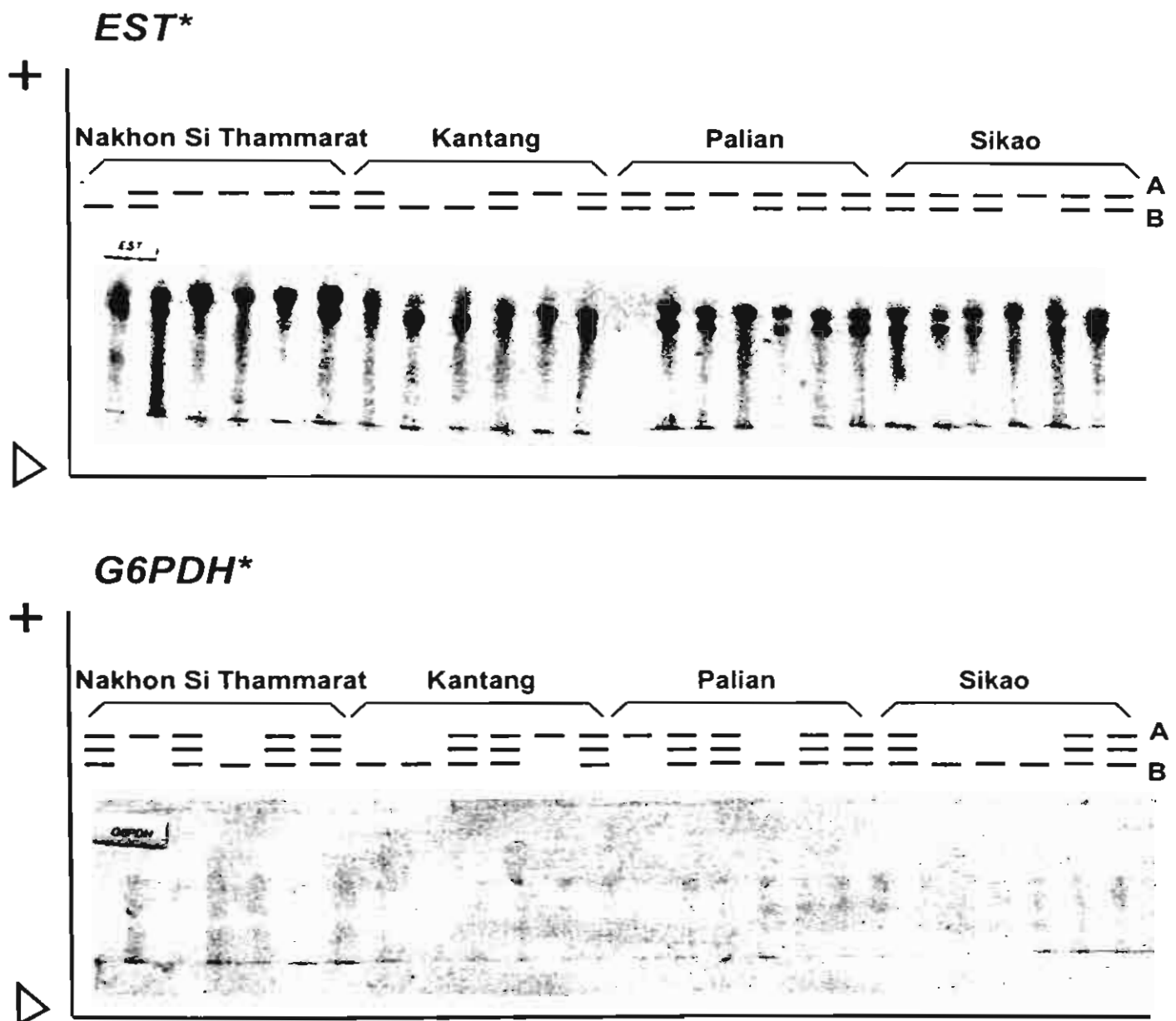


Figure 3. Electrophoretic patterns of *EST** (above) and *G6PDH** (below) loci in each population of Orange spotted grouper

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.)

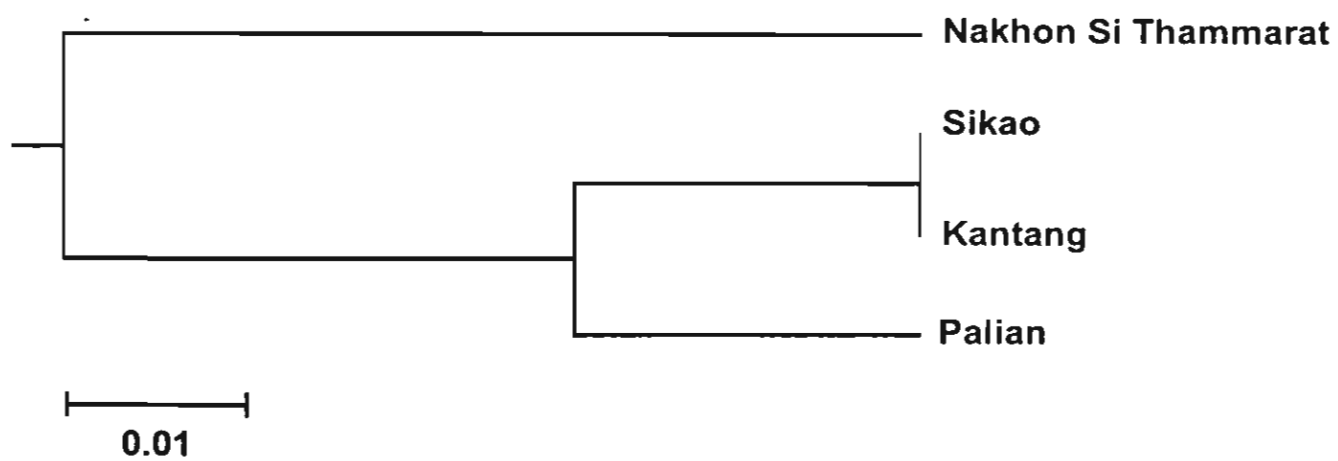


Figure 4. Dendrogram of genetic distance among population of Orange spotted grouper by UPGMA method

วิจารณ์ผล

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาไอโซไซม์

จากการศึกษาชนิดของเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ที่สามารถศึกษาผลได้อย่างชัดเจน คือ เนื้อเยื่อก้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อตับ เช่นเดียวกับที่ Hara และ Na-Nakorn (1996) ศึกษาเอนไซม์ ในปลากะรัง ชนิด Greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) โดยใช้เนื้อเยื่อก้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อตับ 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 พบอัลลีลที่แสดงสภาวะหลากหลายรูปแบบ 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 ตำแหน่งที่แสดงสภาวะหลากหลายรูปแบบ คือ ตำแหน่ง *ACP-1**, *IDH** และ *SOD-2** และ Sugama และคณะ (1999) ศึกษาใน ปลากะรัง ชนิด Humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) จำนวน 15 ตำแหน่ง พบ 3 ตำแหน่งที่แสดงสภาวะหลากหลายรูปแบบ 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

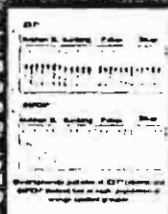
Abstract

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 _n	H _e	H _o	H _{e/H_o}	P'
Nakhon Si Thammarat	30	0.17	1.30	2.0	0.089	0.051	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, A_n = mean number of alleles per polymorphic locus, H_e = expected heterozygosity, H_o = observed heterozygosity, P' = 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 monitor the genetic variability of the orange spotted grouper. The genetic population structure, related to the genetic diversity of the species, could be observed by using isozyme analysis. This study aimed to improve the genetic variability of orange spotted grouper.



Methodology

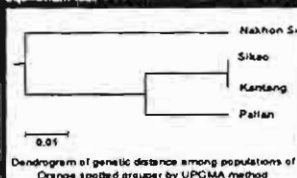
The natural orange spotted grouper samples were collected from four different locations, Sikao, Kantang and Palian in Trang province which the distance between each location is approximately 40 kilometers, face to Andaman sea. Another location was Ban Pak Nakhon in Nakhon Si Thammarat province, face 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 0.000 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 _e) 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		0.108
Palian	0.000	0.000	0.108	

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.