เอกสารวิชาการ ฉบับที่ ๒๓/๒๕๔๒

Technical Paper No.23/1999

โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปลาสลิดในประเทศไทย

Population Genetic Structures of the Snakeskin Gourami, *Trichogaster pectoralis* (Regan, 1910) in Thailand

นวลมณี พงศ์ธนา Nuanmanee Pongtana

แสงทอง ประเสริฐวิริยะกุล Sangthong Prasertwiriyakul

พุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล Puttharat Baoprasertkul

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ National Aquaculture Genetics Research Institute

กรมประมง Department of Fisheries

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ Ministry of Agriculture and Cooperatives

โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปลาสลิดในประเทศไทย

นวลมณี พงศ์ธนา แสงทอง ประเสริฐวิริยะกุล และ พุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความแตกต่างของประชากรปลาสลิดโดยศึกษาจากไอโซไซม์นั้น ควรทดสอบหาไอโซไซม์ ชนิดบัฟเฟอร์และอวัยวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบก่อน จากการนำตัวอย่างปลาสลิดมาตรวจหาไอโซไซม์ในบัฟเฟอร์ Tris – citrate pH 7.0 และ pH 8.0 และบัฟเฟอร์ Tris – EDTA – borate pH 8.0 และ pH 8.3 โดยทดสอบกับไอโซไซม์ 14 ชนิด คือ AAT, AK, EST, FUM, GCDH, PGI, HK, IDDH, MDH, ME, MPI, PGDH, PGM และ PK ใช้กล้ามเนื้อ ตับ ไต เลือด และหัวใจเป็นอวัยวะทดสอบ พบว่าตับเป็นอวัยวะที่สามารถใช้ตรวจหาไอโซไซม์เพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาสลิดได้มากที่สุดและให้ผลดีเมื่อใช้บัฟเฟอร์ Tris – citrate pH 8.0

จากการตรวจสอบไอโซไซม์ของประชากรปลาสลิดที่รวบรวมจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง ในจังหวัดสมุทรปราการ พิษณุโลก สุพรรณบุรี อุบลราชธานี และปัตตานี พบว่าประชากรปลาสลิดจากจังหวัดสมุทรปราการและพิษณุโลกมีค่า genetic identity สูงที่สุดเท่ากับ 0.985 ค่า genetic distance ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.015 ส่วนประชากรปลาสลิดจากจังหวัดพิษณุโลกและปัตตานีมีค่า genetic identity ต่ำสุดเท่ากับ 0.923 และมีค่า genetic distance สูงสุดเท่ากับ 0.080 แสดงให้เห็นว่าประชากรปลาสลิดจากจังหวัดสมุทรปราการและพิษณุโลกมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมากที่สุด

จากการศึกษาลักษณะภายนอกของประชากรปลาสลิดที่รวบรวมจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง พบว่าปลาสลิดจากจังหวัดพิษณุโลกมีลักษณะภายนอกแตกต่างจากปลาสลิดจากแหล่งอื่น ๆ มากที่สุด โดยมีค่าอัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวลำตัวมาตรฐานเท่ากับ 0.32 ส่วนปลาสลิดจากจังหวัดสมุทรปราการมีลักษณะภายนอกไม่แตกต่างจากปลาสลิดจากจังหวัดสุพรรณบุรี และปลาสลิดจากจังหวัดอุบลราชธานีมีลักษณะภายนอกไม่แตกต่างจากปลาสลิดจากจังหวัดปัตตานี โดยมีอัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวลำตัวมาตรฐานเท่ากับ 0.28 และ 0.27 ตามลำดับ

Population Genetic Structures of the Snakeskin Gourami, *Trichogaster pectoralis* (Regan, 1910) in Thailand

Nuanmanee Pongthana, Sangthong Prasertwiriyakul and Puttharat Baoprasertkul

Abstract

Population structures of the snakeskin gourami, *Trichogaster pectoralis* (Regan, 1910) could be distinguished by detecting isozyme differences, which depending on kinds of buffer, pH of buffer and the organ. This study used both Tris – Citrate buffer pH 7.0 and 8.0 and Tris – EDTA – Borate buffer pH 8.0 and pH 8.3 to test 14 enzymes, AAT, AK, EST, FUM, GCDH, PGI, HK, IDDH, MDH, ME, MPI, PGDH, PGM and PK, in five organs (muscle, liver, kidney, blood and heart). Most isozymes could be detected clearly in liver which showed clear bands when used Tris – Citrate buffer pH 8.0.

From the allozyme study on five populations of the snakeskin gourami collected from five locations in Thailand (Samutprakan, Pitsanulok, Suphanburi, Ubonratchathani and Pattanee), the highest genetic identity coefficients of 0.985 was found between Samutprakan and Pitsanulok populations. The lowest genetic identity coefficients of 0.923 was found between Pitsanulok and Pattanee populations. From the estimates of genetic identity coefficients and genetic distance coefficients of five populations, the Samutprakan and Pitsanulok populations had the lowest genetic distance, Pitsanulok and Pattanee populations had the highest genetic distance.

From the morphometric study on the five populations of the snakeskin gourami by comparing the ratio of head length and standard length, the fish from Pitsanulok was different from others. The fish from Samutprakan and Supanburi had the same head length and standard length ratio of 0.28 and the fish from Ubonrachathanee and Pattanee had the same ratio of 0.27.

สารบัญ

สารบาญตาราง

สารบาญภาพ

1. คำนำ

ปลาสลิด (Snakeskin gourami) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Trichogaster pectoralis* (Regan, 1910) เป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยชนิดหนึ่ง สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายชอบอาศัยอยู่ในน้ำนิ่ง ไม่ค่อยมีโรคและพยาธิมาเบียดเบียน ราคาดี รสชาติดี นิยมบริโภคทั้งสดและแห้ง มีไข่ดก อายุเพียง 6-7 เดือนก็สามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้ และเป็นปลาที่สามารถอาศัยในน้ำที่มีออกซิเจนต่ำ ๆ และสภาพดินเปรี้ยวได้ จากสถิติกรมประมง พ.ศ. 2538 ปลาสลิดให้ผลผลิตมากเป็นอันดับ 4 ของผลผลิตสัตว์น้ำจืดทั้งหมดประมาณ 16,713.65 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 613.4 ล้านบาท จังหวัดสมุทรปราการเป็นแหล่งที่มีผลผลิตปลาสลิดมากที่สุด (กรมประมง, 2541) ปลาสลิดที่เลี้ยงหรือพบในแหล่งน้ำธรรมชาติจากแต่ละจังหวัดมีลักษณะภายนอกแตกต่างกัน เช่น สี ลาย ความกว้างของลำตัว เป็นต้น ซึ่งอาจเป็นเพราะมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม อันเป็นผลทำให้ปลาสลิดจากแต่ละแหล่งมีการเจริญเติบโตและรสชาติแตกต่างกัน ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสลิดจากแหล่งน้ำต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ อันจะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงปลาสลิดต่อไป

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อศึกษาหาไอโซไซม์ ชนิดของบัฟเฟอร์และอวัยวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบประชากรปลาสลิด

2.2 เพื่อศึกษาหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง

2.3 เพื่อศึกษาลักษณะภายนอกของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง

3. การตรวจเอกสาร

ปลาสลิดหรือปลาใบไม้เป็นปลาไทยแท้ มีแหล่งกำเนิดอยู่ในที่ลุ่มภาคกลางของประเทศไทย พบในประเทศเพื่อนบ้านใกล้เคียงเช่นกัน เช่น ประเทศมาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ปากีสถาน อินเดีย พม่า ลาว เวียตนาม เป็นต้น ซึ่งมีหลักฐานว่าได้รับพันธุ์ปลาสลิดไปจากประเทศไทยตั้งแต่สมัยโบราณ (เจียมจิตต์, 2528) ดร.สมิท (Dr. Hugh M. Smith) อดีตนักมีนวิทยาระดับโลกได้บันทึกว่าปลาสลิดที่แพร่กระจายในประเทศมาเลเซียและสิงคโปร์นั้นเป็นพันธุ์ปลาจากเมืองไทย ซึ่งเป็นปลาสลิดที่ได้จากดอนกำยาน จังหวัดสุพรรณบุรี เป็นพันธุ์ปลาสลิดที่มีชื่อเสียง มีลักษณะเด่นคือ

Sparidae สามารถใช้ไอโซไซม์ MDH เป็นตัวตรวจสอบความแตกต่างของชนิดได้ และอวัยวะที่ใช้ตรวจสอบดีที่สุดคือกล้ามเนื้อ

Dey (1984) รายงานว่าปลา *Salmo gairdneri* มีระดับการทำงานของ MDH สูงสุดในกล้ามเนื้อและต่ำสุดในสมอง ซึ่งเป็นการสำรวจในปลาทุกกลุ่มอายุ Salvatorelli และคณะ (1987) รายงานว่าปลา *Sparus aurata* อายุ 45 วัน มีรูปแบบของไอโซไซม์ MDH คล้ายกับรูปแบบในตัวเต็มวัย ปลา *Diplodus sargus* อายุ 38 วัน ก็มีรูปแบบไอโซไซม์คล้ายกับตัวเต็มวัย (D' Amelio และคณะ, 1988) ปลา *D. puntazzo* อายุ 29 วัน มีรูปแบบไอโซไซม์เช่นเดียวกับตัวเต็มวัย (Basaglia และคณะ, 1990) ในปลา African cichlids พบว่า MDH ทำงานได้ดีในหลายอวัยวะ คือ ตา หัวใจ ตับ และกล้ามเนื้อ (Bank และคณะ, 1989) Farias และคณะ (1992) ศึกษาปลาตระกูล cichlids ใน Amazon hydrographic basin จำนวน 5 ชนิด ปรากฏว่ามีการแสดงออกของยีน 3 โลไซ คือ MDH–A, MDH–B และ MDH–C โดยจะพบ MDH–A ในทุกอวัยวะและจะพบมากที่ตับ ส่วน MDH – B พบในกล้ามเนื้อและตา

Koljonen (1986) ศึกษาปลา rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) 10 สายพันธุ์ โดย 5 สายพันธุ์มาจากฟาร์มที่เลี้ยงเป็นการค้าในประเทศฟินแลนด์ ส่วนอีก 5 สายพันธุ์มาจากสถานีเพาะเลี้ยงของรัฐ ใช้เทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซิสโดยใช้เอ็นไซม์ 9 ชนิด ซึ่งมียีนควบคุมทั้งสิ้น 20 โลไซ พบว่ามี 8 โลไซ ที่เป็นโพลีมอร์ฟิค สายพันธุ์พาณิชย์มีค่า genetic distance น้อยกว่าสายพันธุ์จากสถานีของรัฐ โดยค่าเฉลี่ย genetic distance ของสายพันธุ์จากสถานีของรัฐมีค่าเท่ากับ 0.0513 ส่วนสายพันธุ์พาณิชย์มีค่าเท่ากับ 0.0165

Creech (1991) ศึกษาปลา *Atherina boyeri* และ *A. presbyter* ด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟเรซิส พบว่าต่างชนิดกัน ซึ่งขัดแย้งกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยใช้เอ็นไซม์ 11 เอ็นไซม์และ general protein ทดสอบกับกล้ามเนื้อและตับ ผลปรากฏว่ามี 8 เอ็นไซม์ที่มีสภาพเป็นโพลีมอร์ฟิค โดยมียีนควบคุมทั้งหมด 16 โลไซ 40 อัลลีล โลกัสที่สามารถใช้จำแนกประชากรได้คือ โลกัส EST – 3 และโลกัส G3PDH ส่วนที่ตำแหน่งโลกัส PGM จะมีลักษณะที่เหมือนกันทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หา Nei' s genetic distance (D) ระหว่างกลุ่มประชากรของปลา *A. boyeri* และ *A. presbyter* ได้เท่ากับ 0.42 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปลาทั้ง 2 ชนิดนี้มีพันธุกรรมที่ไม่ชิดกัน

Teugels และคณะ (1992) ศึกษาปลา African clariid catfish จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Clarias anguillaris, C. ebriensis, C. gariepinus* และ *Heterobranchus longifilis* อวัยวะที่ใช้ศึกษาคือกล้ามเนื้อและตับ ใช้เอ็นไซม์ 10 เอ็นไซม์ คือ AAT, CK, FH, GPI, IDHP, LDH, MDH, PGDH, PGM และ SOD ปรากฏว่าปลา *C. anguillaris* และปลา *C. gariepinus* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่าปลา *C. ebriensis* ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับข้อมูลทางสัณฐาน รูปแบบเอ็นไซม์ PGM ของปลา *H. longifilis* คือ PGM–85 ส่วนรูปแบบเอ็นไซม์ PGM ของปลา *C.*

ตะไคร่น้ำ รำละเอียด หรือปลายข้าวต้มปนกับผักบุ้งที่หั่นแล้วเคล้ากับรำปั้นเป็นก้อน หรืออาจใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูป อาหารที่เหมาะสมสำหรับปลาวัยอ่อนซึ่งมีอายุตั้งแต่ 7 วัน ถึง 1 เดือน ควรเป็นตะไคร่น้ำหรือไรน้ำ และเมื่อปลาอายุได้ 21 วัน สามารถให้อาหารพวกรำข้าวละเอียดต้มปนกับผักบุ้งหั่นละเอียด แหนสดหรือปลวก (บุญยรัตน์, 2523)

<u>การแพร่ขยายพันธุ์</u>

การสังเกตลักษณะเพศของปลาสลิดนั้นสามารถสังเกตจากภายนอกได้ชัดเจน ปลาสลิดเพศผู้โดยทั่วไปจะมีสีเข้มและตัวยาวเรียวกว่าเพศเมีย สันหลังและสันท้องเกือบเป็นเส้นตรงขนานกัน มีครีบหลังยาวแหลมจรดหลังเลยโคนหาง ส่วนเพศเมียมีสันท้องยาวมนขนานกับสันหลัง และครีบหลังมนไม่แหลม และสั้นกว่าเพศผู้ พบปลาสลิดมีไข่แก่พร้อมที่จะแพร่ขยายพันธุ์ได้มีขนาดเล็กที่สุด 13 เซนติเมตร (บุญยรัตน์, 2523)

ปลาสลิดจะวางไข่ในช่วงฤดูฝนระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนกันยายน การวางไข่จะชุกราวเดือนสิงหาคมและเดือนกันยายน แต่ในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคมก็ยังมีการวางไข่เรื่อย ๆ มา ปลาสลิดสามารถวางไข่ได้ทั้งในบ่อธรรมชาติและบ่อซีเมนต์ และอาจวางไข่ได้ปีละ 2 ครั้งถ้าปลาสมบูรณ์ (บุญยรัตน์, 2523) โดยจะวางไข่ในแหล่งน้ำนิ่ง เพศผู้จะก่อหวอดในบริเวณที่มีพรรณไม้น้ำขึ้นไม่หนาแน่นมากนัก ปลาเพศผู้จะเริ่มก่อหวอดในตอนบ่ายจนถึงตอนสายของวันต่อมาจึงทำการผสมพันธุ์กับเพศเมีย โดยปลาเพศผู้ 1 ตัว จะผสมกับปลาเพศเมีย 1 ตัวเท่านั้น และปลาเพศผู้จะเป็นผู้รักษาไข่ (บุญยรัตน์, 2523) แม่ปลาสลิดแต่ละตัวจะมีไข่มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับขนาดและอายุของปลา กมลพร (2512) รายงานว่าแม่ปลาสลิดหนึ่งตัว จะมีไข่ตั้งแต่ 18,000 – 36,000 ฟอง วิทย์ (2509) รายงานว่าแม่ปลาสลิดหนึ่งตัว วางไข่โดยเฉลี่ย 36,933 ฟอง แม่ปลาสลิดวางไข่ปีละ 2 ครั้ง ไข่ปลาสลิดเป็นไข่ลอย มีสีเหลือง มีหยดน้ำมันใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 1.5 – 2.0 มิลลิเมตร (อุทัยรัตน์, 2536)

<u>การเพาะเลี้ยง</u>

เจียมจิตต์ (2528) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงปลาสลิดมีมากในจังหวัดสมุทรปราการและบางส่วนของจังหวัดฉะเชิงเทรา เป็นการเลี้ยงโดยอาศัยธรรมชาติอย่างแท้จริง ในหน้าน้ำก็วิดน้ำเข้านาและปล่อยปลาที่เก็บไว้ลงเลี้ยง เกษตรกรมักประสบปัญหาได้จำนวนลูกปลาไม่เพียงพอ ขาดแคลนน้ำ น้ำเค็มหนุน น้ำเปรี้ยวที่เกิดจากดิน ต่อมาได้มีการนำวิธีการเพาะเลี้ยงแบบใหม่เข้ามาช่วย คือการสร้างล้อมขนาดเล็กไม่เกิน 5 ไร่ สำหรับใช้เพาะพันธุ์ เพื่อป้องกันการขาดแคลนน้ำในช่วงหน้าแล้งและสะดวกต่อการให้อาหารและปุ๋ยตลอดจนแก้ปัญหาน้ำเค็ม น้ำเปรี้ยว หรือน้ำเสีย

3.2 เทคนิคอีเล็คโตรโฟเรซิส

ชีวโมเลกุล เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ โปรตีน นิวคลีโอไทด์และกรดนิวคลีอิก เป็นโมเลกุลซึ่งประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชั่นที่สามารถไอออนไนซ์น้ำแล้วได้หมู่ที่มีประจุไฟฟ้าได้ โปรตีนนั้นมีประจุได้เนื่องมาจากการไอออนไนซ์ของหมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิลและหมู่ฟังก์ชั่นในสายรอง (side chain) ของกรดอะมิโนที่ประกอบขึ้นเป็นโปรตีน ณ ค่าพีเอชหนึ่ง ๆ ของสารละลายกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะมีปริมาณประจุใกล้เคียงกัน แต่จะมีอัตราส่วนของประจุต่อมวล (charge / mass ratio) ต่างกัน เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน ความแตกต่างในปริมาณประจุสุทธิและความแตกต่างในอัตราส่วนของประจุต่อมวลนี้เป็นพื้นฐานอันสำคัญที่ทำให้ไอออนต่าง ๆ เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าด้วยความเร็วที่ไม่เท่ากัน เราเรียกการเคลื่อนที่ของไอออนในสนามไฟฟ้านี้ว่า "อิเล็คโตรโฟเรซิส"

อิเล็คโตรโฟเรซิสเป็นเทคนิคทางชีวเคมีที่มีประโยชน์อย่างกว้างขวาง นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านการแพทย์ สำหรับการชันสูตรโรค และการแยกชีวโมเลกุลต่าง ๆ รวมถึงการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูงในการแยกชีวโมเลกุลที่มีประจุซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์ เช่น โปรตีน เอนไซม์ ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ เป็นต้น การแยกสารเหล่านี้จะต้องเลือกใช้ชนิดของอิเล็คโตรโฟเรซิสที่เหมาะสม เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการแยกซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ หลักในการเลือกนั้นอาศัยความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารที่ต้องการจะแยก พร้อมทั้งพิจารณาเลือกใช้ชนิดของตัวกลางค้ำจุนที่เหมาะสมกับชนิดของสารดังกล่าว ในการแบ่งประเภทของอิเล็คโตรโฟเรซิสมีหลักเกณฑ์ในการแบ่งหลายประเภท ดังต่อไปนี้

แบ่งตามเทคนิคการใช้ออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1) อิเล็คโตรโฟเรซิสแบบอนุภาค เป็นการนำอิเล็คโตรโฟเรซิสไปใช้ในการศึกษาสมบัติของสารในทางเคมีฟิสิกส์ สารนั้นอาจจะเป็นสารประเภทสารแขวนลอย หรืออีมัลชั่น (emulsion) ซึ่งอยู่ในรูปของอนุภาคหรือหยดเล็กมากและต้องใช้กล้องจุลทรรศน์เพื่อติดตามการเคลื่อนที่อนุภาค เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาลักษณะพื้นผิวของจุลินทรีย์

2) อิเล็คโตรโฟเรซิสแบบขอบเคลื่อนที่ เป็นอิเล็คโตรโฟเรซิสชนิดแรกที่เริ่มมีบทบาทสำคัญในการศึกษาโมเลกุลทางชีวเคมี A. Tiselius นักชีวเคมีชาวสวีเดน เป็นผู้พัฒนาเทคนิคนี้

3) โซนอิเล็คโตรโฟเรซิส จะแตกต่างจากสองประเภทแรก คือ เป็นการศึกษาการเคลื่อนที่ของสารในสนามไฟฟ้าโดยมีตัวกลางที่เฉื่อย (inert) เป็นของแข็งหรือเจล เช่น กระดาษกรอง เซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate) สตาชเจล (starch gel) อาการ์ (agar) อากาโรส (agarose) และโพลิอะคริลอาไมด์ (polyacrylamide) โมเลกุลที่แยกออกจากกันจึงปรากฏเป็นแถบบนตัวกลางที่รองรับสารนั้นๆ เทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซิสประเภทโซนอิเล็คโตรโฟเรซิสนี้มีบทบาทสำคัญยิ่งที่ทำให้เกิดการเจริญพัฒนาในทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพทุก ๆ สาขา อีกทั้งมีบทบาทอย่างกว้างขวางใน

การแยกและตรวจสอบสารต่าง ๆ เพื่อการวินิจฉัยโรคและลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (วิไลลักษณ์ และคณะ, 2528)

แบ่งอิเล็คโตรโฟเรซิสตามชนิดของตัวกลางค้ำจุนออกเป็น 5 ประเภท ได้แก่

1) เปเปอร์อิเล็คโตรโฟเรซิส ใช้กระดาษเป็นตัวกลางค้ำจุน นิยมแยกสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่นกรดอะมิโน แต่ประสิทธิภาพการแยกต่ำกว่าชนิดอื่น

2) เซลลูโลส – อะซิเตทอิเล็คโตรโฟเรซิส ใช้เซลลูโลส – อะซิเตทเป็นตัวกลางค้ำจุน นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อชันสูตรโรคเพราะสะดวกรวดเร็ว แต่ราคาแพง

3) อากาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส ใช้อากาโรสเป็นตัวกลางค้ำจุน นิยมใช้แยกโปรตีนทางอิมมูนวิทยา

4) โพลิอะคริลอาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟเรซิส ใช้โพลิอะคริลอาไมด์เป็นตัวกลางค้ำจุน เป็นเทคนิคที่นิยมใช้แพร่หลายในการค้นคว้าทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพและวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ แต่ขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายสูง และผู้ปฏิบัติการต้องมีความชำนาญ

5) สตาชเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส Smithies เป็นนักวิทยาศาสตร์คนแรกที่นำสตาชเจลใช้เป็นตัวกลางค้ำจุนในการทำอิเล็คโตรโฟเรซิสสำหรับแยกโปรตีนในซีรั่ม

ตัวกลางค้ำจุนที่นำมาใช้กับเทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซิสแบบต่าง ๆ ส่วนมากเป็นสารที่มีคุณสมบัติเฉื่อย ไม่ทำปฏิกิริยาทางเคมีหรือฟิสิกส์กับสารที่ต้องการแยก และทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้สารซึ่งเคลื่อนที่แยกออกจากกันแล้วเคลื่อนกลับมาปนกันได้ง่าย โดยการทำให้สารดังกล่าวเคลื่อนที่ไปในทางที่จำกัด ตัวกลางค้ำจุนส่วนใหญ่จะเป็นสารที่มีรูพรุนขนาดใหญ่กว่าขนาดโมเลกุลของสารที่ต้องการแยก ดังนั้นสารจะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนได้อย่างอิสระ และจะเคลื่อนที่แยกจากกันตามความแตกต่างของจำนวนประจุบนโมเลกุล

3.3 หลักการแยกสารโดยวิธีสตาชเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส

กระบวนการอิเล็คโตรโฟเรซิสเป็นการเคลื่อนที่ของชีวโมเลกุลที่มีประจุจากขั้วไฟฟ้าขั้วหนึ่งไปในทิศทางตรงกันข้าม ในการวิเคราะห์และแยกโมเลกุลด้วยวิธีนี้จึงจำเป็นต้องจัดสภาพตัวทำละลายให้เหมาะสมเพื่อที่จะได้โมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้าสุทธิเป็นบวกหรือลบและมีประจุมากหรือน้อยตามต้องการ จึงจำเป็นต้องเข้าใจแนวคิดเรื่องพีเอช พีเค และการอิออนไนซ์ของหมู่ฟังก์ชั่นในชีวโมเลกุลแต่ละชนิด เพื่อที่จะได้วางแผนการทดลองได้อย่างเหมาะสม (Whitmore, 1990) องค์ประกอบที่ควรพิจารณาในการแยกสารโดยวิธีอิเล็คโตรโฟเรซิส ได้แก่ อนุภาคที่มีประจุ ตัวกลางค้ำจุนและสนามไฟฟ้า นอกจากนี้ต้องเลือกบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ประจุบนโมเลกุลเป็นประจุบวกหรือลบตามต้องการ และต้องคำนึงถึงความคงทนของโมเลกุลต่อสภาพแวดล้อมที่จะทำการทดลองด้วย เช่นโปรตีนหนึ่งอาจจะเสียสภาพง่ายเมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชสูง (เพื่อให้ได้ประจุสุทธิเป็น

ลบ) ก็อาจต้องเลือกใช้โปรตีนที่เป็นประจุบวกแทน การพิจารณาเลือกตัวกลางค้ำจุนที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญ เพราะต้องคำนึงถึงความสะดวกในการสกัดโมเลกุลที่แยกได้นั้นออกจากตัวกลางและควรให้เกิดการแพร่กระจายของสารที่แยกชัดเจนที่สุด สนามไฟฟ้าที่ใช้ต้องพิจารณาว่าจะกำหนดให้กระแสไฟฟ้าคงที่หรือความต่างศักย์คงที่ สำหรับงานวิเคราะห์ที่ใช้เวลาทำอิเล็คโตรโฟเรซิสน้อย เช่น แยกไอโซไซม์ (isozyme) ไลโพโปรตีน (lipoprotien) มักเลือกความต่างศักย์คงที่ เพื่อให้อนุภาคเคลื่อนที่เร็วที่สุด ลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ ลดอัตราเสี่ยงของการเสียสภาพของเอนไซม์ และลดอิทธิพลของการแพร่กระจาย (ธนิต, 2528)

<u>ขั้นตอนการทำสตาชเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส</u>

1) การรวบรวมและเก็บรักษาตัวอย่าง

การทำสตาชเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสกับไอโซไซม์ จะพบการสลายตัวของเอ็นไซม์ตั้งแต่ขั้นตอนการรวบรวมตัวอย่าง อัตราการสลายตัวของเอ็นไซม์จะแตกต่างกันไปตามชนิดของเอ็นไซม์ ดังนั้นการรวบรวมตัวอย่างจึงควรเก็บรักษาในน้ำแข็งแห้งตั้งแต่เริ่มทำการรวบรวมตัวอย่าง ถ้าต้องการเก็บรักษาตัวอย่างไว้นานประมาณ 2-3 วันหรือสัปดาห์เดียว ควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส แต่ถ้าต้องการเก็บรักษาตัวอย่างไว้นานกว่านั้นควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –40 ถึง -80 องศาเซลเซียส ถ้าตัวอย่างที่เก็บรักษามีขนาดเล็ก เช่น ปลาวัยอ่อนสามารถเก็บรักษาได้ทั้งตัว แต่ถ้าตัวอย่างมีขนาดใหญ่ควรเก็บรักษาแต่อวัยวะที่มีเอ็นไซม์ที่ต้องการทำการศึกษา อวัยวะที่นิยมใช้กันมากได้แก่ กล้ามเนื้อ หัวใจ ตับ ไต เลือด ครีบ และตา (Macaranas, 1991)

2) การเตรียมเนื้อเยื่อ

นำตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้มาปล่อยให้ละลายเองในอุณหภูมิปกติประมาณ 10-20 นาที ตัดตัวอย่างให้มีขนาดประมาณ 0.5 กรัม นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ และแช่ในช่องแช่แข็งเพื่อทำการย่อยสลาย จากนั้นนำไปทำการตกตะกอน การบรรจุตัวอย่างเพื่อทำอิเล็คโตรโฟเรซิสนิยมทำครั้งละ 20-30 ตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่างควรทำบนน้ำแข็งหรือในห้องเย็นเพื่อใช้ความเย็นในการรักษาไม่ให้เอ็นไซม์เกิดการสูญสลายไป (Wiseman,1987)

3) การเตรียมสตาชเจล

ชั่งแป้งตามปริมาณที่ต้องการใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีท่อสำหรับดูดอากาศออก ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ ละลายให้เข้ากัน ให้ความร้อนด้วยตะเกียงบุนเส็นจนสารละลายมีความหนืดมากขึ้นแล้วกลับค่อย ๆ ใสขึ้น ขณะที่ให้ความร้อนจะต้องทำการเขย่าให้เนื้อสารละลายเข้ากันและไม่ให้เนื้อแป้งจับเป็นก้อน ซึ่งจะขัดขวางการเคลื่อนที่ของอนุภาคในตัวกลาง (Macaranas, 1991) เมื่อให้ความร้อนจนกระทั่งใกล้เดือดแต่ไม่ถึงจุดเดือด นำมาดูดอากาศในสารละลายออกให้หมดโดยการปั๊มอากาศออก ถ้าดูดอากาศออกไม่หมดฟองอากาศจะไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของอนุภาคในตัวกลาง (Whitmore, 1990) จากนั้นนำสารละลายมาเทลงบนโมลด์ (mold) ที่เตรียมไว้ ระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

ขึ้นระหว่างการเท นำกระจกมาปิดทับหน้าเพื่อให้แผ่นเจลเรียบ ทิ้งเจลไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง กิ่งก้านสาขาของโมเลกุลอะไมโลเปกตินในแป้งจะเกี่ยวพันกันทำให้เกิดเป็นเจล (วิไลลักษณ์, 2528) ก่อนจะทำการบรรจุตัวอย่างลงบนแผ่นเจล ให้นำแผ่นเจลมาแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 – 60 นาที นำเจลมาตัดออกเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งมีขนาดใหญ่ให้เป็นขั้วบวก ส่วนเล็กให้เป็นขั้วลบ บรรจุตัวอย่างโดยนำกระดาษกรองชิ้นเล็ก ๆ ขนาดเท่า ๆ กันมาจุ่มในเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้ ปล่อยให้สารละลายจากเนื้อเยื่อซึมเข้ากระดาษ นำกระดาษกรองเหล่านั้นมาบรรจุลงแผ่นที่ตัดแบ่งไว้เป็นสองส่วน โดยใส่ตรงบริเวณที่ตัดแบ่งไว้ ให้ปลายกระดาษด้านหนึ่งติดไว้กับพื้นกระจก และอีกปลายหนึ่งให้พ้นหน้าเจลชิ้นใหญ่ หลังจากนั้นก็ประกบชิ้นเจลทั้งสองให้แนบชิดกัน

นำเจลมาวางบนตรงกลางของอ่างบัฟเฟอร์ (electrophoresis chamber) ใช้ปลายด้านหนึ่งของกระดาษหรือผ้าจุ่มกับบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ในอ่างบัฟเฟอร์ ส่วนอีกด้านหนึ่งวางบนแต่ละด้านของขอบเจลเพื่อให้กระแสไฟวิ่งได้อย่างทั่วถึง นำอ่างบัฟเฟอร์มาต่อเข้ากับเครื่องจ่ายไฟ (power supply) ตั้งกระแสไฟฟ้าหรือความต่างศักย์ไฟฟ้าให้คงที่ และตั้งเวลาที่ต้องการทำอิเล็คโตรโฟเรซิสประมาณ 3-5 ชั่วโมง ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและ pH ของบัฟเฟอร์ เมื่อครบกำหนดเวลาก็นำแผ่นเจลมาตัดเป็นแผ่นบาง ๆ ทำการย้อมด้วยสีหรือเอ็นไซม์ที่เตรียมไว้ ก็จะสามารถเห็นแถบการเคลื่อนที่ของเอ็นไซม์ที่ต้องการศึกษาได้

3.4 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

Furguson และ Mason (1981) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลา brown trout บริเวณชายฝั่งตะวันตกของประเทศไอร์แลนด์ พบปลา brown trout 4 สายพันธุ์ โดยดูจากลักษณะภายนอก ได้แก่ Ferox, Gillaroo, Sonaghen และ Normal brown trout จากการศึกษาตาของปลาจากทุกแหล่ง ๆละ 30 ตัวอย่าง พบว่ามี 3 โลไซ ที่บอกความแตกต่างของแต่ละประชากร ปลาในทะเลสาบแห่งสุดท้ายที่ห่างจากแหล่งอื่น ๆ มากมีค่าทางพันธุกรรมแตกต่างไปอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งอาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมที่ต่างกันออกไปมีผลทำให้สัตว์น้ำมีพันธุกรรมเปลี่ยนไปจากเดิม

Basaglia (1990) ศึกษาปลาในครอบครัว Sparidae จำนวน 15 ชนิด โดยวิธีอิเล็คโตรโฟเรซิสในไอโซไซม์ MDH โดยใช้อวัยวะ 7 อวัยวะในการศึกษา พบว่ารูปแบบการทำงานของไอโซไซม์ในปลา 2 ชนิด คือ *Sparus aurata* และ *S. pagrus* มีรูปแบบที่เหมือนกัน แสดงให้เห็นว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่าชนิดอื่น ๆ ในขณะที่ชนิดอื่น ๆ เมื่อศึกษาในส่วนของ retina จะมีรูปแบบการทำงานของไอโซไซม์ MDH ที่เฉพาะเจาะจงแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน และในส่วนของหัวใจพบว่ามีเพียง soluble MDH เท่านั้นที่ทำงานในปลา 5 ชนิดนี้ คือ *Pagellus acarne, Diplodus annularis, D. vulgaris, Boops boops,* และ *Sarpa salpa* สรุปได้ว่าปลาในครอบครัว

Sparidae สามารถใช้ไอโซไซม์ MDH เป็นตัวตรวจสอบความแตกต่างของชนิดได้ และอวัยวะที่ใช้ตรวจสอบดีที่สุดคือกล้ามเนื้อ

Dey (1984) รายงานว่าปลา *Salmo gairdneri* มีระดับการทำงานของ MDH สูงสุดในกล้ามเนื้อและต่ำสุดในสมอง ซึ่งเป็นการสำรวจในปลาทุกกลุ่มอายุ Salvatorelli และคณะ (1987) รายงานว่าปลา *Sparus aurata* อายุ 45 วัน มีรูปแบบของไอโซไซม์ MDH คล้ายกับรูปแบบในตัวเต็มวัย ปลา *Diplodus sargus* อายุ 38 วัน ก็มีรูปแบบไอโซไซม์คล้ายกับตัวเต็มวัย (D' Amelio และคณะ, 1988) ปลา *D. puntazzo* อายุ 29 วัน มีรูปแบบไอโซไซม์เช่นเดียวกับตัวเต็มวัย (Basaglia และคณะ, 1990) ในปลา African cichlids พบว่า MDH ทำงานได้ดีในหลายอวัยวะ คือ ตา หัวใจ ตับ และกล้ามเนื้อ (Bank และคณะ, 1989) Farias และคณะ (1992) ศึกษาปลาตระกูล cichlids ใน Amazon hydrographic basin จำนวน 5 ชนิด ปรากฏว่ามีการแสดงออกของยีน 3 โลไซ คือ MDH–A, MDH–B และ MDH–C โดยจะพบ MDH–A ในทุกอวัยวะและจะพบมากที่ตับ ส่วน MDH – B พบในกล้ามเนื้อและตา

Koljonen (1986) ศึกษาปลา rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) 10 สายพันธุ์ โดย 5 สายพันธุ์มาจากฟาร์มที่เลี้ยงเป็นการค้าในประเทศฟินแลนด์ ส่วนอีก 5 สายพันธุ์มาจากสถานีเพาะเลี้ยงของรัฐ ใช้เทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซิสโดยใช้เอ็นไซม์ 9 ชนิด ซึ่งมียีนควบคุมทั้งสิ้น 20 โลไซ พบว่ามี 8 โลไซ ที่เป็นโพลีมอร์ฟิค สายพันธุ์พาณิชย์มีค่า genetic distance น้อยกว่าสายพันธุ์จากสถานีของรัฐ โดยค่าเฉลี่ย genetic distance ของสายพันธุ์จากสถานีของรัฐมีค่าเท่ากับ 0.0513 ส่วนสายพันธุ์พาณิชย์มีค่าเท่ากับ 0.0165

Creech (1991) ศึกษาปลา *Atherina boyeri* และ *A. presbyter* ด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟเรซิส พบว่าต่างชนิดกัน ซึ่งขัดแย้งกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยใช้เอ็นไซม์ 11 เอ็นไซม์และ general protein ทดสอบกับกล้ามเนื้อและตับ ผลปรากฏว่ามี 8 เอ็นไซม์ที่มีสภาพเป็นโพลีมอร์ฟิค โดยมียีนควบคุมทั้งหมด 16 โลไซ 40 อัลลีล โลกัสที่สามารถใช้จำแนกประชากรได้คือ โลกัส EST – 3 และโลกัส G3PDH ส่วนที่ตำแหน่งโลกัส PGM จะมีลักษณะที่เหมือนกันทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หา Nei' s genetic distance (D) ระหว่างกลุ่มประชากรของปลา *A. boyeri* และ *A. presbyter* ได้เท่ากับ 0.42 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปลาทั้ง 2 ชนิดนี้มีพันธุกรรมที่ไม่ชิดกัน

Teugels และคณะ (1992) ศึกษาปลา African clariid catfish จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Clarias anguillaris, C. ebriensis, C. gariepinus* และ *Heterobranchus longifilis* อวัยวะที่ใช้ศึกษาคือกล้ามเนื้อและตับ ใช้เอ็นไซม์ 10 เอ็นไซม์ คือ AAT, CK, FH, GPI, IDHP, LDH, MDH, PGDH, PGM และ SOD ปรากฏว่าปลา *C. anguillaris* และปลา *C. gariepinus* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่าปลา *C. ebriensis* ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับข้อมูลทางสัณฐาน รูปแบบเอ็นไซม์ PGM ของปลา *H. longifilis* คือ PGM–85 ส่วนรูปแบบเอ็นไซม์ PGM ของปลา *C.*

gariepinus คือ PGM–100 และลูกผสมของทั้งสอง species มีรูปแบบเอ็นไซม์ PGM เป็น PGM 85/100 คือมีลักษณะร่วมของทั้งสองชนิด และเมื่อวิเคราะห์ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของปลา *C. ebriensis* เปรียบเทียบกับอีก 3 ชนิด พบว่ามีค่าถึง 0.75 ซึ่งแสดงว่าปลา *C. ebriensis* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากปลาชนิดอื่นอย่างมาก

4. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

4.1 สัตว์ทดลอง

ปลาที่ใช้ในการศึกษาคือ ปลาสลิด (*Trichogaster pectoralis*, Regan 1910) ซึ่งเก็บรวบรวมจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง ได้แก่สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดสมุทรปราการ ฟาร์มปลาสลิดในจังหวัดพิษณุโลก ฟาร์มปลาสลิดในจังหวัดสุพรรณบุรี สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดอุบลราชธานี และป่าพรุจังหวัดปัตตานี (ภาพที่ 1) จังหวัดละ 50 ตัว ปลามีขนาดประมาณ 9.8-17.4 เซนติเมตร จัดเก็บรักษาตัวอย่าง แยกเป็นส่วนของอวัยวะกล้ามเนื้อ หัวใจ ตับ ไตและเลือด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –70 ถึง –80 องศาเซลเซียส

4.2 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

4.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง ได้แก่

1) น้ำแข็งแห้ง (dry ice)

2) ยาสลบ (quinadine)

4.2.2 สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่

1) สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-EDTA –Borate

2) สารละลายบัฟเฟอร์ Tris citrate

ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์แสดงรายละเอียดในภาคผนวก

4.2.3 ไอโซไซม์ที่ใช้ในการตรวจสอบ ได้แก่

1) Aspartate amino transferases (AAT) ; E.C. 2.6.1.1

2) Adenylate kinase (AK) ; E.C. 2.7.4.3

3) Esterase (EST) ; E.C. 3.1.1.1

4) Fumarate hydratase (FUM) ; E.C. 4.2.1.2

5) Glucose dehydrogenase (GCDH) ;E.C. 1.1.1.47

6) Hexokinase (HK) ; E.C. 2.7.1.1

7) L – Iditol dehydrogenase (IDDH) ; E.C. 1.1.1.44

8) Malate dehydrogenase (MDH) ' E.C. 1.1.1.37

9) Malic enzyme (ME) ; E.C. 1.1.1.40

10) Mannose-6-phosphate isomerase (MPI) ; E.C. 5.3.1.8

11) Glucosephosphate isomerase (GPI) ; E.C. 5.3.1.9

12) Phosphogluconate dehydrogenase (PGDH) ; E.C. 1.1.1.14

13) Phosphoglucomutase (PGM) ; E.C. 5.4.2.2

14) Pyruvate kinase (PK) ; E.C. 2.7.1.40

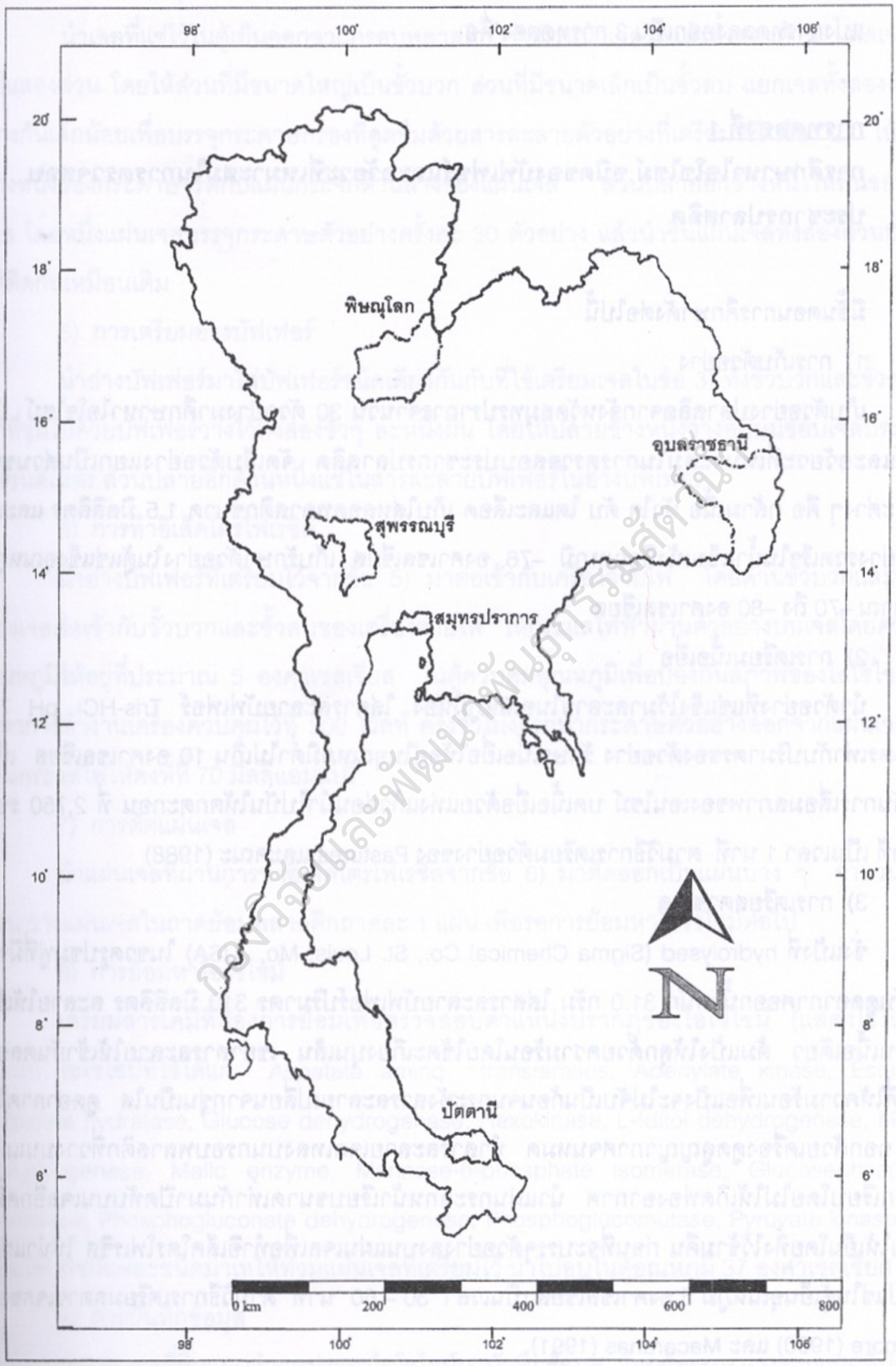
ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสีย้อมของแต่ละไอโซไซม์แสดงไว้ในภาคผนวก

4.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสตาชเจล (Starch gel) ได้แก่

1) Hydrolysed starch

2) สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-EDTA-Borate และ Tris citrate

4.2.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ไอโซไซม์ด้วยวิธีเล็คโตรโฟเรซิส ได้แก่ อ่างบัฟเฟอร์ (buffer chamber) เครื่องจ่ายไฟ (power supply) homogenizer ผ้าขนหนูชนิดบาง แผ่นพลาสติก กระดาษกรอง ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิขณะทำอิเล็คโตรโฟเรซิส เครื่องแก้ว กรรไกรผ่าตัด มีดผ่าตัด เครื่องชั่ง ตะเกียงบุนเส็น เครื่องดูดอากาศ ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (-70 หรือ –80 องศาเซลเซียส)



<u>ภาพที่ 1</u> แผนที่แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างปลาสลิดจำนวน 5 แหล่ง

4.3 วิธีการ

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ

<u>การทดลองที่ 1</u>

การศึกษาหาไอโซไซม์ ชนิดของบัฟเฟอร์และอวัยวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบประชากรปลาสลิด

มีขั้นตอนการศึกษาดังต่อไปนี้

1) การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปลาสลิดจากจังหวัดสมุทรปราการจำนวน 30 ตัวอย่างมาศึกษาหาไอโซไซม์ บัฟเฟอร์และอวัยวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบประชากรปลาสลิด จัดเก็บตัวอย่างแยกเป็นส่วนของอวัยวะต่างๆ คือ กล้ามเนื้อ หัวใจ ตับ ไตและเลือด เก็บใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร และแช่แข็งอย่างรวดเร็วในน้ำแข็งแห้งที่อุณหภูมิ –76 องศาเซลเซียส เก็บรักษาตัวอย่างในตู้แช่แข็งอุณหภูมิประมาณ –70 ถึง –80 องศาเซลเซียส

2) การเตรียมเนื้อเยื่อ

นำตัวอย่างที่แช่แข็งไว้มาละลายในอุณหภูมิห้อง ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 7.0 ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของตัวอย่าง รักษาเนื้อเยื่อให้อยู่ในอุณหภูมิต่ำไม่เกิน 10 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ บดเนื้อเยื่อด้วยแท่งแก้วก่อนนำไปปั่นให้ตกตะกอน ที่ 2,750 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตามวิธีการเตรียมตัวอย่างของ Pastures และคณะ (1988)

3) การเตรียสตาชเจล

ซั่งแป้งที่ hydrolysed (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) ในขวดรูปชมพู่ที่มีท่อสำหรับดูดอากาศออกน้ำหนัก 31.0 กรัม ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 310 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว ต้มแป้งให้สุกด้วยความร้อนโดยใช้ตะเกียงบุนเส็น เขย่าสารละลายให้เข้ากันตลอดเวลาที่ให้ความร้อนเพื่อแป้งจะไม่จับเป็นก้อนจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากขุ่นเป็นใส ดูดอากาศในเจล ออกด้วยเครื่องดูดสูญญากาศจนหมด นำสารละลายเจลเทลงบนกรอบพลาสติกที่วางบนแผ่นกระจกเรียบโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ นำแผ่นกระจกหน้าเรียบขนาดเท่ากันมาปิดทับบนเจลอีกครั้ง ปล่อยให้เย็นโดยทิ้งไว้ข้ามคืน ก่อนที่จะบรรจุตัวอย่างลงบนแผ่นเจลเพื่อทำอิเล็คโตรโฟเรซิส ให้นำแผ่นเจลไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 – 60 นาที ตามวิธีการเตรียมสตาชเจลของ Whitmore (1990) และ Macaranas (1991)

สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ ได้แก่ Tris-EDTA-Borate pH 8.0 และ pH 8.3 และ Tris Citrate pH 7.0 และ pH 8.0

4) การบรรจุตัวอย่าง

นำเจลที่แช่ไว้ในตู้เย็นออกจากกรอบพลาสติก ซับผิวหน้าเจลให้แห้งทั้งสองด้าน ตัดเจลออกเป็นสองส่วน โดยให้ส่วนที่มีขนาดใหญ่เป็นขั้วบวก ส่วนที่มีขนาดเล็กเป็นขั้วลบ แยกเจลทั้งสองส่วนให้ห่างกันเล็กน้อยเพื่อบรรจุกระดาษกรองที่ดูดซึมด้วยสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 2) ให้ปลายข้างหนึ่งของกระดาษจรดกับแผ่นกระจกด้านล่างของแผ่นเจล ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งให้พ้นขอบหน้าเจล โดยหนึ่งแผ่นเจลบรรจุกระดาษตัวอย่างครั้งละ 30 ตัวอย่าง แล้วนำชิ้นแผ่นเจลทั้งสองส่วนประกบให้ติดกันเหมือนเดิม

5) การเตรียมอ่างบัฟเฟอร์

นำอ่างบัฟเฟอร์มาใส่บัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้เตรียมเจลในข้อ 3) ทั้งขั้วบวกและขั้วลบ นำผ้าที่ชุ่มไปด้วยบัฟเฟอร์วางไว้ทั้งสองขั้วๆ ละหนึ่งผืน โดยให้ปลายข้างหนึ่งวางอยู่บนขอบเจลประมาณ 1 เซนติเมตร ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ในอ่างบัฟเฟอร์

6) การทำอิเล็คโตรโฟเรซิส

นำอ่างบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้จากข้อ 5) มาต่อเข้ากับเครื่องจ่ายไฟ โดยด้านขั้วบวกและขั้วลบของเจลต่อเข้ากับขั้วบวกและขั้วลบของเครื่องจ่ายไฟ ให้กระแสไฟฟ้าผ่านตัวอย่างบนเจลโดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ประมาณ 5 องศาเซลเซียส ในตู้ควบคุมอุณหภูมิเพื่อป้องกันสภาพของไอโซไซม์ ตั้งเวลาการทำงานเครื่องควบคุมไว้ที่ 300 โวลท์ ครึ่งชั่วโมงแรกนำกระดาษตัวอย่างออกจากแผ่นเจลแล้วเพิ่มกระแสไฟให้คงที่ที่ 70 มิลลิแอมแปร์

7) การตัดแผ่นเจล

นำแผ่นเจลที่ผ่านการทำอิเล็คโตรโฟเรซิสจากข้อ 6) มาตัดออกเป็นแผ่นบาง ๆ จำนวน 3-4 แผ่น วางแผ่นเจลในถาดย้อมพลาสติกถาดละ 1 แผ่น เพื่อรอการย้อมหาไอโซไซม์ต่อไป

8) การย้อมหาไอโซไซม์

เตรียมสารเคมีที่ต้องการย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งปรากฏของไอโซไซม์ (แสดงไว้ในภาคผนวก) ไอโซไซม์ที่ใช้ได้แก่ Aspatate amino transferases, Adenylate kinase, Esterase, Fumarate hydratase, Glucose dehydrogenase, Hexokinase, L-Iditol dehydrogenase, Malate dehydrogenase, Malic enzyme, Mannose-6-phosphate isomerase, Glucosephosphate isomerase, Phosphogluconate dehydrogenase, Phosphoglucomutase, Pyruvate kinase นำสีย้อมไอโซไซม์แต่ละชนิดมาเทให้ท่วมแผ่นเจลที่เตรียมไว้ นำไปอบในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

9) การบันทึกข้อมูล

นำแผ่นเจลที่ขึ้นแถบตำแหน่งของไอโซไซม์มาบันทึกข้อมูล โดยวัดระยะห่างจากแถบที่ปรากฏระหว่างจุดที่บรรจุตัวอย่างกับจุดที่เกิดแถบ จดบันทึกชนิดอวัยวะ ไอโซไซม์ และบัฟเฟอร์ที่ทำการศึกษา

<u>การทดลองที่ 2</u>

ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง

มีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

1) ขั้นตอนการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่ตัวอย่างปลาสลิดรวบรวมจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง ใน 5 จังหวัด ได้แก่ สมุทรปราการ สุพรรณบุรี พิษณุโลก อุบลราชธานีและปัตตานี แหล่งละ 50 ตัว โดยใช้อวัยวะ ชนิดของบัฟเฟอร์ และสารเคมีที่ตรวจสอบไอโซไซม์ที่เหมาะสมซึ่งได้จากผลการทดลองที่ 1 มาศึกษา

2) การกำหนดสัญลักษณ์ของอัลลีลต่างๆ ใช้ตำแหน่งของแถบที่เกิดขึ้นมากที่สุดเป็นตำแหน่งมาตรฐาน วัดระยะจากแถบดังกล่าวจนถึงจุดเริ่มต้น (จุดที่บรรจุตัวอย่าง) แล้วเทียบให้เท่ากับ 100 ส่วนตำแหน่งของแถบอื่นๆ ให้วัดระยะแล้วเทียบอัตราส่วนจากแถบมาตรฐาน ซึ่งถ้าแถบนี้อยู่ไกลจากจุดบรรจุตัวอย่างมากกว่าแถบมาตรฐาน ก็จะมีค่ามากกว่า 100 และถ้าแถบนั้นอยู่ใกล้จุดบรรจุตัวอย่างมากกว่าแถบมาตรฐานก็จะมีค่าน้อยกว่า 100

3) การหาค่าความถี่อัลลีล (Allele frequency) นับจำนวนตัวอย่างที่เกิดแถบใดๆ แล้วนำมาคำนวณโดยใช้สูตร

ความถี่อัลลีล = $(2 H_o + H_e) / 2N$

H_o คือจำนวนตัวอย่างที่มียีนในสภาพโฮโมไซกัส (Homozygous)

H_e คือจำนวนตัวอย่างที่มียีนในสภาพเฮตเทอโรไซกัส (Heterozygous)

N คือจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาที่ไอโซไซม์นั้นๆ

4) นำค่าความถี่อัลลีลที่โลไซต่างๆ มาเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการวิเคราะห์หาค่าทางพันธุกรรม (Genetic values) เช่น ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ ค่า genetic identity ค่า genetic similarity ค่า genetic distance และวิเคราะห์ cluster analysis โดยใช้โปรแกรม Biosys-1 (Swofford, 1989)

<u>การทดลองที่ 3</u>

ศึกษาลักษณะภายนอกของปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง

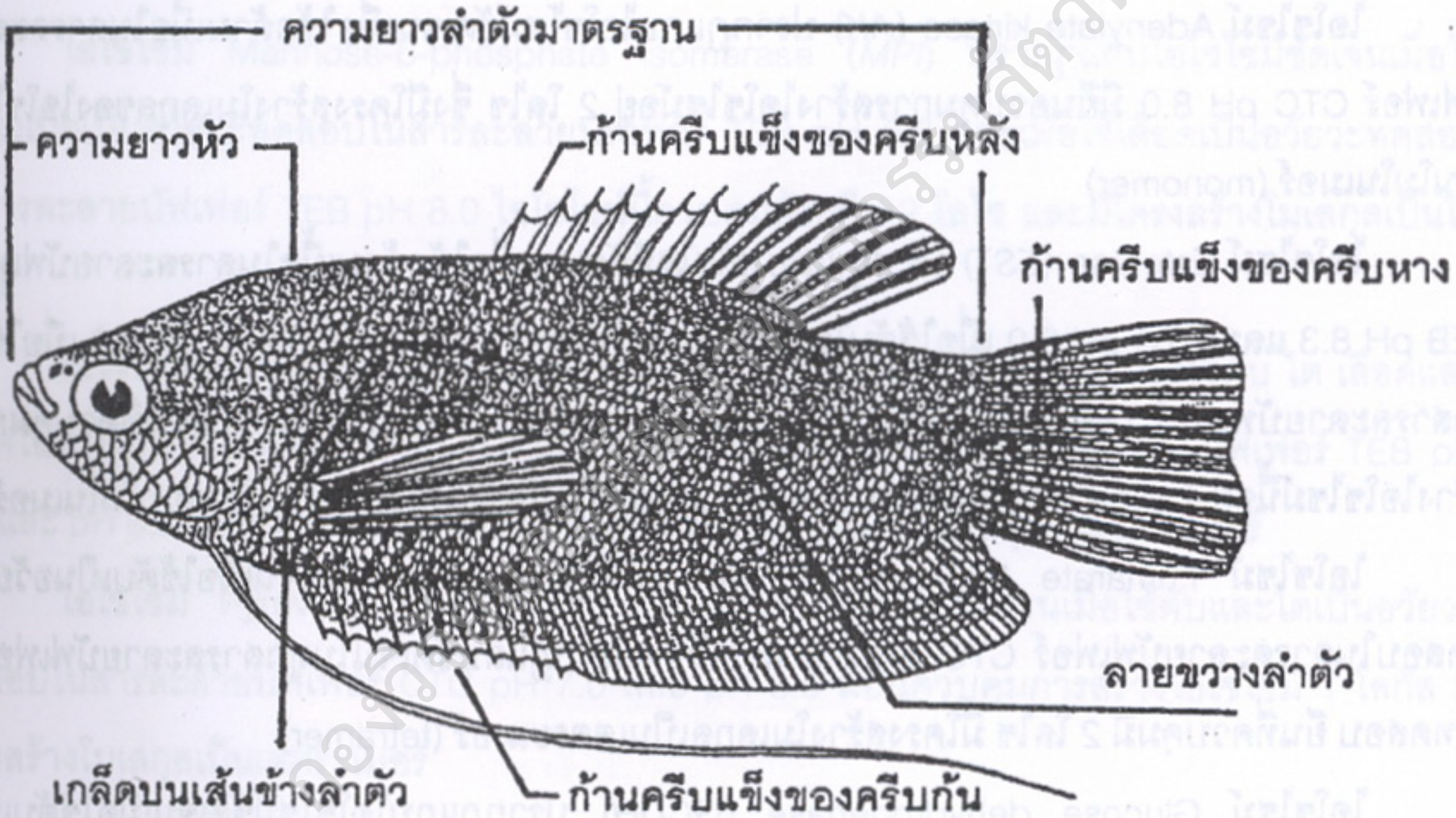
ลักษณะภายนอกที่ศึกษาได้แก่ ความยาวลำตัวมาตรฐาน ความยาวส่วนหัว จำนวนลายขวางลำตัว จำนวนก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อนของครีบหลัง ครีบก้น และครีบหาง จำนวนเกล็ดบนเส้นข้างลำตัว (ภาพที่ 2) โดยใช้โปรแกรม SPSS/PC+ for Windows version 6 (ธวัชชัย,2537) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติจากค่าอัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวลำตัวมาตรฐาน

4.4 สถานที่ทำการทดลอง

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ จังหวัดปทุมธานี

4.5 ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนมกราคม พ.ศ. 2537 และสิ้นสุดการทดลองเดือนธันวาคม พ.ศ. 2540



<u>ภาพที่ 2</u> ลักษณะภายนอกของปลาสลิดที่ทำการศึกษา

5. ผลการศึกษา

<u>การทดลองที่ 1</u>

ศึกษาหาไอโซไซม์ ชนิดของบัฟเฟอร์ และอวัยวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบประชากรปลาสลิด

จากการศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบไอโซไซม์ของปลาสลิด โดยใช้กล้ามเนื้อ ตับ ไต เลือดและหัวใจเป็นอวัยวะทดสอบและใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-citrate (CTC) pH 7.0 และ pH 8.0 และ Tris-EDTA-borate (TEB) pH 8.0 และ pH 8.3 ทดสอบการปรากฏแถบของไอโซไซม์ 14 ชนิด ซึ่งได้ผลดังต่อไปนี้

ไอโซไซม์ Aspartate amino transferases (*AAT*) ไม่ปรากฏแถบของไอโซไซม์ ที่อวัยวะใด ๆ

ไอโซไซม์ Adenylate kinase (*AK*) ปรากฏแถบไอโซไซม์ชัดเจนเมื่อใช้กล้ามเนื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 8.0 มียีนควบคุมการสร้างไอโซไซม์อยู่ 2 โลไซ ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลของไอโซไซม์เป็นโมโนเมอร์ (monomer)

ไอโซไซม์ Esterase (*EST*) ปรากฏแถบไอโซไซม์ชัดเจนเมื่อใช้กล้ามเนื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ TEB pH 8.3 และ CTC pH 8.0 เมื่อใช้ตับในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 7.0 และ pH 8.0 เมื่อใช้ไตในสารละลายบัฟเฟอร์ TEB pH 8.3 และ CTC pH 8.0 ในกล้ามเนื้อ ไตและหัวใจ มียีนที่ควบคุมการสร้างไอโซไซม์นี้อยู่ 1 โลกัส ส่วนตับมียีนควบคุมอยู่ 3 โลไซซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบโมโนเมอร์

ไอโซไซม์ Fumarate hydratase (*FUM*) ปรากฏแถบไอโซไซม์ชัดเจนเมื่อใช้ตับเป็นอวัยวะทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 8.0 และเลือดปรากฏแถบชัดเจนในทุกสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ทดสอบ ยีนที่ควบคุมมี 2 โลไซ มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นเตตระเมอร์ (tetramer)

ไอโซไซม์ Glucose dehydrogenase (*GCDH*) ปรากฏแถบไอโซไซม์ชัดเจนเมื่อใช้ตับเป็นอวัยวะทดสอบในทุกสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ทดสอบ ยกเว้น CTC pH 7.0 ยีนที่ควบคุมการสร้างไอโซไซม์ มี 2 โลไซ ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโมโนเมอร์

ไอโซไซม์ Glucosephosphate isomerase (*GPI*) ปรากฏแถบไอโซไซม์ชัดเจนในทุกอวัยวะและทุกสารละลายบัฟเฟอร์ มียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เพียง 1 โลกัส โดยมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นไดเมอร์ (dimer)

ไอโซไซม์ Hexokinase (*HK*) ปรากฏแถบไอโซไซม์ชัดเจนเมื่อใช้ตับเป็นอวัยวะทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 7.0 และ pH 8.0 และใน TEB pH 8.3 ไอโซไซม์นี้มียีนควบคุม 1 โลกัส มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโมโนเมอร์

ไอโซไซม์ L-Iditol dehydrogenase (*IDDH*) ปรากฏแถบไอโซไซม์ชัดเจนเมื่อใช้ตับเป็นอวัยวะทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 8.0 และ TEB pH 8.0 และเมื่อใช้ไตในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 7.0 ไอโซไซม์นี้มียีนควบคุม 2 โลไซ มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นเตตระเมอร์

ไอโซไซม์ Malate dehydrogenase (*MDH*) จะปรากฏแถบไอโซไซม์ชัดเจนเมื่อใช้กล้ามเนื้อเป็นอวัยวะทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 8.0 และ TEB pH 8.3 เมื่อใช้ตับในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 8.0 เมื่อใช้ไตในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 7.0 และ pH 8.0 เมื่อใช้เลือดในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 8.0 และเมื่อใช้หัวใจในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 7.0 และ CTC pH 8.0 ไอโซไซม์นี้มียีนควบคุม 1 โลกัส และมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นไดเมอร์

ไอโซไซม์ Malic enzyme (*ME*) จะปรากฏแถบไอโซไซม์ชัดเจนเมื่อใช้กล้ามเนื้อ ตับ และไตเป็นอวัยวะทดสอบในทุกสารละลายบัฟเฟอร์ และเมื่อใช้เลือดในสารละลายบัฟเฟอร์ TEB pH 8.0 ไอโซไซม์นี้มียีนควบคุม 1 โลกัส และมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโมโนเมอร์

ไอโซไซม์ Mannose-6-phosphate isomerase (*MPI*) ปรากฏแถบไอโซไซม์ชัดเจนเมื่อใช้กล้ามเนื้อเป็นอวัยวะทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ TEB pH 8.3 และเมื่อใช้เลือดเป็นอวัยวะทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ TEB pH 8.0 ไอโซไซม์นี้ควบคุมด้วยยีน 2 โลไซ และมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นไดเมอร์

ไอโซไซม์ Phosphoglucomutase (*PGM*) ปรากฏแถบไอโซไซม์ชัดเจนเมื่อใช้ตับ ไต เลือดและหัวใจในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH และ 8.0 และเมื่อใช้กล้ามเนื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ TEB pH 8.0 และ pH 8.3 ไอโซไซม์นี้มียีนควบคุม 1 โลกัส และมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโมโนเมอร์

ไอโซไซม์ Pyruvate kinase (*PK*) ปรากฏแถบไอโซไซม์ชัดเจนเมื่อใช้ตับและไตเป็นอวัยวะทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 7.0 และ pH 8.0 มียีนควบคุมการสร้างไอโซไซม์ 1 โลกัส มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นเตตระเมอร์

สรุปผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 1 โดยกำหนดนิยามว่า

ปรากฏแถบของไอโซไซม์ชัดเจน	ใช้สัญลักษณ์ (+)
ปรากฏแถบของไอโซไซม์ไม่ชัดเจน	ใช้สัญลักษณ์ (-)
ไม่ปรากฏแถบของไอโซไซม์	ใช้สัญลักษณ์ (0)

นำผลการทดลองที่ 1 มาเลือกชนิดของอวัยวะ ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์และไอโซไซม์ที่เหมาะสมในการตรวจสอบไอโซไซม์ เพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่งในการทดลองที่ 2 ผลการศึกษาจากการทดลองที่ 1 ซึ่งจะนำมาใช้ในการทดลองที่ 2 สรุปไว้ในตารางที่ 1 และ 2

<u>ตารางที่ 1</u> ผลการศึกษาหาไอโซไซม์ ชนิดของบัฟเฟอร์ และอวัยวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบประชากรปลาสลิด

เอนไซม์	กล้ามเนื้อ				ตับ				ไต				เลือด				หัวใจ			
	TC		TEB		TC		TEB		TC		TEB		TC		TEB		TC		TEB	
	pH 7.0	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.3	pH 7.0	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.3	pH 7.0	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.3	pH 7.0	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.3	pH 7.0	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.3
AAT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST	-	+	-	+	+	+	0	-	-	+	+	+	0	0	0	+	-	+	-	+
FUM	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0
GCDH	0	0	0	0	-	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GPI	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+
HK	0	0	0	0	-	+	0	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IDDH	0	0	0	0	0	-	-	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MDH	0	+	0	-	0	+	0	0	+	-	0	0	0	-	+	0	-	-	0	0
ME	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	-	+	-	0	0	0	0
MPI	0	0	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	0	0	0	-	-
PGDH	0	0	0	0	-	+	0	0	-	+	0	0	-	0	-	-	0	0	0	0
PGM	0	0	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	0	0	-	+	-	-
PK	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

เครื่องหมาย (+) : ผลปรากฏแถบชัดเจน

เครื่องหมาย (-) : ผลปรากฏแถบไม่ชัดเจน

เครื่องหมาย (0) : ผลไม่ปรากฏแถบ

<u>ตารางที่ 2</u> สรุปแผนการทดลองเพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง

เอนไซม์	อวัยวะ	บัฟเฟอร์	โลกัสที่พบ
EST	กล้ามเนื้อ	CTC pH 8.0	*EST-3*
	ตับ	CTC pH 8.0	*EST-1,EST-2,EST-3*
	หัวใจ	CTC pH 8.0	*EST-2*
	หัวใจ	TEB pH 8.3	*EST-2*
ME	กล้ามเนื้อ	TEB pH 8.3	*ME*
	หัวใจ	CTC pH 8.0	*ME*
AK	ตับ	CTC pH 8.0	*AK-1, AK-2*
	ไต	CTC pH 8.0	*AK-2*
PGDH	ตับ	CTC pH 8.0	*PGDH-1, PGHD-2*
	ไต	CTC pH 8.0	*PGDH-2*
PGI	ไต	TEB pH 8.3	*PGI*
PGM	ไต	TEB pH 8.3	*PGM*
	หัวใจ	CTC pH 8.0	*PGM*

<u>การทดลองที่ 2</u>

ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง

1. <u>รูปแบบของแถบไอโซไซม์</u> (Isozyme pattern)

จากการศึกษาไอโซไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาสลิดที่รวบรวมจากแหล่งน้ำในจังหวัดสมุทรปราการ พิษณุโลก สุพรรณบุรี อุบลราชธานีและปัตตานี แถบตำแหน่งของไอโซไซม์ที่ปรากฏมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของไอโซไซม์ ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์และอวัยวะที่ใช้ แถบของไอโซไซม์ที่ให้ผลชัดเจนและสามารถบันทึกผลได้มีทั้งหมด 17 โลไซ โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาดังต่อไปนี้

<u>Adenylate kinase (AK)</u>

เมื่อใช้ตับเป็นอวัยวะทดสอบ พบว่ามียีนควบคุม 2 โลไซ โดยโลกัส *AK-1* มี 4 อัลลีล ส่วนโลกัส *AK-2* มี 2 อัลลีล ตัวอย่างที่ทดสอบนั้นมีทั้งที่เป็นโฮโมไซโกต (homozygote) และเฮตเทอโรไซโกต (heterozygote) ทั้ง 2 โลไซเป็นโพลิมอร์ฟิคโลไซ (polymorphic loci) ดังแสดงไว้ในภาพที่ 3(a) ในตับพบว่าที่ตำแหน่ง *AK-1* ประชากรปลาสลิดจากอุบลราชธานีมี 4 อัลลีล ขณะที่ประชากรจากแหล่งอื่นมีเพียง 3 อัลลีล ที่ตำแหน่ง *AK-2* ประชากรจากปัตตานีมี 3 อัลลีล ส่วนที่ประชากรจากแหล่งอื่นมี 2 อัลลีล โดยทั้ง 2 โลไซนี้เป็นโพลิมอร์ฟิคโลไซ และเมื่อใช้ไตเป็นอวัยวะทดสอบ พบว่ามียีนควบคุมเพียง 1 โลกัส ซึ่งมี 2 อัลลีล ยีนที่ควบคุมมีสภาพเป็นโพลิมอร์ฟิคโลกัสดังแสดงในภาพที่ 3(b) ในไตจะพบโลกัสเดียวมี 2 อัลลีล โดยประชากรจากสมุทรปราการเป็นเฮตเทอโรไซโกตทั้งหมดและมีสภาพเป็นโมโนมอร์ฟิคโลไซ แสดงว่าไอโซไซม์ *AK* นี้มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโมโนเมอร์ เนื่องจากตัวอย่างที่เป็นเฮตเทอโรไซโกตจะปรากฏแถบไอโซไซม์ให้เห็นเป็น 2 แถบ และตัวอย่างที่เป็นโฮโมไซโกตจะปรากฏแถบเอนไซม์ให้เห็นเพียงแถบเดียว

<u>Esterase (EST)</u>

เมื่อใช้กล้ามเนื้อเป็นอวัยวะทดสอบ ปรากฏแถบไอโซไซม์ที่ควบคุมโดยมียีนเพียง 1 โลกัสซึ่งมี 2 อัลลีล (ภาพที่ 4a) ตัวอย่างที่ศึกษามียีนดังกล่าวอยู่ในสภาพทั้งที่เป็นโฮโมไซโกตและเฮตเทอโรไซโกต เมื่อใช้ตับทดสอบพบว่ามียีนควบคุม 3 โลไซคือ *EST-1*, *EST-2* และ *EST-3* โดยโลกัส *EST-1* และ *EST-2* มี 3 อัลลีล ส่วน *EST-3* มี 2 อัลลีล (ภาพที่ 4b) ยีนทั้ง 3 โลไซของตัวอย่างจากจังหวัดพิษณุโลกมีสภาพเป็นโฮโมไซกัสทั้งหมด ขณะที่ตัวอย่างจากอุบลราชธานีและสมุทรปราการมียีนที่โลกัส *EST-1* เท่านั้นที่มีสภาพเป็นโฮโมไซกัส และตัวอย่างจากจังหวัดปัตตานีมียีนที่โลกัส *EST-2* และ *EST-3* มีสภาพเป็นโฮโมไซกัส

Malic enzyme (ME)

พบเพียงโลกัสเดียวในกล้ามเนื้อและหัวใจ เมื่อใช้กล้ามเนื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 8.0 จะพบ 2 อัลลีลในทุกจังหวัดยกเว้นอุบลราชธานีที่มี 3 อัลลีล และตัวอย่างจากทุกจังหวัด ปรากฏรูปแบบของแถบมากกว่า 1 รูปแบบ (ภาพที่ 5a) ในหัวใจเมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 8.0 พบเพียงตัวอย่างจากจังหวัดสมุทรปราการเท่านั้นที่มี 2 อัลลีล นอกนั้นจะมี 3 อัลลีล ตัวอย่างจากจังหวัดสมุทรปราการปรากฏแถบ 1 แถบในทุกตัวอย่าง ขณะที่ตัวอย่างจากจังหวัดอื่นมีทั้งที่มี 1 แถบและ 2 แถบ และรูปแบบของแถบในทุกจังหวัดมีมากกว่า 1 รูปแบบทั้งสิ้น (ภาพที่ 5b)

Phosphogluconate dehydrogenase (PGDH)

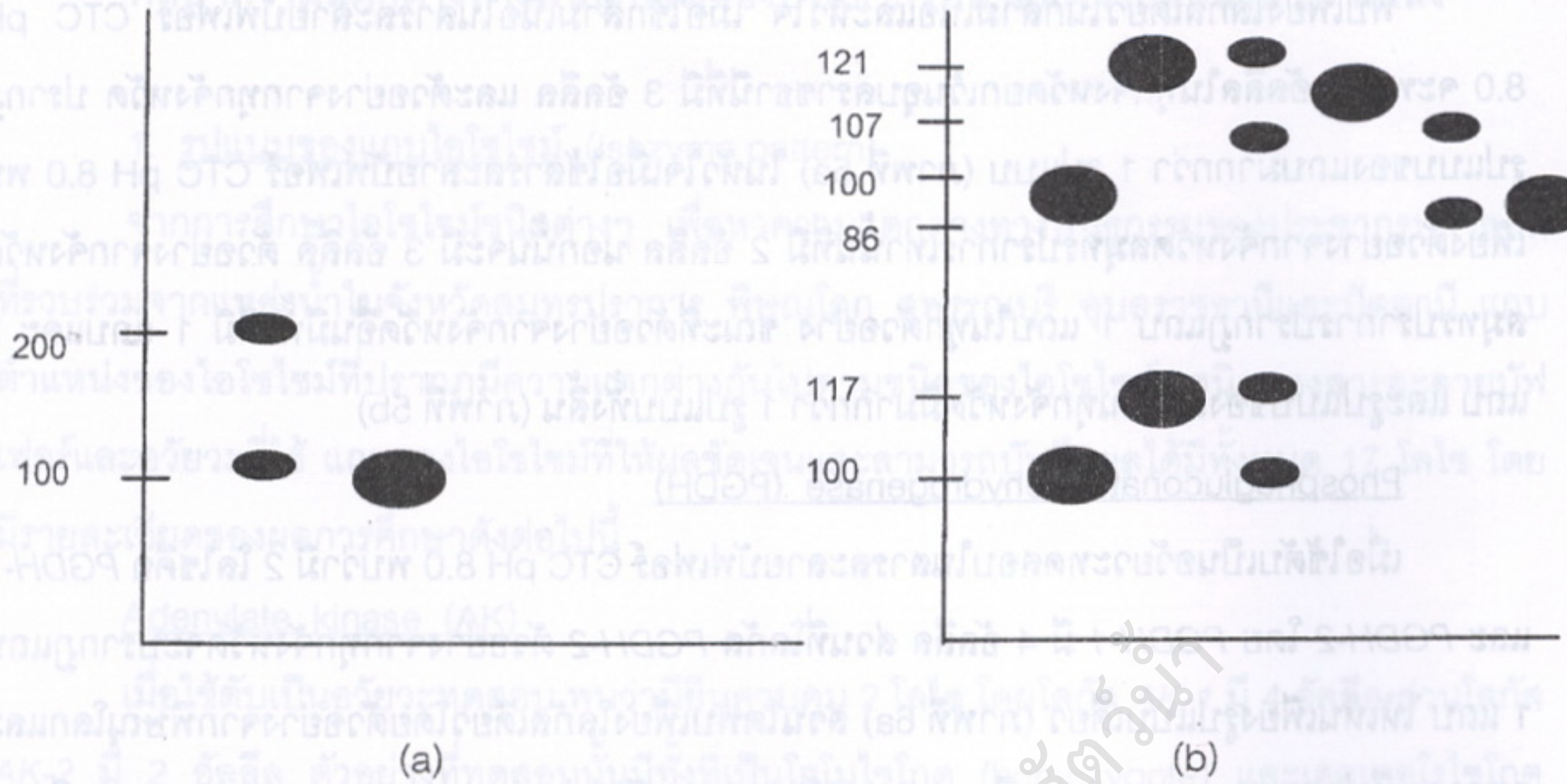
เมื่อใช้ตับเป็นอวัยวะทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 8.0 พบว่ามี 2 โลไซคือ *PGDH-1* และ *PGDH-2* โดย *PGDH-1* มี 4 อัลลีล ส่วนที่โลกัส *PGDH-2* ตัวอย่างจากทุกจังหวัดจะปรากฏแถบ 1 แถบ ให้เห็นเพียงรูปแบบเดียว (ภาพที่ 6a) ส่วนไตพบเพียงโลกัสเดียวโดยตัวอย่างจากพิษณุโลกและสุพรรณบุรีปรากฏแถบ 1 แถบเพียงรูปแบบเดียว ส่วนตัวอย่างจากสมุทรปราการอุบลราชธานีและปัตตานีปรากฏแถบไอโซไซม์ 1 แถบเช่นกันแต่มีรูปแบบของแถบมากกว่า 1 รูปแบบ (ภาพที่ 6b)

Phophoglucose isomerase (PGI)

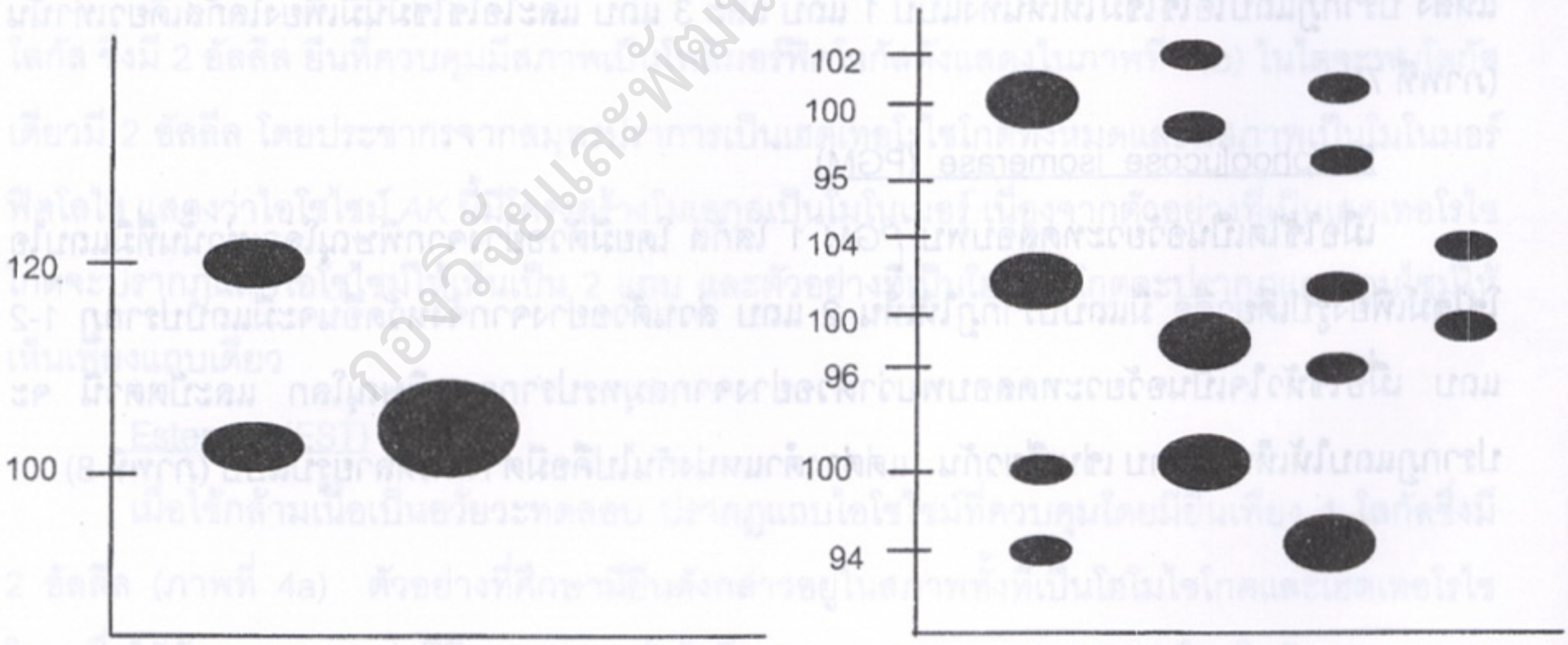
เมื่อใช้ไตเป็นอวัยวะทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ TEB pH 8.3 พบว่าตัวอย่างจากทั้ง 5 แหล่ง ปรากฏแถบไอโซไซม์ให้เห็นทั้งแบบ 1 แถบ และ 3 แถบ และไอโซไซม์นี้มีเพียงโลกัสเดียวเท่านั้น (ภาพที่ 7)

Phophoglucose isomerase (PGM)

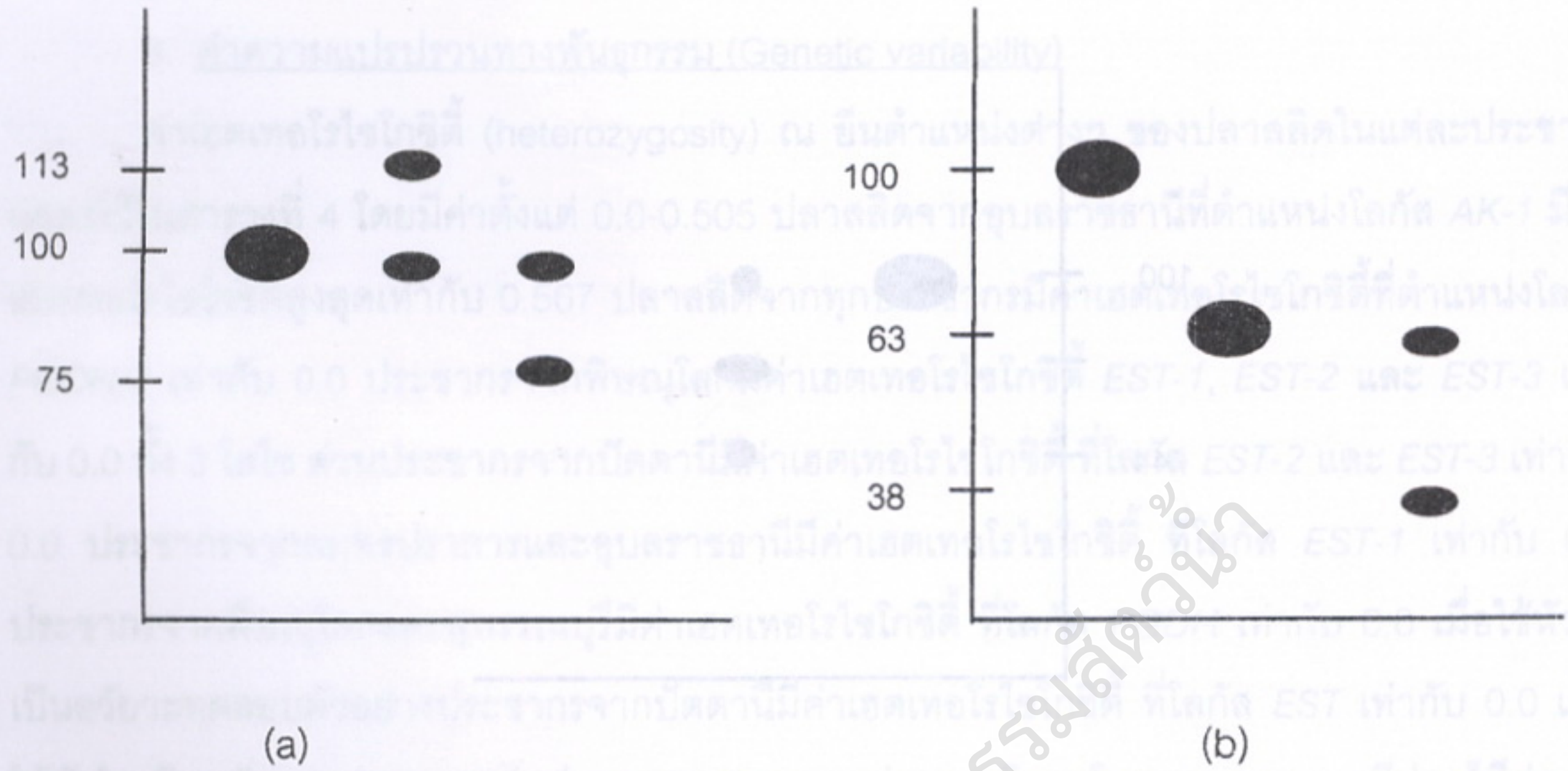
เมื่อใช้ไตเป็นอวัยวะทดสอบพบ *PGM* 1 โลกัส โดยมีตัวอย่างจากพิษณุโลกเท่านั้นที่มีแถบไอโซไซม์เพียงรูปเดียวคือ มีแถบปรากฏให้เห็น 2 แถบ ส่วนตัวอย่างจากจังหวัดอื่นจะมีแถบปรากฏ 1-2 แถบ เมื่อใช้หัวใจเป็นอวัยวะทดสอบพบว่าตัวอย่างจากสมุทรปราการ พิษณุโลก และปัตตานี จะปรากฏแถบให้เห็น 1 แถบ เช่นเดียวกัน แต่ต่างตำแหน่งกันไปคือมีต่างกันหลายรูปแบบ (ภาพที่ 8)



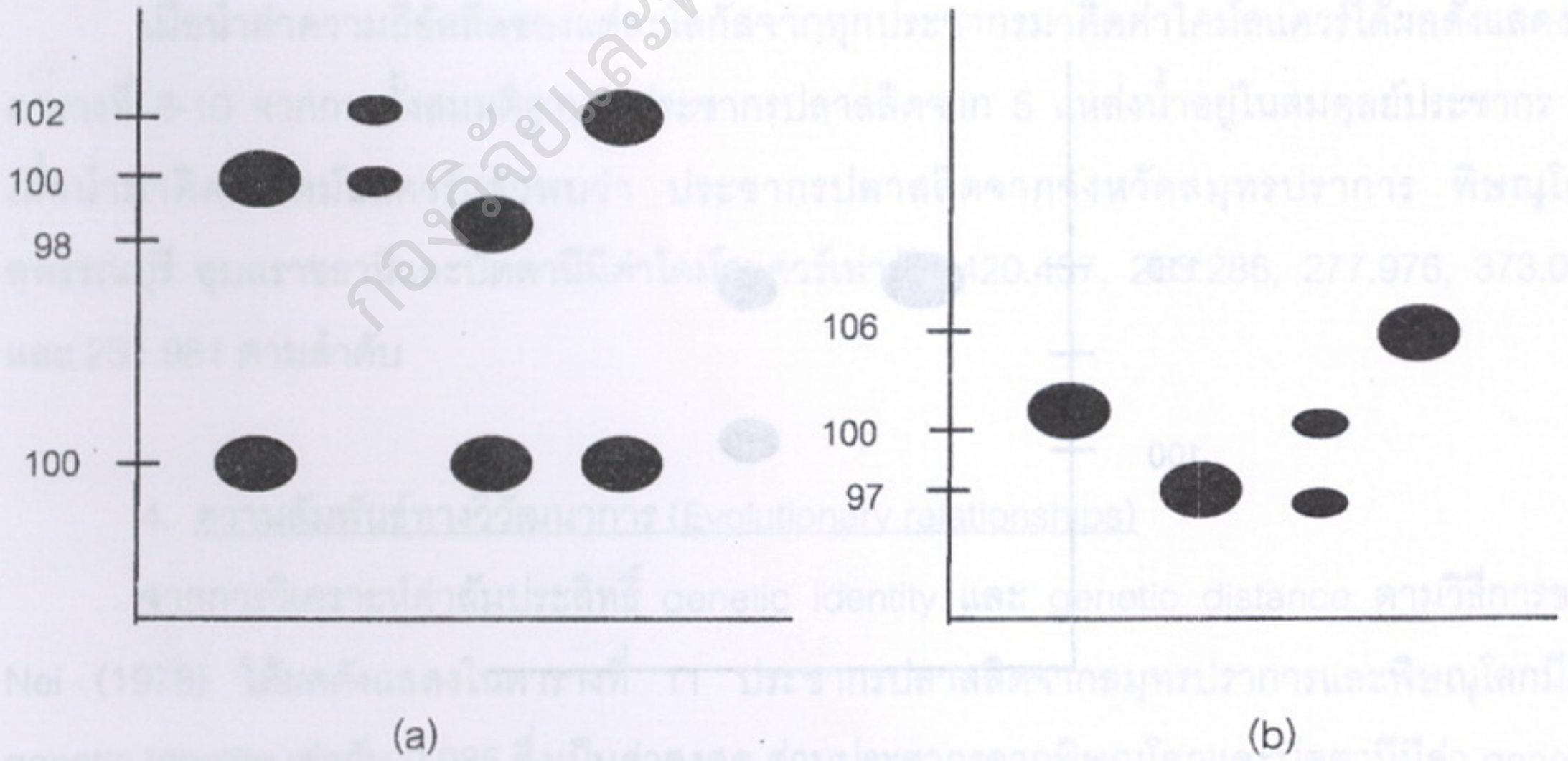
<u>ภาพที่ 3</u> รูปแบบไอโซไซม์ *AK* ของไต (a) และตับ (b) ปลาสลิด



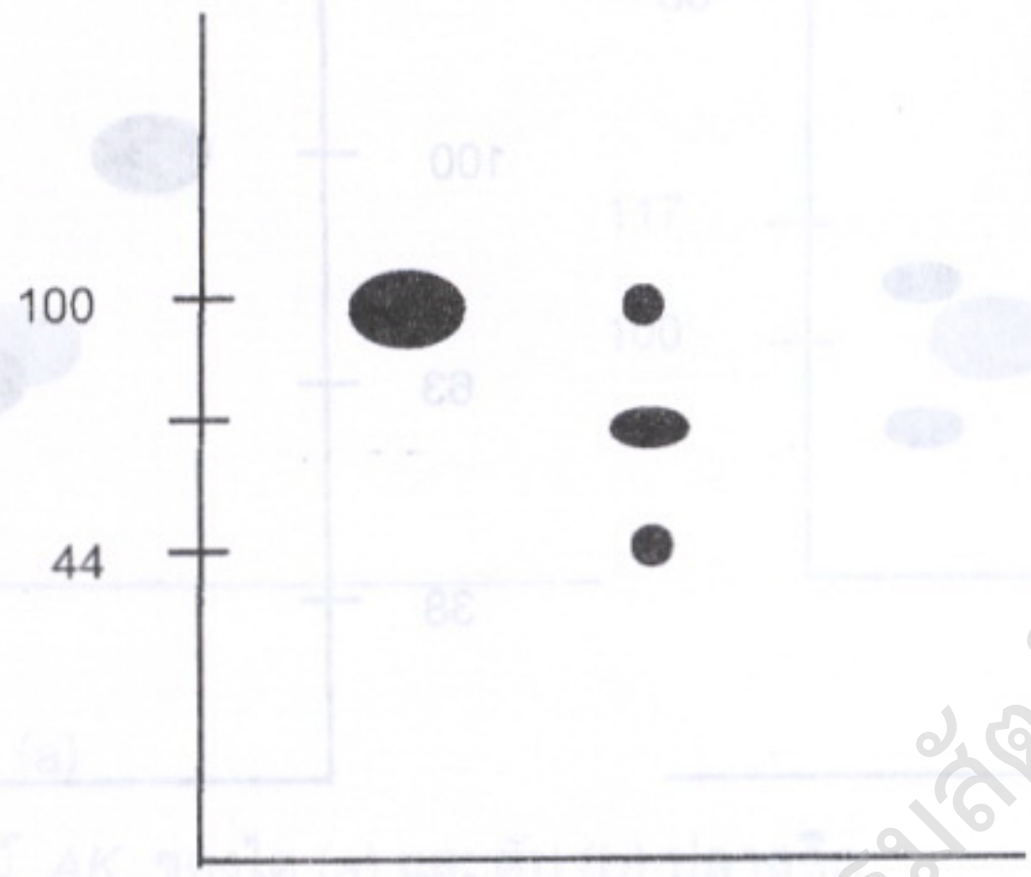
<u>ภาพที่ 4</u> รูปแบบไอโซไซม์ของกล้ามเนื้อ (a) และตับ (b) ปลาสลิด



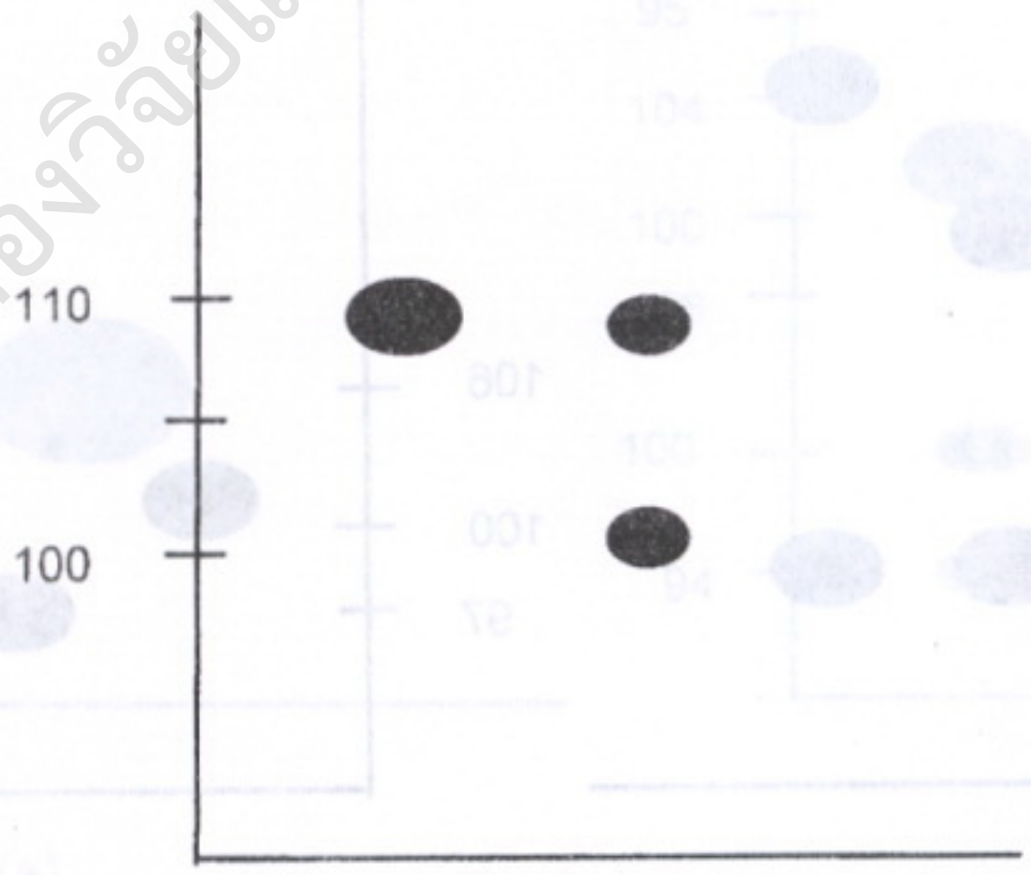
<u>ภาพที่ 5</u> รูปแบบไอโซไซม์ *ME* ของกล้ามเนื้อ (a) และหัวใจ (b) ปลาสลิด



<u>ภาพที่ 6</u> รูปแบบไอโซไซม์ *PGDH* ของตับ (a) และไต (b) ปลาสลิด



<u>ภาพที่ 7</u> รูปแบบไอโซไซม์ PGI ของไตปลาสลิด



<u>ภาพที่ 8</u> รูปแบบไอโซไซม์ PGM ของไตปลาสลิด

2. <u>ค่าทางพันธุกรรม</u> (Genetic values)

เมื่อนำผลการบันทึกแถบไอโซไซม์มาวิเคราะห์หาค่าความถี่อัลลีลตามสูตร (2Ho+He) /2N จะได้ค่าความถี่อัลลีลของโลไซต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3

3. <u>ค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Genetic variability)</u>

ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ (heterozygosity) ณ ยีนตำแหน่งต่างๆ ของปลาสลิดในแต่ละประชากรแสดงไว้ในตารางที่ 4 โดยมีค่าตั้งแต่ 0.0-0.505 ปลาสลิดจากอุบลราชธานีที่ตำแหน่งโลกัส *AK-1* มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สูงสุดเท่ากับ 0.567 ปลาสลิดจากทุกประชากรมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ที่ตำแหน่งโลกัส *PGDH-2* เท่ากับ 0.0 ประชากรจากพิษณุโลกมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ *EST-1*, *EST-2* และ *EST-3* เท่ากับ 0.0 ทั้ง 3 โลไซ ส่วนประชากรจากปัตตานีมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ ที่โลกัส *EST-2* และ *EST-3* เท่ากับ 0.0 ประชากรจากสมุทรปราการและอุบลราชธานีมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ ที่โลกัส *EST-1* เท่ากับ 0.0 ประชากรจากพิษณุโลกและสุพรรณบุรีมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ ที่โลกัส *PGDH* เท่ากับ 0.0 เมื่อใช้หัวใจเป็นอวัยวะทดสอบตัวอย่างประชากรจากปัตตานีมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ ที่โลกัส *EST* เท่ากับ 0.0 เมื่อใช้หัวใจเป็นอวัยวะทดสอบพบว่าประชากรจากสมุทรปราการพิษณุโลกและสุพรรณบุรีต่างก็มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้เท่ากับ 0.0 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ ที่โลกัส *PGM* โดยเฉลี่ยต่อโลกัสมีค่าอยู่ในช่วง 0.178-0.238 โดยประชากรจากปัตตานีมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้เฉลี่ยต่อโลกัสต่ำสุดเท่ากับ 0.178 และประชากรจากจังหวัดอุบลราชธานีมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.238 (ตารางที่ 5)

เมื่อนำค่าความถี่อัลลีลของแต่ละโลกัสจากทุกประชากรมาคิดค่าไคม์สแควร์ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6-10 จากการตั้งสมมติฐานว่าประชากรปลาสลิดจาก 5 แหล่งน้ำอยู่ในสมดุลย์ประชากร ซึ่งเมื่อนำมาคิดค่าไคม์สแควร์แล้วพบว่า ประชากรปลาสลิดจากจังหวัดสมุทรปราการ พิษณุโลก สุพรรณบุรี อุบลราชธานีและปัตตานีมีค่าไคม์สแควร์เท่ากับ 420.437, 263.286, 277.976, 373.099 และ 231.981 ตามลำดับ

4. <u>ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Evolutionary relationships)</u>

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ genetic identity และ genetic distance ตามวิธีการของ Nei (1978) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11 ประชากรปลาสลิดจากสมุทรปราการและพิษณุโลกมีค่า genetic identity เท่ากับ 0.985 ซึ่งเป็นค่าสูงสุด ส่วนประชากรจากพิษณุโลกและปัตตานีมีค่า genetic identity ต่ำสุดเท่ากับ 0.933 ค่า genetic distance ระหว่างประชากรจากพิษณุโลกและปัตตานีมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.080 และค่า genetic distance ระหว่างประชากรจากสมุทรปราการและสุพรรณบุรีมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.028

5. Cluster analysis

เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์จาก Nei (1978) unbiased genetic identity มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้วิธีการ cluster analysis ผลที่ได้คือระหว่างประชากรจากสมุทรปราการกับพิษณุโลกมีค่า clustering level อยู่ในระดับสูงสุดเท่ากับ 0.985 เมื่อนำประชากรจากสุพรรณบุรีเปรียบเทียบกับประชากรจากสมุทรปราการและพิษณุโลกพบว่ามีค่า clustering level เท่ากันคือเท่ากับ 0.972 ส่วนประชากรจากอุบลราชธานีเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรจากสมุทรปราการ พิษณุโลกและสุพรรณบุรีมีค่า clustering level เท่ากันคือ 0.952 และประชากรจากปัตตานีเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรจากสมุทรปราการ พิษณุโลก สุพรรณบุรี และอุบลราชธานีได้ค่า clustering level เท่ากันคือเท่ากับ 0.931 รูปแบบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแสดงไว้ในภาพที่ 9

<u>ตารางที่ 3</u> ค่าความถี่อัลลีลของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง

โลกัส	อัลลีล	แหล่งน้ำในจังหวัด				
		สมุทรปราการ	พิษณุโลก	สุพรรณบุรี	อุบลราชธานี	ปัตตานี
ME (CTC pH 8.0) M	113	0.000	0.000	0.000	0.040	0.000
	100	0.850	0.860	0.840	0.800	0.840
	75	0.150	0.140	0.160	0.160	0.160
EST-3 (CTC pH 8.0) M	120	0.090	0.150	0.050	0.130	0.050
	100	0.910	0.850	0.950	0.870	0.950
AK-1 (CTC pH 8.0) L	121	0.110	0.000	0.200	0.600	0.140
	107	0.000	0.850	0.000	0.020	0.000
	100	0.890	0.050	0.800	0.180	0.860
	86	0.000	0.100	0.000	0.200	0.000
AK-2 (CTC pH 8.0) L	117	0.100	0.120	0.100	0.020	0.100
	100	0.900	0.880	0.900	0.980	0.900
PGDH-1 (CTC pH 8.0) L	102	0.020	0.180	0.100	0.000	0.000
	100	0.880	0.820	0.900	0.880	0.180
	98	0.100	0.000	0.000	0.120	0.820
PGDH-2 (CTC pH 8.0) L	100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
EST-1 (CTC pH 8.0) L	102	0.000	0.000	0.090	0.000	0.000
	100	1.000	1.000	0.910	1.000	0.910
	95	0.000	0.000	0.000	0.000	0.090
EST-2 (CTC pH 8.0) L	104	0.040	0.000	0.080	0.090	0.000
	100	0.910	1.000	0.920	0.910	1.000
	96	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000
EST-3 (CTC pH 8.0) L	100	0.860	1.000	0.880	0.860	1.000
	94	0.140	0.000	0.120	0.140	0.000
AK-2 (CTC pH 8.0) L	200	0.500	0.400	0.090	0.160	0.050
	100	0.500	0.600	0.910	0.840	0.950
PGDH-2 (CTC pH 8.0) K	106	0.000	0.000	0.000	0.260	0.280
	100	0.780	1.000	1.000	0.670	0.720
	97	0.220	0.000	0.000	0.070	0.000

<u>ตารางที่ 3</u> (ต่อ)

โลกัส	อัลลีล	แหล่งน้ำในจังหวัด				
		สมุทรปราการ	พิษณุโลก	สุพรรณบุรี	อุบลราชธานี	ปัตตานี
PGI	100	0.880	0.530	0.860	0.850	0.860
(TEB pH 8.3) K	44	0.120	0.470	0.140	0.150	0.140
PGM	110	0.500	0.500	0.120	0.140	0.120
(CTC pH 8.0) K	100	0.500	0.500	0.800	0.860	0.880
ME	100	0.800	0.790	0.850	0.900	0.760
(CTC pH 8.0) H	63	0.200	0.180	0.100	0.090	0.230
	83	0.000	0.030	0.050	0.010	0.010
EST-2	121	0.100	0.110	0.140	0.250	0.000
(CTC pH 8.0) H	100	0.820	0.780	0.680	0.750	1.000
	71	0.080	0.110	0.180	0.000	0.000
EST-2	108	0.100	0.070	0.000	0.140	0.100
(TEB pH 8.3) H	100	0.870	0.930	0.920	0.860	0.860
	85	0.030	0.000	0.080	0.000	0.040
PGM	121	0.000	0.000	0.000	0.100	0.100
(TEB pH 8.3) H	100	1.000	1.000	1.000	0.900	0.900

CTC pH 8.0 : บัฟเฟอร์ Tris-citrate pH 8.0

TEB pH 8.3 : บัฟเฟอร์ Tris-EDTA-borate pH 8.3

M : กล้ามเนื้อ

L : ตับ

K : ไต

H : หัวใจ

<u>ตารางที่ 4</u> ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ (unbiased heterozygosity) ทุกโลไซของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง

โลกัส	เฮตเทอโรไซโกซิตี้ (unbiased)				
	สมุทรปราการ	พิษณุโลก	สุพรรณบุรี	อุบลราชธานี	ปัตตานี
ME (CCT pH 8.0) M	0.255 (0.258)	0.241 (0.243)	0.269 (0.272)	0.333 (0.336)	0.269 (0.272)
EST-3 (CTC pH 8.0) M	0.164 (0.165)	0.255 (0.258)	0.095 (0.096)	0.226 (0.228)	0.095 (0.096)
AK-1 (CTC pH 8.0) L	0.196 (0.198)	0.265 (0.268)	0.320 (0.323)	0.567 (0.573)	0.241 (0.243)
AK-2 (CTC pH 8.0) L	0.180 (0.182)	0.295 (0.298)	0.180 (0.182)	0.039 (0.040)	0.180 (0.182)
PGDH-1 (CTC pH 8.0) L	0.215 (0.217)	0.295 (0.298)	0.180 (0.182)	0.211 (0.213)	0.295 (0.298)
PGDH-2 (CTC pH 8.0) L	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)
EST-1 (CTC pH 8.0) L	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.164 (0.165)	0.000 (0.000)	0.164 (0.165)
EST-2 (CTC pH 8.0) L	0.168 (0.169)	0.000 (0.000)	0.147 (0.149)	0.164 (0.165)	0.000 (0.000)
EST-3 (CTC pH 8.0) L	0.241 (0.243)	0.000 (0.000)	0.211 (0.213)	0.241 (0.243)	0.000 (0.000)
AK-2 (CTC pH 8.0) K	0.500 (0.505)	0.480 (0.485)	0.164 (0.165)	0.269 (0.272)	0.095 (0.096)
PGDH-2 (CTC pH 8.0) K	0.343 (0.347)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.479 (0.483)	0.403 (0.407)
PGI (TEB pH 8.3) K	0.211 (0.213)	0.498 (0.503)	0.241 (0.243)	0.255 (0.258)	0.241 (0.243)
PGM (TEB pH 8.3) K	0.500 (0.505)	0.500 (0.505)	0.200 (0.213)	0.241 (0.243)	0.211 (0.213)
ME (TEB pH 8.3) K	0.320 (0.323)	0.343 (0.346)	0.265 (0.268)	0.182 (0.184)	0.369 (0.373)
EST-2 (CTC pH 8.0) H	0.311 (0.314)	0.367 (0.371)	0.486 (0.491)	0.375 (0.379)	0.000 (0.000)
EST-2 (TEB pH 8.3) H	0.232 (0.235)	0.130 (0.132)	0.147 (0.149)	0.241 (0.243)	0.249 (0.251)
PGM (CTC pH 8.0) H	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.180 (0.182)

ค่าตัวเลขในวงเล็บคือค่า unbiased heterozygosity

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตี้ต่อโลกัสของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง

แหล่งน้ำในจังหวัด	Mean heterozygosity Per locus (biased estimate)	Mean heterozygosity Per locus (unbiased estimate)
สมุทรปราการ	0.226 (0.036)	0.238 (0.036)
พิษณุโลก	0.214 (0.046)	0.216 (0.046)
สุพรรณบุรี	0.181 (0.030)	0.183 (0.030)
อุบลราชธานี	0.235 (0.036)	0.238 (0.037)
ปัตตานี	0.176 (0.031)	0.178 (0.031)

ค่าตัวเลขในวงเล็บคือค่า Standard error

ตารางที่ 6 ค่าไคม์สแควร์ของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำในจังหวัดสมุทรปราการ

โลกัส	อัลลีล	Observed Frequency	Expected Frequency	Chi square	df.
ME (CTC pH 8.0) M	113/113	35	36.125		
	100/75	15	12.750		
	75/75	0	1.125	1.557	2
EST-3 (CTC pH 8.0) M	120/120	0	0.405		
	120/100	90	8.190		
	100/100	41	41.405	0.489	2
AK-1 (CTC pH 8.0) L	121/121	3	0.605		
	121/100	5	9.790		
	100/100	42	39.605	11.970	2
AK-2 (CTC pH 8.0) L	117/117	6	0.500		
	117/100	0	9.000		
	100/100	44	40.500	69.802	2
PGDH-1 (CTC pH 8.0) L	102/102	0	0.020		
	102/100	1	1.760		
	102/95	0	0.200		
	100/100	44	38.720		
	100/95	0	8.800		
	95/95	5	0.500	50.568	5
PGDH-2 (CTC pH 8.0) L	100/100	50	50.000	0.000	
EST-1 (CTC pH 8.0) L	100/100	50	50.000	0.000	
EST-2 (CTC pH 8.0) L	102/102	0	0.080		
	102/100	5	3.640		
	102/95	0	0.200		
	100/100	42	41.405		
	100/95	1	4.550		
	95/95	2	0.125	31.692	5
EST-3 (CTC pH 8.0) L	100/100	29	16.820		
	100/94	0	24.360		
	94/94	21	8.820	50.000	2
AK-2 (CTC pH 8.0) K	200/200	0	12.500		
	200/100	50	25.000		
	100/100	0	15.500	50.000	2
PGDH-2 (CTC pH 8.0) K	100/100	39	30.420		
	100/97	0	17.160		
	97/97	11	2.420	50.000	2

ตารางที่ 6 (ต่อ)

โลกัส	อัลลีล	Observed Frequency	Expected Frequency	Chi square	df.	
PGI (TEM pH 8.3) K	100/100	38	38.72			
	100/44	12	10.560			
	44/44	0	0.720	0.929	2	
PGM (TEM pH 8.3) K	110/110	5	12.500			
	110/100	50	25.000			
	100/100	0	12.500	50.00	2	
ME (CTC pH 8.0) H	100/100	40	32.00			
	100/63	0	16.000			
	63/63	10	2.000	50.000	2	
EST-2(CTC pH 8.0) H	121/121	0	0.500			
	121/100	10	8.200			
	121/71	0	0.800			
	100/100	32	33.620			
	100/71	8	6.560			
	71/71	0	0.320	2.409	5	
EST-2 (TEB pH 8.3) H	108/108	0	0.500			
	108/100	10	8.700			
	108/85	0	0.300			
	100/100	37	37.845			
	100/85	3	2.610			
	85/85	0	0.450	1.521	5	
TOTAL				420.437**	37	P<0.01

CTC pH 8.0 : บัฟเฟอร์ Tris-citrate pH 8.0

TEB pH 8.3 : บัฟเฟอร์ Tris-EDTA-borate pH 8.3

M : กล้ามเนื้อ

L : ตับ

K : ไต

H : หัวใจ

ตารางที่ 7 ค่าไคม์สแควร์ของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำในจังหวัดพิษณุโลก

โลกัส	อัลลีล	Observed Frequency	Expected Frequency	Chi square	df.
ME (CTC pH 8.0) M	100/100	35	36.125		
	100/75	15	12.750		
	75/75	0	1.125	1.557	2
EST-3 (CTC pH 8.0) M	120/120	0	1.125		
	120/100	15	12.750		
	100/100	35	36.125	0.467	2
AK-1 (CTC pH 8.0) L	121/121	5	1.620		
	121/100	8	14.760		
	100/100	37	33.620	10.488	2
AK-2 (CTC pH 8.0) L	117/117	5	0.720		
	117/100	2	10.560		
	100/100	43	38.720	32.854	2
PGDH-1 (CTC pH 8.0) L	102/102	9	1.620		
	102/100	0	14.760		
	100/100	41	33.620	50.000	2
PGDH-2 (CTC pH 8.0) L	100/100	50	50.000	0.000	
EST-1 (CTC pH 8.0) L	100/100	50	50.000	0.000	
EST-2 (CTC pH 8.0) L	100/100	50	50.000	0.000	
EST-3 (CTC pH 8.0) L	100/100	50	50.000	0.000	2
AK-2 (CTC pH 8.0) K	200/200	0	8.000		
	200/100	40	24.000		
	100/100	10	18.000	22.223	2
PGDH-2 (CTC pH 8.0) K	100/100	50	50.000	0.000	
PGI (TEM pH 8.3) K	100/100	3	14.050		
	100/44	47	24.910		
	44/44	0	11.050	39.33	2
PGM (TEM pH 8.3) K	110/110	5	12.500		
	110/100	50	25.000		
	100/100	0	12.500	50.00	2
ME (CTC pH 8.0) K	100/100	38	31.205		
	100/63	0	14.220		
	100/38	9	1.620		
	63/63	0	0.540		
	63/38	3	2.370		
	38/38	0	0.045	50.072	5

ตารางที่ 7 (ต่อ)

โลกัส	อัลลีล	Observed Frequency	Expected Frequency	Chi square	df.	
EST-2(CTC pH 8.0) H	121/121	2	0.605			
	121/100	7	8.580			
	121/71	0	1.210			
	100/100	30	30.420			
	100/71	11	0.605			
	71/71	0	8.580	6.012	5	
EST-2 (TEB pH 8.3) H	108/108	0	0.245			
	108/100	7	6.510			
	100/100	43	43.245	0.283	2	
TOTAL				263.286**	26	P<0.01

CTC pH 8.0 : บัฟเฟอร์ Tris-citrate pH 8.0

TEB pH 8.3 : บัฟเฟอร์ Tris-EDTA-borate pH 8.3

M : กล้ามเนื้อ

L : ตับ

K : ไต

H : หัวใจ

ตารางที่ 8 ค่าไคม์สแควร์ของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำในจังหวัดสุพรรณบุรี

โลกัส	อัลลีล	Observed Frequency	Expected Frequency	Chi square	df.
ME (CTC pH 8.0) M	100/100	35	35.280		
	100/75	15	13.440		
	75/75	0	1.280	1.463	2
EST-3 (CTC pH 8.0) M	120/120	0	1.125		
	120/100	5	47.500		
	100/100	45	45.125	0.138	2
AK-1 (CTC pH 8.0) L	121/121	10	2.000		
	121/100	0	16.000		
	100/100	40	32.000	50.000	2
AK-2 (CTC pH 8.0) L	117/117	5	0.500		
	117/100	0	9.000		
	100/100	45	40.500	50.000	2
PGDH-1 (CTC pH 8.0) L	102/102	5	0.500		
	102/100	0	9.000		
	100/100	45	40.500	50.000	2
PGDH-2 (CTC pH 8.0) L	100/100	50	50.000	0.000	
EST-1 (CTC pH 8.0) L	102/102	0	0.045		
	102/100	9	8.190		
	100/100	41	41.405	0.129	2
EST-2 (CTC pH 8.0) L	104/104	2	0.320		
	104/100	4	7.360		
	100/100	44	42.320	10.420	2
EST-3 (CTC pH 8.0) L	100/100	40	38.720		2
	100/94	8	10.560		
	94/94	2	0.720	2.939	
AK-2 (CTC pH 8.0) K	200/200	0	0.410		
	200/100	9	8.190		
	100/100	41	41.410	0.494	2
PGDH-2 (CTC pH 8.0) K	100/100	50	50.000	0.000	
PGI (TEM pH 8.3) K	100/100	36	36.980		
	100/44	14	12.040		
	44/44	0	0.480	1.325	2
PGM (TEM pH 8.3) K	110/110	0	0.72		
	110/100	12	10.56		
	100/100	38	38.72	0.929	2

<u>ตารางที่ 8</u> (ต่อ)

โลกัส	อัลลีล	Observed Frequency	Expected Frequency	Chi square	df.	
ME (CTC pH 8.0) K	100/100	40	36.125			
	100/63	0	8.500			
	100/38	5	4.250			
	63/63	5	0.500			
	63/38	0	0.500			
	38/38	0	0.125	50.173	5	
EST-2(CTC pH 8.0) H	121/121	7	0.980			
	121/100	0	9.520			
	121/71	0	2.520			
	100/100	30	23.12			
	100/71	8	12.240			
	71/71	5	1.620	59.588	5	
EST-2 (TEB pH 8.3) H	100/100	42	42.320			
	100/85	8	7.360			
	85/85	0	0.320	0.378	2	
TOTAL				277.976**	34	P<0.01

CTC pH 8.0 : บัฟเฟอร์ Tris-citrate pH 8.0

TEB pH 8.3 : บัฟเฟอร์ Tris-EDTA-borate pH 8.3

M : กล้ามเนื้อ

L : ตับ

K : ไต

H : หัวใจ

ตารางที่ 9 ค่าไคม์สแควร์ของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำในจังหวัดอุบลราชธานี

โลกัส	อัลลีล	Observed Frequency	Expected Frequency	Chi square	df.
ME (CTC pH 8.0) M	113/113	0	0.080		
	113/100	4	3.200		
	113/75	0	0.640		
	100/100	30	32.000		
	100/75	16	12.800		
	75/75	0	1.280	3.125	5
EST-3 (CTC pH 8.0) M	120/120	0	0.845		
	120/100	13	11.310		
	100/100	37	37.845	1.117	2
AK-1 (CTC pH 8.0) L0	121/121	29	18.000		
	121/107	0	1.200		
	121/100	0	10.800		
	121/89	0	12.000		
	107/107	1	0.020		
	107/100	0	0.360		
	107/86	0	0.400		
	100/100	9	1.620		
	100/86	1	3.600		
	86/86	10	2.000	147.000	9
AK-2 (CTC pH 8.0) L	117/117	0	0.200		
	117/100	1	1.960		
	100/100	49	48.020	0.690	2
PGDH-1 (CTC pH 8.0) L	100/100	49	38.720		
	100/98	0	10.560		
	98/98	1	0.720	13.398	2
PGDH-2 (CTC pH 8.0) L	100/100	50	50.000	0.000	
EST-1 (CTC pH 8.0) L	100/100	50	50.000	0.000	
EST-2 (CTC pH 8.0) L	104/104	0	0.405		
	104/100	5	8.190		
	100/100	45	41.405	1.960	2
EST-3 (CTC pH 8.0) L	100/100	43	36.980		
	100/94	1	12.040		
	94/94	6	0.980	36.818	2
AK-2 (CTC pH 8.0) K	200/200	0	1.28		
	200/100	16	13.44		
	100/100	34	35.280	1.814	2

ตารางที่ 9 (ต่อ)

โลกัส	อัลลีล	Observed Frequency	Expected Frequency	Chi square	df.	
PGDH-2 (CTC pH 8.0) K	106/106	13	3.380			
	106/100	0	17.420			
	106/97	0	1.820			
	100/100	33	22.445			
	100/97	1	1.690			
	97/97	3	0.245	85.464	5	
PGI (TEM pH 8.3) K	100/100	35	36.125			
	100/44	15	12.750			
	44/44	0	1.125	1.557	2	
PGM (TEM pH 8.3) K	110/110	0	0.980			
	110/100	14	12.040			
	100/100	36	36.980	1.325	2	
ME (CTC pH 8.0) K	100/100	45	40.500			
	100/63	0	8.100			
	100/38	0	0.900			
	63/63	4	0.405			
	63/38	1	0.090			
	38/38	0	0.005	50.617	5	
EST-2(CTC pH 8.0) H	121/121	10	3.125			
	121/100	5	18.750			
	100/100	35	28.125	26.889	2	
EST-2 (TEB pH 8.3) H	108/108	0	0.980			
	108/100	14	12.040			
	100/100	36	36.980	1.325	2	
TOTAL				373.099**	44	P<0.01

CTC pH 8.0 : บัฟเฟอร์ Tris-citrate pH 8.0

TEB pH 8.3 : บัฟเฟอร์ Tris-EDTA-borate pH 8.3

M : กล้ามเนื้อ

L : ตับ

K : ไต

H : หัวใจ

ตารางที่ 10 ไคม์สแควร์ของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำในจังหวัดปัตตานี

โลกัส	อัลลีล	Observed Frequency	Expected Frequency	Chi square	df.
ME (CTC pH 8.0) M	100/100	42	35.280		
	100/75	8	13.140		
	75/75	0	1.280	4.762	2
EST-3 (CTC pH 8.0) M	120/120	0	1.125		
	120/100	5	4.750		
	100/100	45	45.125	0.138	2
AK-1 (CTC pH 8.0) L	121/121	9	0.980		
	121/100	0	12.04		
	100/100	41	36.980	78.11	2
AK-2 (CTC pH 8.0) L	117/117	0	0.500		
	117/100	6	9.000		
	100/100	44	40.500	1.802	2
PGDH-1 (CTC pH 8.0) L	102/102	8	1.620		
	102/100	0	14.760		
	100/100	42	33.620	41.975	2
PGDH-2 (CTC pH 8.0) L	100/100	50	50.000	0.000	
EST-1 (CTC pH 8.0) L	100/100	40	41.405		
	100/95	10	8.190		
	95/95	0	0.405	0.853	2
EST-2 (CTC pH 8.0) L	100/100	50	50	0.000	
EST-3 (CTC pH 8.0) L	100/100	50	50	0.000	
AK-2 (CTC pH 8.0) K	200/200	0	0.125		
	200/100	5	4.750		
	100/100	45	45.125	0.138	2
PGDH-2 (CTC pH 8.0) K	106/106	14	3.920		
	106/100	0	20.160		
	100/100	36	25.920	50.000	2
PGI (TEM pH 8.3) K	100/100	35	36.980		
	100/44	15	12.040		
	44/44	0	0.980	1.854	2
PGM (TEM pH 8.3) K	110/110	0	0.72		
	110/100	12	10.56		
	100/100	38	38.72	0.929	2

ตารางที่ 10 (ต่อ)

โลกัส	อัลลีล	Observed Frequency	Expected Frequency	Chi square	df.	
ME (CTC pH 8.0) K	100/100	38	28.280			
	100/63	0	17.480			
	100/38	0	0.760			
	63/63	11	2.645			
	63/38	1	2.578			
	38/38	0	0.005	50.095	5	
EST-2(CTC pH 8.0) H	100/100	50	50.000	0.000		
EST-2 (TEB pH 8.3) H	108/108	0	0.500			
	108/100	10	8.600			
	108/85	0	0.400			
	100/100	36	36.980			
	100/85	4	3.440			
	85/85	0	0.080	1.325	5	
TOTAL				231.981**	30	P<0.01

CTC pH 8.0 : บัฟเฟอร์ Tris-citrate pH 8.0

TEB pH 8.3 : บัฟเฟอร์ Tris-EDTA-borate pH 8.3

M : กล้ามเนื้อ

L : ตับ

K : ไต

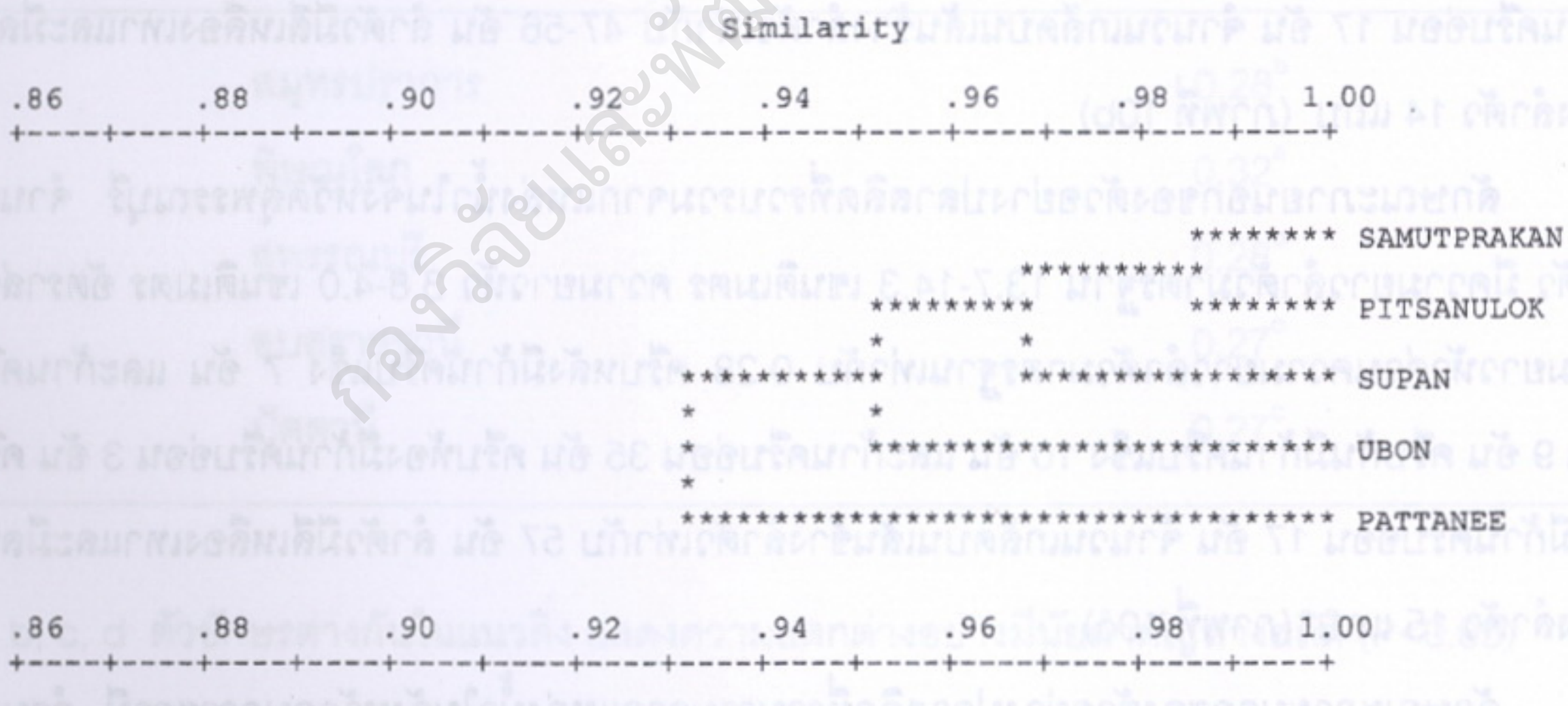
H : หัวใจ

<u>ตารางที่ 11</u> ค่าสัมประสิทธิ์ genetic identity และ genetic distance ของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง

ประชากร	สมุทรปราการ	พิษณุโลก	สุพรรณบุรี	อุบลราชธานี	ปัตตานี
สมุทรปราการ	***	0.015	0.029	0.055	0.073
พิษณุโลก	0.985	***	0.028	0.060	0.080
สุพรรณบุรี	0.972	0.972	***	0.033	0.058
อุบลราชธานี	0.946	0.942	0.968	***	0.073
ปัตตานี	0.930	0.923	0.943	0.929	***

ตัวเลขใต้เครื่องหมาย *** คือค่าของ Nei (1978) unbiased genetic identity

ตัวเลขเหนือเครื่องหมาย *** คือค่าของ Nei (1978) unbiased genetic distance



<u>ภาพที่ 9</u> รูปแบบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง

SAMUTPRAKAN = สมุทรปราการ, PITSANULOK = พิษณุโลก

SUPAN = สุพรรณบุรี, UBON = อุบลราชธานี

PATTANEE = ปัตตานี

<u>การทดลองที่ 3</u>

ศึกษาลักษณะภายนอกของปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง

ลักษณะภายนอกตัวอย่างปลาสลิดที่รวบรวมจากแหล่งน้ำในจังหวัดสมุทรปราการ พิษณุโลก สุพรรณบุรี อุบลราชธานีและปัตตานี มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ลักษณะภายนอกของตัวอย่างปลาสลิดที่รวบรวมจากแหล่งน้ำในจังหวัดสมุทรปราการจำนวน 50 ตัว มีความยาวลำตัวมาตรฐาน 14.0-14.6 เซนติเมตร ความยาวหัว 3.9-4.1 เซนติเมตร อัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวลำตัวมาตรฐานเท่ากับ 0.28 ครีบหลังมีก้านครีบแข็ง 7 อัน และก้านครีบอ่อน 10 อัน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 10-12 อัน และก้านครีบอ่อน 36-37 อัน ครีบท้องมีก้านครีบอ่อน 3 อัน ครีบหางมีก้านครีบอ่อน 14-16 อัน จำนวนเกล็ดบนเส้นข้างลำตัว 55-57 อัน ลำตัวมีสีเหลืองและมีลายขวางลำตัวจำนวน 9-13 แถบ (ภาพที่ 10a)

ลักษณะภายนอกของตัวอย่างปลาสลิดที่รวบรวมจากแหล่งน้ำในจังหวัดพิษณุโลก จำนวน 50 ตัว มีความยาวลำตัวมาตรฐาน 9.7-10.3 เซนติเมตร ความยาวหัว 3.1-3.3 เซนติเมตร อัตราส่วนความยาวหัวส่วนความยาวลำตัวมาตรฐานเท่ากับ 0.32 ครีบหลังมีก้านครีบแข็ง 7 อัน และก้านครีบอ่อน 9 อัน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 10 อัน และก้านครีบอ่อน 36-38 อัน ครีบท้องมีก้านครีบอ่อน 3 อัน ครีบหางมีก้านครีบอ่อน 17 อัน จำนวนเกล็ดบนเส้นข้างลำตัวเท่ากับ 47-56 อัน ลำตัวมีสีเหลืองเทาและมีลายขวางลำตัว 14 แถบ (ภาพที่ 10b)

ลักษณะภายนอกของตัวอย่างปลาสลิดที่รวบรวมจากแหล่งน้ำในจังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 50 ตัว มีความยาวลำตัวมาตรฐาน 13.7-14.3 เซนติเมตร ความยาวหัว 3.8-4.0 เซนติเมตร อัตราส่วนความยาวหัวส่วนความยาวลำตัวมาตรฐานเท่ากับ 0.28 ครีบหลังมีก้านครีบแข็ง 7 อัน และก้านครีบอ่อน 9 อัน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 10 อัน และก้านครีบอ่อน 35 อัน ครีบท้องมีก้านครีบอ่อน 3 อัน ครีบหางมีก้านครีบอ่อน 17 อัน จำนวนเกล็ดบนเส้นข้างลำตัวเท่ากับ 57 อัน ลำตัวมีสีเหลืองเทาและมีลายขวางลำตัว 15 แถบ (ภาพที่ 10c)

ลักษณะภายนอกของตัวอย่างปลาสลิดที่รวบรวมจากแหล่งน้ำในจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 50 ตัว มีความยาวลำตัวมาตรฐาน 15.9-16.8 เซนติเมตร ความยาวหัว 4.3-4.5 เซนติเมตร อัตราส่วนความยาวหัวส่วนความยาวลำตัวมาตรฐานเท่ากับ 0.27 ครีบหลังมีก้านครีบแข็ง 7 อัน และก้านครีบอ่อน 9 อัน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 10 อัน และก้านครีบอ่อน 36 อัน ครีบท้องมีก้านครีบอ่อน 3 อัน ครีบหางมีก้านครีบอ่อน 17 อัน จำนวนเกล็ดบนเส้นข้างลำตัวเท่ากับ 49-56 อัน ลำตัวมีสีเหลืองเทาและมีลายขวางลำตัว 14-15 แถบ (ภาพที่ 10d)

ลักษณะภายนอกของตัวอย่างปลาสลิดที่รวบรวมจากแหล่งน้ำในจังหวัดปัตตานี จำนวน 50 ตัว มีความยาวลำตัวมาตรฐาน 16.7-17.4 เซนติเมตร ความยาวหัว 4.5-4.7 เซนติเมตร อัตราส่วน

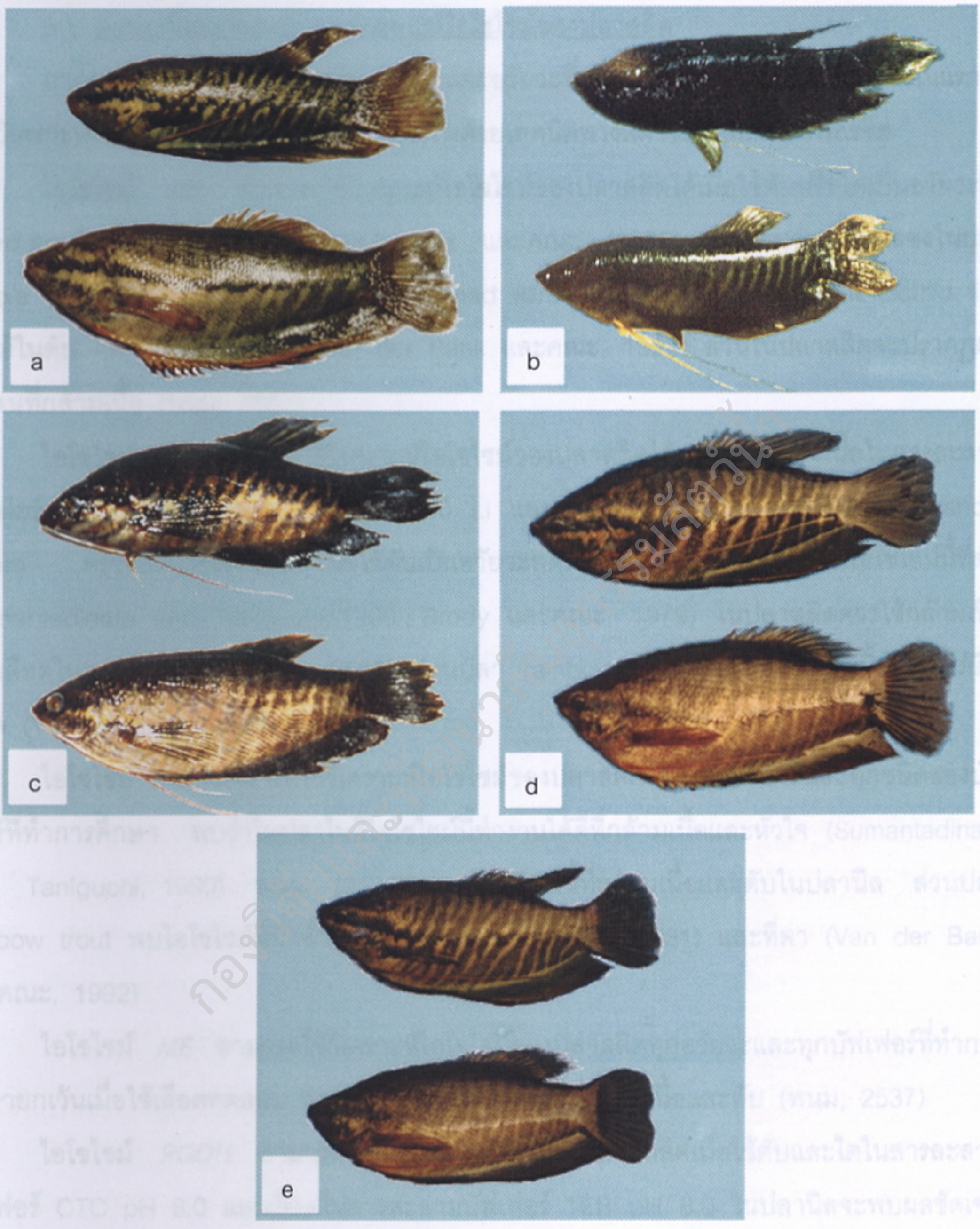
ความยาวหัวส่วนความยาวลำตัวมาตรฐานเท่ากับ 0.27 ครีบหลังมีก้านครีบแข็ง 7 อัน และก้านครีบอ่อน 10 อัน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 10 อัน และก้านครีบอ่อน 37 อัน ครีบท้องมีก้านครีบอ่อน 3 อัน ครีบหางมีก้านครีบอ่อน 15 อัน จำนวนเกล็ดบนเส้นข้างลำตัวเท่ากับ 48-56 อัน ลำตัวมีสีเหลืองเทา และมีลายขวางลำตัว 12-14 แถบ (ภาพที่ 10e)

เมื่อนำความยาวหัวและความยาวลำตัวมาตรฐานมาคิดเป็นอัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวลำตัวมาตรฐานและนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของปลาสลิดจากแหล่งต่างๆ ปรากฏว่าสามารถแบ่งปลาสลิดได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) พิษณุโลก (2) สมุทรปราการและสุพรรณบุรี และ (3) อุบลราชธานีและปัตตานี โดยแต่ละกลุ่มมีอัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวลำตัวมาตรฐานแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ปลาสลิดจากสมุทรปราการและสุพรรณบุรีไม่มีความแตกต่างกัน ปลาสลิดจากอุบลราชธานีและปัตตานีก็ไม่มีความแตกต่างกันเช่นกัน (ตารางที่ 12)

<u>ตารางที่ 12</u> อัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวลำตัวมาตรฐานของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง

แหล่งน้ำในจังหวัด	ความยาวหัว/ความยาวลำตัวมาตรฐาน
สมุทรปราการ	0.28^{b}
พิษณุโลก	0.32^{a}
สุพรรณบุรี	0.28^{b}
อุบลราชธานี	0.27^{c}
ปัตตานี	0.27^{c}

a, b, c, d ตัวอักษรต่างกันในแนวดิ่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



<u>ภาพที่ 10</u> ตัวอย่างปลาสลิดที่รวบรวมจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง (บน : ตัวผู้ ; ล่าง : ตัวเมีย)
(a) สมุทรปราการ (b) พิษณุโลก (c) สุพรรณบุรี (d) อุบลราชธานี และ (e) ปัตตานี

6. วิจารณ์ผล

5.1 <u>สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไอโซไซม์ของปลาสลิด</u>

การหาชนิดของไอโซไซม์ บัฟเฟอร์ และอวัยวะที่เหมาะสมของปลาสลิดเป็นขั้นตอนแรกในการวิเคราะห์ไอโซไซม์เพื่อหาข้อมูลทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางสตาชเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส

ไอโซไซม์ *AK* สามารถใช้วิเคราะห์ไอโซไซม์ของปลาสลิดได้เมื่อใช้ตับหรือไตเป็นอวัยวะในการทดสอบในบัฟเฟอร์ CTC pH 8.0 Criz และคณะ (1982) รายงานว่าเมื่อทดลองในปลา *Tilapia (C.) zillii* ตรวจพบไอโซไซม์นี้ที่ตับ ganad สมอง ตา และกล้ามเนื้อ และใน cichlid fish พบได้ในตับ กล้ามเนื้อและหัวใจ (Van der Bank และคณะ, 1992) ส่วนในปลาสลิดจะปรากฏผลชัดเจนที่กล้ามเนื้อ (พนม, 2537)

ไอโซไซม์ *EST* สามารถใช้วิเคราะห์ไอโซไซม์ของปลาสลิดได้ เมื่อใช้กล้ามเนื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ TEB pH 8.3 และ CTC pH 8.0 Li และคณะ (1993) รายงานว่าใน blunt snout bream ตรวจสอบไอโซไซม์นี้ได้เมื่อใช้ตับเป็นอวัยวะทดสอบ ในปลาไนสีจะพบไอโซไซม์นี้ที่ตับ (Sumantadinata และ Taniguchi, 1990 ; Brody และคณะ, 1979) ในปลาสลิดควรใช้กล้ามเนื้อและเลือดในการตรวจสอบ (พนม, 2537) ส่วนปลา rainbow trout พบว่าไอโซไซม์นี้ทำงานได้ดีที่หัวใจ (Vander Bank และคณะ, 1992)

ไอโซไซม์ *PGI* สามารถใช้วิเคราะห์ไอโซไซม์ของปลาสลิดได้ในทุกอวัยวะและทุกชนิดของบัฟเฟอร์ที่ทำการศึกษา พบว่าในปลาไนสีไอโซไซม์นี้ทำงานได้ดีที่กล้ามเนื้อและหัวใจ (Sumantadinata และ Taniguchi, 1990) พนม (2537) พบไอโซไซม์นี้ที่กล้ามเนื้อและตับในปลานิล ส่วนปลา rainbow trout พบไอโซไซม์นี้ที่กล้ามเนื้อ (Taggart และคณะ, 1981) และที่ตา (Van der Bank และคณะ, 1992)

ไอโซไซม์ *ME* สามารถใช้วิเคราะห์ไอโซไซม์ของปลาสลิดทุกอวัยวะและทุกบัฟเฟอร์ที่ทำการศึกษายกเว้นเมื่อใช้เลือดทดสอบ ส่วนปลานิลพบไอโซไซม์นี้ที่กล้ามเนื้อและตับ (พนม, 2537)

ไอโซไซม์ *PGDH* สามารถใช้วิเคราะห์ไอโซไซม์ของปลาสลิดเมื่อใช้ตับและไตในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC pH 8.0 และเลือดในสารละลายบัฟเฟอร์ TEB pH 8.0 ในปลานิลจะพบผลชัดเจนที่กล้ามเนื้อ (พนม, 2537) ส่วนปลา rainbow trout พบได้ในตับ (Van der Bank และคณะ, 1992)

ไอโซไซม์ *PGM* สามารถใช้วิเคราะห์ไอโซไซม์ของปลาสลิดเมื่อใช้ตับในสารละลายบัฟเฟอร์ TEB pH 8.3 และตรวจสอบพบในกล้ามเนื้อของปลาไนสี (Sumantadinata และ Taniguchi, 1990) และในปลา rainbow trout (Van der Bank และคณะ, 1992)

5.2 <u>ความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง</u>

ประชากรปลาสลิดที่รวบรวมจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง มีความแตกต่างและคล้ายคลึงกันที่รูปแบบของไอโซไซม์และค่าทางพันธุกรรม

ไอโซไซม์ *AK* ของปลาสลิดในไตมีรูปแบบของไอโซไซม์คล้ายคลึงกับที่พบในหอย (Durand และคณะ, 1993) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ที่โลกัส *AK–1* ของประชากรปลาสลิดจากอุบลราชธานีและสมุทรปราการมีค่าสูงสุดและต่ำสุดตามลำดับ แสดงว่าประชากรปลาสลิดจากอุบลราชธานีมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อยที่สุดที่โลกัสนี้ และประชากรจากสมุทรปราการมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมมากที่สุด ส่วนประชากรปลาสลิดจากพิษณุโลกมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่โลกัส *AK–2* น้อยที่สุด และประชากรจากอุบลราชธานีมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมมากที่สุด เมื่อพิจารณาค่า genetic identity ของโลกัสนี้ พบว่าประชากรจากอุบลราชธานีมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากประชากรแหล่งอื่น ๆ

ไอโซไซม์ *EST* ของปลาสลิดพบว่ามี 1 โลกัส กล้ามเนื้อมี 2 อัลลีล มีโลกัสเป็นแบบโพลิมอร์ฟิค ส่วนหัวใจมี 3 อัลลีล มีปัตตานีเพียงประชากรเดียวที่มีโลกัสเป็นแบบโมโนมอร์ฟิค นอกนั้นเป็นโพลิมอร์ฟิค ที่ตับพบ 3 โลไซเช่นเดียวกับที่พบในปลา blunt snout bream (Li และคณะ, 1993) ส่วนในปลาไนสีพบเพียง 1 โลกัส มี 2-3 อัลลีล (Sumantadinata และ Taniguchi, 1990) โครงสร้างโมเลกุลของไอโซไซม์นี้เป็นโมโนเมอร์ ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ของประชากรจากสุพรรณบุรีและปัตตานีมีค่าสูงสุดแสดงว่ามีความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่โลกัส *EST–1* นี้ต่ำที่สุด ประชากรจากสมุทรปราการมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่โลกัส *EST–2* ต่ำสุด ประชากรจากสมุทรปราการและอุบลราชธานีมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่โลกัส *EST–3* ต่ำสุด จากค่า genetic identity ของทั้ง 3 โลกัส พบว่าประชากรจากทุกแหล่งมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม

ไอโซไซม์ *ME* ของปลาสลิดที่กล้ามเนื้อพบว่ามี 1 โลกัส 2-3 อัลลีล เป็นแบบโพลิมอร์ฟิคในสารละลายบัฟเฟอร์ CTC แต่เป็นแบบโมโนมอร์ฟิคในสารละลายบัฟเฟอร์ TEB ซึ่งแตกต่างจากปลา common carp ที่พบไอโซไซม์นี้ถึง 2 โลกัส (Sumantadinata และ Taniguchi, 1990) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ของประชากรจากอุบลราชธานีมีค่าต่ำที่สุด แสดงว่ามีความแปรปรวนทางพันธุกรรม ณ โลกัสนี้สูงสุด ค่า genetic identity ณ โลกัสนี้แสดงให้เห็นว่าประชากรจากทุกแหล่งมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม

ไอโซไซม์ *PGDH* ของปลาสลิดที่ตับพบว่ามี 2 โลไซ 4 อัลลีล โดยตัวอย่างจากทุกประชากรเป็นโฮโมไซโกตและมีสภาพโลกัสเป็นโมโนมอร์ฟิค ที่ไตพบเพียงโลกัสเดียวมี 1-3 อัลลีล และโลกัสมีสภาพเป็นโมโนมอร์ฟิค Sodsuk (1993) และ McAndrew และ Majumdar (1983) พบไอโซไซม์นี้ที่กล้ามเนื้อมี 1 โลกัส ในปลาทุกชนิดและพบแถบ 3 แถบ ในตัวอย่างที่เป็นเฮตเทอโรไซโกต ซึ่งชี้

ให้เห็นถึงโครงสร้างโมเลกุลว่าเป็นแบบไดเมอร์ และจากค่า genetic identity ที่โลกัส PDGH–1 แสดงให้เห็นว่าประชากรจากปัตตานีมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากประชากรอื่น ๆ

ไอโซไซม์ *PGI* ของปลาสลิดที่ไตพบว่ามี 1 โลกัส 2 อัลลีล และมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบไดเมอร์ ในหอยพบ 1 โลกัสเช่นเดียวกับปลาสลิดแต่มีถึง 9 อัลลีล (Duran และคณะ, 1993) ในปลา brown trout สามารถใช้โลกัส *PGI-2* เป็น genetic maker สำหรับจำแนกประชากรจากแม่น้ำออกจากประชากรอื่น ๆ (Martinez และคณะ, 1993) และในปลา common carp พบไอโซไซม์นี้ถึง 3 โลกัสที่กล้ามเนื้อและหัวใจ ซึ่งสามารถใช้เป็น genetic maker ได้เช่นกัน (Sumantadinata และ Taniguchi, 1990) ค่า genetic identity ของปลาสลิดจากการศึกษานี้แสดงว่าประชากรจากพิษณุโลกมีพันธุกรรมแตกต่างจากประชากรอื่น ๆ

ไอโซไซม์ *PGM* ของปลาสลิดที่ไตและหัวใจพบว่ามี 1 โลกัส 2 อัลลีล ไอโซไซม์นี้ที่กล้ามเนื้อของปลา common carp พบว่ามี 1 โลกัส 2 อัลลีล ในประชากรจากญี่ปุ่นและมี 3 อัลลีลในประชากรจากอินโดนีเซีย (Sumantadinata และ Taniguchi, 1990) ค่า genetic identity ที่โลกัสนี้ของปลาสลิดแสดงให้เห็นว่าประชากรจากทุกแหล่งมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม

ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้โดยเฉลี่ยแต่ละประชากรพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วง 0.217 – 0.253 ซึ่งมีค่าค่อนข้างสูง และจำนวนอัลลีลโดยเฉลี่ยต่อโลกัสมีค่าน้อยเท่ากับ 1.92 - 2.17

ค่า genetic identity ของทุกโลไซซึ่งคำนวณตามวิธีของ Nei (1978) ระหว่างประชากรของสมุทรปราการและพิษณุโลกมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.985 และมีค่า genetic distance ต่ำสุดเท่ากับ 0.028 แสดงให้เห็นว่าประชากรจากสมุทรปราการมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับประชากรจากพิษณุโลกมากที่สุด ส่วนประชากรจากพิษณุโลกมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากประชากรปัตตานีมากที่สุด เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์ genetic similarity และ genetic distance มาทำเป็น dendrogram เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ จะพบว่าประชากรจากจังหวัดปัตตานีมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากประชากรแหล่งอื่น ๆ ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสามารถเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้คือ สมุทรปราการ พิษณุโลก สุพรรณบุรี อุบลราชธานี และปัตตานีตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า genetic identity ของทุกคู่ประชากรที่มีค่าอยู่ในช่วง 0.923 – 0.985 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียง 1.00 แสดงให้เห็นว่ามีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมาก จึงอาจกล่าวได้ว่าประชากรปลาสลิดจาก 5 แหล่งนี้มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่มาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีการขยายพื้นที่การเลี้ยงปลาสลิดจากภาคกลางไปยังภาคอื่น ๆ ทำให้มีการเคลื่อนย้ายพันธุ์ปลาสลิดโดยเฉพาะจากจังหวัดสมุทรปราการไปยังแหล่งอื่น ๆ อันเป็นผลทำให้ประชากรมีความคล้ายคลึงกัน และจากการทดสอบค่าไคม์สแควร์ของประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำทั้ง 5 แหล่ง พบว่าประชากรปลาสลิดทั้ง 5 แหล่งนี้ไม่อยู่ในสมดุลย์ของฮาร์ดี้และไวน์เบิร์ก ซึ่งอาจเนื่องมาจากการขยายพื้นที่การเลี้ยงปลาสลิดไปยังจังหวัดอื่น ๆ และมีฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาสลิดมากขึ้น โดยมีการนำพันธุ์ปลาที่เลี้ยง

ไว้ในฟาร์มมาเพาะพันธุ์ นอกจากนี้ปลาสลิดจากฟาร์มเหล่านั้นอาจหลุดรอดสู่แหล่งน้ำธรรมชาติอันเป็นสาเหตุให้ประชากรปลาสลิดไม่อยู่ในสมดุลย์ดังกล่าว

5.3 <u>ความแตกต่างของลักษณะภายนอกของปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง</u>

จากการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกของปลาสลิดจากแหล่งน้ำ 5 แหล่ง โดยใช้อัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวลำตัวมาตรฐานเป็นหลัก พบว่าปลาสลิดจากจังหวัดสมุทรปราการและสุพรรณบุรีมีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ไอโซไซม์ที่พบว่าประชากรจาก 2 แหล่งนี้มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม การที่ประชากรจาก 2 แหล่งน้ำมีความคล้ายคลึงกันทั้งลักษณะภายนอกและพันธุกรรม เนื่องจากจังหวัดสมุทรปราการมีพื้นที่ใกล้เคียงกับจังหวัดสุพรรณบุรีมากที่สุดและมีการเลี้ยงปลาสลิดที่คล้ายคลึงกัน จึงอาจมีการนำพันธุ์ปลาจากจังหวัดสมุทรปราการไปเลี้ยงที่จังหวัดสุพรรณบุรี ปลาสลิดจากจังหวัดอุบลราชธานีและปัตตานีก็มีความคล้ายคลึงกันทั้งลักษณะภายนอกและพันธุกรรมเช่นกัน ส่วนปลาสลิดจากจังหวัดสมุทรปราการและจังหวัดปัตตานีมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมและลักษณะภายนอก ปลาสลิดจากจังหวัดพิษณุโลกถึงแม้จะมีพันธุกรรมคล้ายคลึงกับปลาสลิดจากจังหวัดสมุทรปราการมากที่สุด แต่มีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกัน

6. สรุปและข้อเสนอแนะ

6.1 สามารถใช้ไอโซไซม์ 6 ชนิด คือ ไอโซไซม์ *AK, EST, ME, PGDH, PGI* และ *PGM* ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปลาสลิด โดยใช้อวัยวะกล้ามเนื้อ ตับ ไต และหัวใจ และสารละลายบัฟเฟอร์ Tris Citrate pH 8.0 และ Tris – EDTA – Borate pH 8.3

6.2 ประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำทั้ง 5 แหล่ง มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม โดยประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำในจังหวัดสมุทรปราการและพิษณุโลกมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมากที่สุด ส่วนประชากรปลาสลิดจากแหล่งน้ำในจังหวัดพิษณุโลกและปัตตานีมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากที่สุด

6.3 ปลาสลิดจากแหล่งน้ำในจังหวัดสมุทรปราการและสุพรรณบุรีมีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกัน ปลาสลิดจากแหล่งน้ำในจังหวัดอุบลราชธานีและปัตตานีก็มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกัน ส่วนประชากรปลาสลิดจากจังหวัดพิษณุโลกมีลักษณะภายนอกแตกต่างจากปลาสลิดแหล่งอื่น ๆ

6.4 ปลาสลิดจากแหล่งน้ำในจังหวัดสมุทรปราการและสุพรรณบุรีมีความคล้ายคลึงกันทั้งทางพันธุกรรมและลักษณะภายนอก ส่วนปลาสลิดจากแหล่งน้ำในจังหวัดสมุทรปราการและปัตตานีมีความแตกต่างกันทั้งทางพันธุกรรมและลักษณะภายนอก

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ คุณธงชัย ธรรมเสถียร คุณสมนึก คงทรัตน์ ธรรมชาติฟาร์ม จังหวัดสุพรรณบุรี คุณจินตนา ดำรงไตรภพ และคุณอำพร ศักดิ์เศรษฐ ซึ่งให้ความอนุเคราะห์ในการรวบรวมตัวอย่างปลาสลิดจากแหล่งน้ำต่าง ๆ เพื่อใช้ในการศึกษานี้

8. เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2536. การศึกษาชีววิทยาของปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด, กรมประมง. 26 น.

กรมประมง. 2541. สถิติผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืด ปี พ.ศ. 2538. กองเศรษฐกิจการประมง เอกสารฉบับที่ 9/2541. 57 น.

เจียมจิตต์ บุญสม. 2532. การเลี้ยงปลาสลิดในพื้นที่ดินพรุและการแปรรูป. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. กรมประมง. 20 น.

ธนิต ผิวนิ่ม. 2528. เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง "การแยกสารทางชีวเคมี" คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยศิลปากร, กรุงเทพมหานคร. 65-89 น.

ธวัชชัย งามสันติวงศ์. 2537. SPSS / PC + หลักการและวิธีการใช้คอมพิวเตอร์ในการสถิติเพื่อการวิจัย. โรงพิมพ์ลินคอร์น, กรุงเทพมหานคร. 601 น.

บุญ อินทรัมพรรย์. 2523. ปลาสลิด (เรื่องเก่าเล่าใหม่). ราชบัณฑิตยสถาน, กรุงเทพมหานคร. 21 น.

บุญยรัตน์ จันทร์สว่าง. 2523. ชีวประวัติปลาสลิด. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. กรมประมง. 30 น.

พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข. 2537. ข้อมูลทางพันธุกรรมสำหรับตรวจสอบปลาในกลุ่มปลานิล 4 ชนิดโดยวิธีอิเล็คโตรโฟเรซิส. วารสารการประมง 47 : 525 – 539.

เผดิม ระติสุนทร และประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. ไม่ปรากฏปีที่ตีพิมพ์. พันธุศาสตร์ปริมาณ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 190 น.

วิไลลักษณ์ นุชประมูล, กังวาฬ ทรัพย์อาจิณ, วัชรี หิรัญยะวิสิต, วารุณี เกียรติดุริยกุล, บังอร ณ พัทลุง, ทวีสุข กรรณล้วน, อัมรินทร์ ปรีชาวุฒิ, สุพรรณี ศานติวิจัย, ปราณิต ประวัติเมือง และสุวัฒน์ มั่นสวัสดิ์. 2528. อิเล็คโตรโฟเรซิสทางการแพทย์. คณะเทคนิคการแพทย์, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร. 53 น.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2535. การเพาะขยายพันธุ์ปลา. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 239 น.

Abersold, P. B., G. A. Winans, D.J. Teel, G.B. Milner and F.M. Utter. 1987. Manual for starch gel electrophoresis : A method for the detection of genetic variation. U.S. Department of Commerce. 20 p.

Almeda – Val, V. M. F. D., M . D. N. P. D. Silva, M. C. D. M. Caraciolo, L. S. B. D. Mesquita, I. P. Farices and A. I. Val. 1992. LDH – isozymes in Amazon fish – III. Distribution patterns and function properties in Serrasalmidae (Teleotei : Ostariophysi). Comp. Biochem. Physiol. 103B (1) : 119 – 125.

Basaglia, F. 1991. Malate dehydrogenase isozymes in fifteen Sparidae species (Perciformes, Teleostei). Comp. Biochem. Physiol. 98B (1) : 9-19.

Brodey, M. M. and S. H. Bishop. 1979. Malate dehydrogenase isoforms from Ribbed mussel (*Modiolus demissus*) gill tissue. Comp. Biochem. Physiol. 100B (4) : 775 – 782

Creech, S., 1991. An electrophoretic investigation of populations of *Atherina boyeri* Risso, 1810 and *A. presbyter* Cuvier, 1829. (Teleostei : Atherinidae) : genetic evidence in support of the two species. J. Fish Biology 39 : 807 – 816. Cross, T. f., R. D. Ward and A. Abreu – Grobots. 1979. Duplicate loci and allelic variation for mitochondrial malic enzyme in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Comp. Biochem. Physiol. 62B : 403 – 406.

Crozier, W. W. and J. J. Moffett. 1990. Inheritance of allozyme in Atlantic salmon (Salmo salar L.). Aquaculture 88 : 253 – 262.

Dey A. C. 1984. Distribution of malate dehydrogenase in different tissues of rainbow trout (Salmo gairdneri) of different ages. Comp. Biochem. Physiol. 77B : 675 – 678.

Durand, P., K. T. Wanda and F. Blanc. 1993. Genetic variation in wild and hatchery stocks of the black pearl oyster, Pinctada margaritifera, from Japan. Aquaculture 110 : 27 – 40.

Harris, H. and D. A. Hopkinson. 1977. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. New York. 303 p.

Harlt, D. L. and A. G. Clark. 1989. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc. Pub. Sunderland, Massachusetts, U.S.A. 682 p.

Koljonen, M. L. 1986. The enzyme gene variation of ten Finnish rainbow trout strains and the relation between growth rate and mean heterozygosity. Aquaculture 57 : 257 – 260.

Kyriakopoulou – Sklavounou, P., Y. Karakousis and B. Alexiou. 1992. A morphometric and electorphoretic study of two populations of *Hyla arborea* L. in Greeze. Comp. chem. Physiol. 103b : 715 – 719.

Leider, S. A., P.L. Haulett, J.J. Loch and M. W. Chilcote. 1990. Electrophoretic Comparison of the reproductive success of naturally spawning transplanted and wild Steelhead trout through the returning adult stage. Aquaculture 88 : 239 – 252.

Li, Sifa., W. Cai and B. Zhou. 1993. Variation in morphology and biochemical genetic markers among populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). Aquaculture 111 : 117 – 127.

Low, W. P., S. F. Chew and Y.K. Ip. 1992. Differences in electrophoretic patterns of lactate dehydrogenases from the gills, hearts and muscles of three mudskippers. J. of Fish Biology 40 : 975 – 977.

McAndrew, B. J. 1992. Lecture notes on population genetics. AADCP / WP / 16, 45 pp.

Macaranas, J. M. 1991. A practical laboratory guide to techniques and methodology of electrophoresis and its application to fisheries management. Philippines council for aquatic and marine research and development, Philippines. 47 pp.

Martinez, P., J. Arias, J. Castro and L. Sanchez. 1993. Differentially stocking incidence In brown trout (*Salmo trutta*) populations from northwestern Spain. Aquaculture 114 : 203 – 216.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distavce from a small number of individuals. Genetics 89 : 583 – 590.

Pasteur, N., G. Pasteur, F. Bonhomme, J. Catalan and J. Britton – Davidian. 1988. Practical isozyme genetics. 215 pp.

Salvatorelli G., F. Basaglia, A. Santulli, P. Ferioli, V. D' Amelio and Basciano. 1987. Evolution of some enzymatic patterns during development in Sparus aurata. Acta. Embryol. Morphol. Expn. 8 : 299 – 305.

Sodsuk, P. K. 1993. Molecular genetics and systematic of tilapiiane cichlids using allozymes and morphological characters. PhD thesis, University of Stirling, Scotland. 308 pp.

Sumantadinata, K. and N. Taniguchi. 1990. Comparison of electropheretic allele frequencies and genetic variability of common carp stocks from Indonesia and Japan. Aquaculture 110 : 41 – 50.

Swofford, D. L. 1989. Biosys – 1, A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Population Genetics and Biochemical Sytematics. Illinois, U.S.A. 43 pp.

Taggart, J., A. Ferguson F.M. Mason. 1981. Genetic variation in Irish populations of brown trout (Salmo trutta L.) : Electrophoretic analysis of allozymes. Comp. Biochem. Physiol. 69B : 393 – 412.

Teugels, G. G., R. Guyomard and M. Legendre. 1992. Enzymatic variation in African clariid catfishes. J. Fish. Biology 40 : 87 – 96.

Van der Bank, F. H., M. K. J. Swart and T. Ferreira. 1992. Genetic variation in nine rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) populations in South Africa. Comp. Biochem. Physiol. 103B : 495 – 499.

Van Der Bank, F. H., W. S. Grant and J. T. Ferrenira. 1989. Electrophoretically detectable genetic data for fifteen southern African cichlids. J. of Fish Biology 34 : 465 – 483.

Whitmore, D. H. 1990. Electrophoresis and Isolectric Focusing Tecniques in Fisheries Management. CRC. Press, Florida. 350 pp.

9. ภาคผนวก

9.1 <u>ส่วนประกอบสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ไอโซไซม์</u>

1) ไอโซไซม์ Aspatate amino transferase (AAT) : EC. 2.6.1.1

0.2 M Tris / HCl pH 8.0	20	ml
L – aspatic acid	50	ml
α- ketoglutaric acid	25	mg
ปรับ pH 8.0 ด้วย NaOH แล้วเติม		
Pyridoxal – 5' – phosphate	5	mg
Fast Blue BB	30	mg
2% Agar ใน 0.2 M Tris / HCl pH 8.0	12.5	ml

(Pasteur และคณะ, 1988 ; Macaranas, 1991)

2) ไอโซไซม์ Adenylate kinase (AK) : EC. 2.7.4.3

Glucose	50	mg
ADP	20	mg
NADP	1	ml
$MgCl_2$ (1M)	200	µl
MTT	1	ml
PMS	1	mg
HK 20 unit	2.8	µl
G6PDH 14 unit	5.6	µl
0.2 M Tris / HCl pH 8.0	20	ml
2% Agar	20	ml

(Pasteur และคณะ, 1988 ; Macaranas, 1991 ; Whitmore, 1990)

3) ไอโซไซม์ Esterase (EST) : EC. 3.1.1.1

α - napthyl acetate	10	mg
β - napthyl acetate	10	mg
(ละลายใน acetone 2 % ปริมาณ 1 ml และน้ำกลั่น 1 ml)		
Fast blue RR	10	mg
0.1 M PO_4 pH 6.5 – 7.0	20	ml

2% Agar	20	ml

(Pasteur และคณะ, 1988 ; Macaranas, 1991 ; Whitmore, 1990)

4) ไอโซไซม์ Fumarase (FUM) : EC. 4.2.1.2

Fumaric acid	30	mg
NAD	2	ml
MTT	1	ml
PMS	1	ml
MDH 40 unit	12	µl
0.2 M Tris / HCl pH 8.0	20	ml
2% Agar	10	ml

(Pasteur และคณะ, 1988 ; Whitmore, 1990)

5) ไอโซไซม์ Glucose dehydrogenase (GCDH) : EC 1.1.1.47

D – Glucose	4.5	g
NAD	1	ml
MTT	1	ml
PMS	1	ml
0.1 M phosphate pH 7.0	10	ml
2% Agar	10	ml

(Whitmore, 1990)

6) ไอโซไซม์ Hexokinase (HK) : EC. 2.7.1.1

Glucose	60	mg
MgCl	1	ml
ATP	15	mg
NADP	1	ml
MTT	1	ml
G6PDH 14	20	µl
0.2 M Tris / HCl pH 7.0	10	ml
PMS	1	ml
2% Agar	20	ml

(Pasteur และคณะ, 1988 ; Macaranas, 1991 ; Whitmore, 1990)

7) ไอโซไซม์ L – Iditol dehydrogenase (IDDH) : EC. 1.1.1.14

Sorbitol	50	mg
NAD	1	ml
MTT	1	ml
PMS	1	ml
0.2 Tris / HCl pH	10	ml
2% Agar	10	ml

(Pasteur และคณะ, 1988 ; Macaranas, 1991 ; Whitmore, 1990)

8) ไอโซไซม์ Malate dehydrogenase (MDH) : EC. 1.1.1.37

substrate solution	3	ml
NAD	1	ml
MTT	1	ml
0.2 M Tris / HCl pH 8.0	10	ml
2% Agar	10	ml

substrate solution : DL – Malic acid 13.4 g + H_2O 50 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) แล้วเติมน้ำให้ได้ 100 ml เก็บเป็น stock solution

(Pasteur และคณะ, 1988 ; Macaranas, 1991 ; Whitmore, 1990)

9) ไอโซไซม์ Malic enzyme (ME) : EC. 1.1.1.40

(Malate dehydrogenase – NADP dependent)

substrate solution	5	ml
10% $MgCl_2$	1	ml
NADP	1	ml
NBT	20	mg
PMS	1	ml
0.1 M Tris / HCl pH 8.0	10	ml
2% Agar	10	ml

substrate solution : DL – Malic acid 13.4 g + H_2O 50 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) แล้วเติมน้ำให้ได้ 100 ml เก็บเป็น stock solution

(Pasteur และคณะ, 1988 ; Macaranas, 1991 ; Whitmore, 1990)

10) ไอโซไซม์ Mannosephosphate isomerase (MPI) : EC. 5.3.1.8

(Mannose – 6 phosphate isomerase)

Mannose – 6 – phosphate	10	mg
NADP	1	ml
MTT	1	ml
1 M MgCl	50	µl
PMS	1	ml
0.2 M Tris / HCl 8.0	10	ml
G6PDH 50 unit	10	µl
GPI 50 unit	10	µl

(Pasteur และคณะ, 1988 ; Macaranas, 1991 ; Whitmore, 1990)

11) ไอโซไซม์ Glucosephosphate isomerase (GPI) : EC. 5.3.1.9

(PHI =Phosphohexose isomerse; Oxoisomerase; Phosphoxomutase)

(HPI = Hexosephosphate isomerase)

(Glucose – 6 – phosphate isomerase)

(PGO = Phosphoglucosisomerase)

(Phospho saccharomutase)

(D – glucose – 6 – lectol isomerase)

Fructose – 6 - phosphate	10	mg
NADP	1	ml
1M $MgCl_2$	50	µl
MTT	1	ml
PMS	1	ml
G6PDH 250 unit / ml	10	µl
0.2 M Tris / HCl pH 8.0	10	ml
2% Agar	10	ml

(Pasteur และคณะ, 1988 ; Macaranas, 1991 ; Whitmore, 1990)

12) ไอโซไซม์ Phosphogluconate dehydrogenase(PGDH) : EC.1.1.1.44

(6 – Phosphogluconic dehydrogenase) ;

6 – phosphogluconic acid	80	mg
NADP	1	ml

1 M $MgCl_2$	200	µl
MTT	1	ml
PMS	1	ml
0.2 M Tris / HCl pH 8.0	15	ml
2% Agar	15	ml

(Pasteur และคณะ, 1988 ; Macaranas, 1991 ; Whitmore, 1990)

13) ไอโซไซม์ Phosphoglucomutase (PGM) : EC. 5.4.2.2

(Glucose phosphomutase)

Glucose 1 – phosphate (Na_2 salt)	50	mg
NADP	1	ml
1 M $MgCl_2$	200	µl
MTT	1	ml
PMS	1	ml
G6PDH 50 unit	200	µl
0.2 M Tris / HCl pH 8.0	15	ml
2% Agar	15	ml

(Pasteur และคณะ, 1988 ; Macaranas, 1991 ; Whitmore, 1990)

14) ไอโซไซม์ Pyruvate kinase (PK) : EC. 2.7.1.40

Phospho (elno) pyruvate (Na_3 salt)	15	mg
Fructose – 1' 6 – diphosphate (Na_4 salt)	15	mg
ADP	25	mg
NADP	20	mg
KCl	80	mg
1 M $MgCl_2$	1	ml
Lactate dehydrogenase 100 unit	10	µl
0.2 M Tris / HCl pH 8.0	15	ml
2% Agar	15	ml
$MgSO_4$ $7H_2O$	50	mg

(Pasteur และคณะ, 1988 ; Whitmore, 1990)

9.2 <u>สารละลายบัฟเฟอร์</u>

1) Tris – Citrate (CTC)

Tris	83.2	g
Citric acid	33	g
เติมน้ำ	1,000	ml

ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 เก็บเป็น stock solution

gel buffer : stock solution 10 ml : H_2O	300	ml
Electrode buffer : stock solution 60 ml : H_2O	250	ml

(Pasteur และคณะ, 1988)

2) Tris – EDTA – Borate (TEB)

700 mM Tris	84.77	g
500 mM Boric acid	30.92	g
20 mM EDTA	7.45	g

ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 หรือ 8.3 เก็บเป็น stock solution

Cathode (-) electrode buffer :dilute1 : 5 with distilled water 50 : 250 ml

Anode (+) electrode buffer: dilute 1 : 7 with distilled water 75 : 525 ml

(Market และ Faulhaber, 1965)

9.3 <u>การคำนวณค่าสถิติ</u>

1) Expected heterozygosity (unbiased estimate of Nei, 1978)

การคำนวณค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้มีสูตรดังนี้

$$h = 2n\ (1 - \sum p^2_i) / (2n - 1)$$

ขณะที่ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตี้ที่ทุกโลไซมีสูตรคำนวณคือ

$$H = \sum h_k / r$$

โดยที่ p_i คือค่าความถี่ของแต่ละอัลลีล ณ โลกัสหนึ่ง ๆ ของแต่ละตัวอย่างในกลุ่มประชากร

h_k คือค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ของโลกัสตำแหน่ง k

r คือจำนวนโลไซทั้งหมดที่ทำการศึกษา

n คือจำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มประชากร

$$S.E. = \sqrt{Var}$$

$$Var = \sum (h_k - H)^2 / r\ (r - 1)$$

2) Genetic distances (Unbiased genetic distance ของ Nei, 1978)

เมื่อ x_i และ y_i เป็นความถี่ของอัลลีลที่ i ของกลุ่มประชากร x และ y Nei (1978)' s unbiased genetic distance สามารถคำนวณได้ตามสูตรดังนี้

$$D_n = -\ln (J_{xy} / \sqrt{J_x J_y})$$

เมื่อ J_{xy} , J_x และ J_y คือ arithmetic means across loci of $x_i y_i$, $(2n_x \sum x^2_i -1) / (2n_x - 1)$ และ $(\sum y^2_i -1) / (2n_y - 1)$ ตามลำดับ