เอกสารวิชาการฉบับที่ ๒/๒๕๖๕

Technical Paper No. 2/2022

การวิเคราะห์เส้นทางการแพร่ระบาดของปลาหมอสีคางดำ ในเขตพื้นที่ชายฝั่งของไทยจากโครงสร้างพันธุกรรมของประชากร

Origin and Distribution of Invasive Blackchin Tilapia (*Sarotherodon melanotheron* Rüppell, 1852), on Coastal Area of Thailand

อภิรดี หันพงศ์กิตติกูล Apiradee Hanpongkittikul
วงศ์ปฐม กมลรัตน์ Wongpathom Kamonrat
ทิวารัตน์ เถลิงเกียรติลีลา Tiwarat Thalerngkietleela
สุภาภรณ์ ชาวสวน Supaporn Chaosuan

กองวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด
กรมประมง
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Inland Fisheries Research and Development Division
Department of Fisheries
Ministry of Agriculture and Cooperatives

เอกสารวิชาการฉบับที่ ๒/๒๕๖๕ Technical Paper No. 2/2022

การวิเคราะห์เส้นทางการแพร่ระบาดของปลาหมอสีคางดำ ในเขตพื้นที่ชายฝั่งของไทยจากโครงสร้างพันธุกรรมของประชากร

Origin and Distribution of Invasive Blackchin Tilapia (*Sarotherodon melanotheron* Rüppell, 1852), on Coastal Area of Thailand

อภิรดี หันพงศ์กิตติกูล Apiradee Hanpongkittikul
วงศ์ปฐม กมลรัตน์ Wongpathom Kamonrat
ทิวารัตน์ เถลิงเกียรติลีลา Tiwarat Thalerngkietleela
สุภาภรณ์ ชาวสวน Supaporn Chaosuan

กลุ่มวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพสัตว์น้ำจืด Inland Fishereies Biodiversity Research Group
กองวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด Inland Fisheries Research and Development Division
กรมประมง Department of Fisheries
๒๕๖๕ 2022

รหัสทะเบียนวิจัย 63-1-0404-63040-02

สารบาญ

สารบาญตาราง

สารบาญภาพ

การวิเคราะห์เส้นทางการแพร่ระบาดของปลาหมอสีคางดำ (*Sarotherodon melanotheron* Rüppell, 1852) ในเขตพื้นที่ชายฝั่งของไทย จากโครงสร้างพันธุกรรมของประชากร

อภิรดี หันพงศ์กิตติกูล[1*], วงศ์ปฐม กมลรัตน์[2], ทิวารัตน์ เถลิงเกียรติลีลา[1] และ สุภาภรณ์ ชาวสวน[1]

[1]กองวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง

[2]ข้าราชการบำนาญ

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์เส้นทางการแพร่ระบาดของปลาหมอสีคางดำในเขตพื้นที่ชายฝั่งจังหวัดของไทย ได้แก่ สมุทรสงคราม เพชรบุรี ระยอง ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม Mitochondrial DNA ที่ตำแหน่ง D-loop ในการเปรียบเทียบลักษณะความสัมพันธ์ โครงสร้าง และความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรที่พบแพร่กระจาย ค่าความหลากหลายของแฮพโพลไทป์มีค่าค่อนข้างสูง (Hd=0.197-0.782) และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์มีค่าต่ำมาก (Pi=0.00045-0.05720) อาจเป็นผลมาจากประชากรที่นำเข้ามีขนาดเล็ก และมีการเพิ่มปริมาณอย่างมากในแต่ละรุ่น โดยเฉพาะในบางประชากรพบความหลากหลายต่ำมากๆ (Hd<0.5, Pi<0.005) เช่น ประจวบคีรีขันธ์ และระยอง ระยะห่างทางพันธุศาสตร์ของประชากรทั้งหมดมีค่าต่ำระหว่าง 0.00085-0.00358 แสดงให้เห็นว่าแต่ละประชากรย่อยไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากนัก ผลการศึกษาช่วยยืนยันที่มาของการแพร่ระบาด โดยข้อมูลระยะห่างทางพันธุศาสตร์และการจัดลำดับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ชี้ให้เห็นว่าประชากรปลาหมอสีคางดำที่แพร่ระบาดในประเทศไทยมีแหล่งที่มาร่วมกัน

คำสำคัญ: หมอสีคางดำ, เครื่องหมายพันธุกรรม, ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

***ผู้รับผิดชอบ:** 50 ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900 โทร 0 2562 0494 E-mail: kunpagne@gmail.com

Origin and Distribution of Invasive Blackchin Tilapia (*Sarotherodon melanotheron* Rüppell, 1852), on Coastal Area of Thailand

Apiradee Hanpongkittikul[1*], Wongpathom Kamonrat[2], Tiwarat Thalearngkietleela[1] and Supaporn Chaosuan[1]

[1]Inland Fisheries Research and Devlopment Division, Department of Fisheries, Thailand

[2]Pensioner

Abstract

In this study Mitochondrial DNA D-loop sequences were used to evaluate the genetic structure and genetic diversity and investigate the origin of invasive Blackchin Tilapia that are widely spread in the coastal provinces of Thailand including Samut Songkhram, Phetchaburi, Rayong, Prachuap Khiri Khan, Chumphon and Surat Thani. Relatively high haplotype gene diversity (Hd=0.197-0.782) but very low nucleotide diversity (Pi=0.00045-0.05720) may be due to the small population size introduce as well as mass breeding over generation, especially Prachuap Khiri Khan and Rayong population showed extremely low diversity (Hd<0.5, Pi<0.005). Low genetic distance (0.00085-0.00358) indicated genetic relationship between all populations. The phylogenetic relationship clustering of D-loop sequences provided genetic evidence that all populations share the same maternal ancestry.

Keywords: Blackchin Tilapia, Mitochondrial DNA, D-loop

***Corresponding author:** 50 Phaholyothin Road Lardyao Chatuchak Bangkok 10900

Tel. 0 2562 0494 E-mail: kunpagne@gmail.com

คำนำ

สืบเนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของปลาหมอสีคางดำ หรือ Blackchin Tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) ที่พบในพื้นที่ 7 จังหวัด ประกอบด้วย 1) พื้นที่ตำบลแพรกหนามแดงและตำบลยี่สาร อำเภออัมพวา และตำบลคลองโคน อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม 2) พื้นที่ตำบลบางตะบูน อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี 3) พื้นที่ศูนย์การศึกษาธรรมชาติบึงบัว อุทยานแห่งชาติเขาสามร้อยยอด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 4) พื้นที่อำเภอสวี อำเภอละแม และอำเภอเมืองจังหวัดชุมพร และ 5) พื้นที่อำเภอแกลง จังหวัดระยอง 6) พื้นที่อำเภอท่าชนะ จังหวัดสุราษฎร์ธานี และ 7) เขตอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งส่งผลกระทบต่อการอยู่อาศัยของสัตว์น้ำพื้นเมืองและระบบนิเวศแหล่งน้ำรวมทั้งกิจกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของเกษตรกรที่เลี้ยงแบบกึ่งพัฒนาจากรูปแบบการนำน้ำเข้าสู่บ่อโดยไม่มีการกรองน้ำทั้งนี้สืบเนื่องจากปลาหมอสีคางดำสามารถแพร่พันธุ์และขยายประชากรได้อย่างรวดเร็วในพื้นที่ดังกล่าว จากการติดตามสำรวจการรุกรานของปลาหมอสีคางดำในพื้นที่ฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำของเกษตรกรที่ได้รับผลกระทบในช่วงปี 2560 พบเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในเขตจังหวัดสมุทรสงครามได้รับผลกระทบจำนวน 501 ฟาร์ม คิดเป็นเนื้อที่เลี้ยงรวม 48,543 ไร่ มีปริมาณปลาหมอสีคางดำที่ประเมินได้ประมาณ 1,417,000 กิโลกรัม พื้นที่จังหวัดเพชรบุรีได้รับผลกระทบจำนวน 74 ฟาร์ม คิดเป็นเนื้อที่เลี้ยงรวม 4,000 ไร่ มีปริมาณปลาหมอสีคางดำที่ประเมินได้ประมาณ 156,000 กิโลกรัม เมื่อประเมินภาพรวมในพื้นที่ 2 จังหวัด พบมีเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์น้ำได้รับผลกระทบจำนวน 575 ฟาร์ม คิดเป็นเนื้อที่เลี้ยงรวม 56,857 ไร่ ผลผลิตกุ้งทะเลลดลงร้อยละ 30-50 ส่งผลให้เกษตรกรมีรายได้ลดลงเหลือเพียง 4,500-6,300 บาท/ไร่ จากเดิมที่เคยมีรายได้เฉลี่ย 9,000 บาท/ไร่ คิดเป็นมูลค่าความเสียหายทั้งสิ้นไม่ต่ำกว่า 150-350 ล้านบาท/ปี นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนประชากรปลาหมอสีคางดำที่แพร่ระบาดในพื้นที่เลี้ยงกุ้งทะเลของทั้งสองจังหวัดมีไม่ต่ำกว่า 1,573 ตัน หรือประมาณไม่ต่ำกว่า 30 ล้านตัว (คิดโดยเฉลี่ย 20 ตัว/กิโลกรัม) (กองวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, 2561)

ผลการศึกษาเบื้องต้นความหลากหลายและพันธุปฏิทรรศน์การระบาดของปลาหมอสีคางดำในประเทศไทย โดยอภิรดี และคณะ (2563) พบว่าปลาหมอสีคางดำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ขนาดประชากรสืบพันธุ์มีขนาดเล็ก และมีแนวโน้มมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรที่ระบาดในพื้นที่ต่างๆ อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษายังพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรและไม่อาจระบุชัดถึงแหล่งกำเนิดของประชากรปลาหมอสีคางดำในประเทศไทย ซึ่งเป็นข้อจำกัดหนึ่งของการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมบนนิวเคลียสชนิดไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ เนื่องจากมีความผันแปรสูงและเกิดปรากฏการณ์ recombination ระหว่างพันธุกรรมของพ่อและแม่ (Guo *et al.,* 2011)

ในรายงานนี้เป็นการศึกษาความผันแปรและคุณสมบัติเชิงวิวัฒนาการของกลุ่มตัวอย่างปลาหมอสีคางดำที่การแพร่ระบาดในแหล่งน้ำธรรมชาติอื่นๆ ที่อยู่ระหว่างจุดที่พบรายงานการแพร่กระจายซึ่งห่างออกไป เช่น แม่น้ำประแสร์ และแม่น้ำสวี โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม Mitochondrial DNA ที่ตำแหน่ง D-loop มาช่วยในการทดสอบประวัติการนำเข้า และแหล่งกำเนิดของประชากรปลาหมอสีคางดำในประเทศไทย ซึ่ง Mitochondrial DNA เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดทางแม่สู่ลูกทำให้มีความคล้ายคลึงกันของสมาชิกภายในประชากร รวมถึงไม่มีการเกิด recombination ทำให้โครงสร้างดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียไม่สลับซับซ้อน เป็นเหตุผลที่ทำให้นักพันธุศาสตร์ประชากรนำเอาเครื่องหมายพันธุกรรมบนไมโตคอนเดรียมาใช้ในการศึกษาเพื่อตรวจสอบสายสัมพันธ์

ภายในประชากรได้ และมีอัตราการกลายพันธุ์สูง ซึ่งเหมาะแก่การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม โครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากร และประวัติของประชากร (Guo *et al.,* 2011) เครื่องหมายพันธุกรรม Mitochondrial DNA ที่ใช้ศึกษาทางพันธุศาสตร์มีหลายชนิด ตำแหน่ง D-loop เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีลำดับดีเอ็นเอที่อยู่ในกลุ่มที่ไม่ได้เป็นรหัสสร้างโปรตีนแต่เป็นส่วนที่ควบคุมการสร้างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของไมโตคอนเดรีย (control region) ซึ่งดีเอ็นเอส่วนนี้ จะมีอัตราการกลายพันธุ์ (mutation) ที่สูงมากกว่าบริเวณอื่นใน Mitochondrial DNA ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิด replication และ expression (Boor, 1999) อัตราการเกิด nucleotide substitution ของบริเวณที่เป็น control region จะสูงกว่าบริเวณอื่น 5-10 เท่า และสูงกว่าใน nuclear genes 25-100 เท่า (Guo *et al.,* 2011)

ผลจากการวิเคราะห์โครงสร้างพันธุกรรมของประชากรปลาหมอสีคางดำที่แพร่กระจายในเขตพื้นที่ชายฝั่งของประเทศไทย จะช่วยตอบโจทย์เส้นทางการระบาด กลไกและปัจจัยสนับสนุนการแพร่ระบาดของปลาหมอสีคางดำ รวมถึงบ่งชี้แนวโน้มแหล่งที่มาที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดในแต่ละพื้นที่ และสามารถนำข้อมูลที่เกี่ยวข้องมาใช้ในการกำหนดมาตรการควบคุม ป้องกัน และกำจัดปลาหมอสีคางดำ ออกจากแหล่งน้ำธรรมชาติและบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำของเกษตรกรให้มีประสิทธิภาพสูงสุด รวมถึงเป็นแนวทางในการควบคุม และป้องกันการแพร่กระจายสำหรับพืชน้ำหรือสัตว์น้ำต่างถิ่นชนิดอื่นๆ ต่อไป ตลอดจนสามารถพัฒนาเทคนิคที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เพื่อปรับใช้ในการสืบสวนสอบสวน เพื่อประโยชน์ในการบังคับใช้กฎหมาย การสืบหาแหล่งที่มาของสัตว์น้ำที่รุกรานในแหล่งน้ำธรรมชาติ กรณีที่ต้องมีการชดใช้ค่าเสียหายจากผู้ปล่อยสัตว์น้ำ เมื่อเกิดการระบาดของสัตว์น้ำต่างถิ่น หรือสัตว์ที่มีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมต่อไป

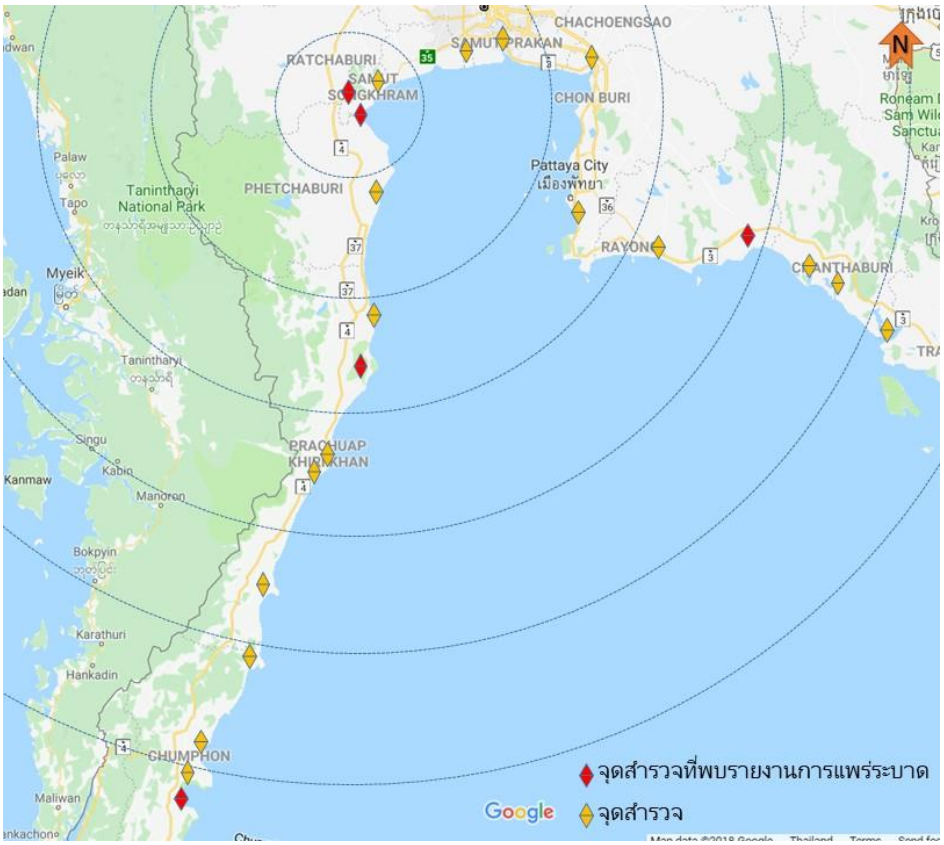
วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินเส้นทางการแพร่ระบาดของปลาหมอสีคางดำในเขตพื้นที่ชายฝั่ง โดยเปรียบเทียบจากลักษณะโครงสร้างพันธุกรรมของกลุ่มประชากรที่พบแพร่กระจายในเขตพื้นที่ชายฝั่ง 7 จังหวัดของไทยด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Mitochondrial DNA ที่ตำแหน่ง D-loop

วิธีการศึกษา

1. การรวบรวมตัวอย่าง

ดำเนินการสำรวจการแพร่กระจายของปลาหมอสีคางดำจากพื้นที่แพร่ระบาดรวม 7 จังหวัด ได้แก่ สมุทรปราการ สมุทรสงคราม เพชรบุรี ระยอง ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี สุ่มตัวอย่างโดยวิธีสำรวจจากผลจับและสอบถามจากชาวประมงตามท่าขึ้นปลาต่างๆ ควบคู่กับการสุ่มตัวอย่างโดยใช้เครื่องมือแห ข่าย ลอบ โดยกำหนดพื้นที่สำรวจ 2 จุดสำรวจในทุกๆ รัศมีระยะ 100 กม. จากจุดแรกที่พบรายงานการแพร่กระจาย คือ คลองยี่สาร อ.อัมพวา จ.สมุทรสงคราม ไปจนถึงปากน้ำประแสร์ อ.แกลง จ.ระยอง และจากคลองยี่สารไปยังพื้นที่ จ.สุราษฎร์ธานี ดังภาพที่ 1 และเก็บรักษาตัวอย่างสารพันธุกรรม โดยรวบรวมตัวอย่างครีบ เก็บรักษาไว้ในเอทานอล 99.99% (absolute ethanol) แบ่งแยกออกตามแหล่งตัวอย่าง และระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 1 จุดสำรวจปลาหมอสีคางดำที่แพร่กระจายในเขตพื้นที่ชายฝั่งของไทย

2. การวิเคราะห์ Mitochondrial DNA

2.1 ดำเนินการสกัดดีเอ็นเอปลาหมอสีคางดำทั้งหมด ด้วยวิธีการ Phenol chloroform extraction ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Taggard *et al.* (1992) โดยทำการตัดแบ่งส่วนของเนื้อเยื่อปลาตามปริมาณที่ต้องการ (ประมาณ 50 mg) บดเนื้อเยื่อให้ละเอียด นำไปใส่ใน 10 ml extraction buffer (100 mM Tris-Cl, pH 8; 250 mM NaCl; 1 % SDS และ 100 ug/ml Proteinase K บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติม buffered phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1) 10 ml แล้วค่อยๆเขย่าให้เข้ากันเบาๆเป็นเวลาประมาณ 10

นาที หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม chloroform/ isoamyl alcohol (24:1) 10 ml เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันประมาณ 20 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000x g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นก็ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่แล้วทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้ง เติม 95 % ethanol ที่แช่เย็น 20 ml ลงไปผสมกับส่วนใสที่ได้ ตะแคงหลอดไปมา หลังจากนั้นก็ทิ้งส่วนใสไป เหลือแต่ก้อนดีเอ็นเอ (ถ้าไม่เห็นก้อนดีเอ็นเอ ให้นำหลอดดังกล่าวนี้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ -40°C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000x g เป็นเวลา 20 นาที) ต่อมาเติม 70 % ethanol 500 ml ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000x g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งและปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งเอง จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8) 500 ul และนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 50-60 °C จนดีเอ็นเอละลายหมด

2.2 เพิ่มปริมาณ Mitochondrial DNA ที่ตำแหน่ง D-loop ซึ่งพัฒนาจาก Mitochondrial DNA ของปลานิล (Genbank accession no. NC_014060) โดยใช้ไพร์เมอร์ Or1-D (F: CTACTTCTTCCTCTTCCTTGT และ R: TCCGTCTTAACATCTTCAGT) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบโพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ตาม Jiang *et al*. (2019) โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (50 µl) ประกอบด้วย 10× PCR Buffer, MgCl2(0.25 mM), dNTPs (2.5 mM), Taq polymerase (2.5 U/µL), of each primer (10 µM), genomic DNA (20 ng/µL), และ DNase/RNase-free deionized water หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่องพีซีอาร์โดยกำหนดโปรแกรมดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที แล้วตามด้วยขั้นตอนที่ 2 denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 40 วินาที, อุณหภูมิในการ annealing 55 °C เป็นเวลา 55 วินาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ และขั้นตอนที่ 3 final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาเติมเมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาเติม loading dye (99% formamide, 10mM NaOH, 0.1% bormophenol blue, 0.1% Xylene cyanol FF) ในอัตราส่วน 1:1 ลงในผลผลิตพีซีอาร์

2.3 นำไปตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟรเรซีสบน 1% agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (90 mM Tris, pH 8.3, 90 mM boric acid, 0.1 mM EDTA) ซึ่งผสมเจลด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (SERVA DNA Strain G) ในอัตราส่วนสีย้อม 4 µL ต่อเจล 100 ml โดยใช้ Kodak Biomax MP1015 ที่ระดับกระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 15 นาที และอ่านขนาดผ่านเครื่องอ่านเจล (Argus®X1 Version 5, Biostep) โดยเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder; Invitrogen)

2.4 ทำตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ด้วย Purelink ® PCR Purification Kit, Invitrogen และส่งตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยใช้ Thermo Sequence Fluorescent Labeled Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA)

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 เตรียม Sequences ทั้งหมด เพื่อวิเคราะห์ข้อมูล รวม 128 ตัวอย่างจาก 11 ประชากร โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.0 software (Hall, 2004)

3.2 ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic variation) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ number of haplotypes (h) หรือจำนวนรูปแบบดีเอ็นเอ หรือ haplotype ที่พบทั้งหมด, haplotype diversity (Hd) หรือค่าของตัวอย่างใดๆ ที่มีความแตกต่างกันในกลุ่มประชากร, nucleotide diversity (pi) ค่าเฉลี่ยของจำนวนความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละคู่ตัวอย่าง, average number of nucleotide differences (k) และ Tajima's D , Fu and Li's D* และ F* ซึ่งเป็นค่าทางสถิติที่ใช้ในการทดสอบสมดุลทางวิวัฒนาการของประชากร ด้วยโปรแกรม DnaSP 6 software (Rozas *et al*., 2017)

3.3 วิเคราะห์ phylogenetic analysis และคำนวน Kimura 2-parameter (K2P) distance among population และ F-statistic (Fst) ด้วยโปรแกรม MEGA -X software (Kumar *et al*., 2018; Stecher *et al*., 2020)

3.4 วิเคราะห์องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ nucleotide composition และวิเคราะห์โครงสร้างของประชากรด้วย Analysis of molecular variance (AMOVA) ด้วยโปรแกรม Arlerquin 3.0 software (Excoffier et al., 2005)

3.5 สร้างโครงสร้าง haplotype D-loop sequences แบบ Median Joining Network ด้วยโปรแกรม PopArt (Leigh and Bryant, 2015) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ haplotype ที่พบ โดยมีตัวอย่าง outgroup ได้แก่ ข้อมูล Mitochondrial DNA ที่ตำแหน่ง d-loop ของปลาหมอสีคางดำจาก the Great Lakes of East Africa ของ Nagl *et al.* (2001) จากระบบฐานข้อมูล Genbank ที่ accession number AF 296493 ซึ่งสืบค้นจาก https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore.

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

1. ความหลากหลายของการกระจายแฮพโพลไทป์ (Haplotype) ของประชากรปลาหมอสีคางดำที่แพร่กระจายในประเทศไทย

จากการรวบรวมตัวอย่างปลาหมอสีคางดำที่แพร่กระจายในประเทศไทย สามารถรวบรวมตัวอย่างจาก 6 จังหวัดได้แก่ สมุทรสงคราม (SMSK) เพชรบุรี (Petch) ระยอง (Rayong) ประจวบคีรีขันธ์ (PraJ) ชุมพร (ChumP) และสุราษฎร์ธานี (Surat) รวม 125 ตัวอย่าง ส่วนจังหวัดสมุทรปราการ ถึงแม้มีรายงานการแพร่ระบาดแต่ยังไม่สามารถรวบรวมตัวอย่างได้ จึงไม่ได้นำมาวิเคราะห์ในครั้งนี้

ผลการวิเคราะห์ D-loop sequences ขนาด 1,124 เบส พบจำนวนรูปแบบดีเอ็นเอหรือแฮพโพลไทป์ (Haplotype) ทั้งหมด 15 haplotypes โดย Haplotype หลักที่พบมากที่สุดคือ Haplotype 4 ซึ่งพบในทุกประชากร รวมทั้งหมด 67 ตัวอย่างคิดเป็น 53.6 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด รองลงมาคือ Haplotype 1 พบในประชากร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ชุมพร สุราษฎร์ธานี รวม 25 ตัวอย่าง คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด Haplotype ที่พบเฉพาะประชากรได้แก่ Haplotype 6, 7, และ 8 พบเฉพาะในประชากรชุมพร ในขณะที่ Haplotype 3 และ 9 พบเฉพาะในประชากรประจวบคีรีขันธ์ Haplotype 11 พบเฉพาะในประชากรเพชรบุรี Haplotype 12 และ 13 พบเฉพาะในประชากรระยองและ Haplotype 14 และ 15 พบในประชากรสมุทรสงครามเท่านั้น (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การกระจายของ D-loop Haplotypes ของประชากรปลาหมอสีคางดำที่แพร่กระจายในประเทศไทย

	SMSK	Petch	PraJ	Chump	Surat	Rayong	Total
Hap_1	10	7		7	1		25
Hap_2		1	3				4
Hap_3			1				1
Hap_4	5	8	13	11	4	26	67
Hap_5				1	3		4
Hap_6				3			3
Hap_7				1			1
Hap_8				1			1
Hap_9			1				1
Hap_10	2	8					10
Hap_11		2					2
Hap_12						1	1
Hap_13						2	2
Hap_14	1						1
Hap_15	2						2
N=Total	20	26	18	24	8	29	125
No of Hap	5	5	4	6	3	3	15

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและระยะห่างทางพันธุศาสตร์ของประชากรปลาหมอสีคางดำที่แพร่กระจายในประเทศไทย

2.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ประชากรปลาหมอสีคางดำที่พบแพร่กระจายทางฝั่งตะวันตกพบความหลากหลายของแฮพโพลไทป์ (Haplotype diversity: Hd) มีค่าสูง ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี ชุมพร สมุทรสงคราม สุราษฎร์ธานี และประจวบคีรีขันธ์ ตามลำดับ โดยแต่ละประชากรมีค่าตั้งแต่ 0.197-0.760 ในขณะที่ประชากรฝั่งตะวันออก จังหวัดระยอง พบความหลากหลายของแฮพโพลไทป์ค่อนข้างต่ำ (Hd=0.197) ดังตารางที่ 2

ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide diversity: Pi) เป็นค่าความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ที่ขึ้นกับจำนวนตำแหน่งที่มี polymorphic ในตัวอย่างทั้งหมด มีค่าระหว่าง 0.00045-0.00341 ประชากรจากเพชรบุรีมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด (Hd=0.760, Pi=0.00341) ในขณะที่ประชากรระยองมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำสุด (Hd=0.471, Pi=0.00045) (ตารางที่ 2)

ผลการทดสอบ Tajima test ค่า Tajima's D มีเป็นลบในประชากรส่วนใหญ่ยกเว้น ประชากรจากสุราษฎร์ธานี และเพชรบุรี ค่า Fu's Fs เป็นลบในประชากรส่วนใหญ่ ยกเว้นประชากรจากเพชรบุรี ประชากรทั้งหมดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.10) ยกเว้นประชากรจากเพชรบุรีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01) จากประชากรอื่นๆ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาหมอสีคางดำที่แพร่กระจายในประเทศไทย

pop	Location	N	Haplotype (gene) diversity, Hd:	Nucleotide diversity, Pi:	Tajima's D	Fu's Fs statistic:	Average Number of Nucleotide difference, k:
SMSK	สมุทรสงคราม	20	0.690	0.00341	-0.78441	-0.098	1.532
Petch	เพชรบุรี	26	0.760	0.00339	0.45356	0.315	1.520
PraJ	ประจวบคีรีขันธ์	18	0.471	0.00115	-1.13127	-1.596	0.516
ChumP	ชุมพร	24	0.714	0.00203	-0.92963	-2.259	0.909
Surat	สุราษฎร์ธานี	8	0.679	0.00175	0.06935	-0.224	0.786
Rayong	ระยอง	29	0.197	0.00045	-1.24882	-1.628	0.202

โดยทั่วไปค่าความหลากหลายของประชากรสัตว์น้ำต่างถิ่นจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับ 2 ปัจจัย คือ ปริมาณสัตว์น้ำต่างถิ่นที่นำเข้า และจำนวนครั้งของสัตว์น้ำต่างถิ่นที่นำเข้ามาในประเทศ (Drake *et al*., 2005) ซึ่งผลการศึกษาโดยเครื่องหมายพันธุกรรม Microsatellite DNA ของอภิรดี และคณะ (2563) พบว่าค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาหมอสีคางดำในประเทศไทย (metapopulation) ไม่แตกต่างจากประชากรธรรมชาติในแอฟริกาตะวันตก (Yoboue *et al*., 2014) จึงเป็นไปได้ทั้งสองปัจจัย อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาใน

ระดับประชากรย่อยในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าค่าความหลากหลายของแฮพโพลไทป์ (Hd) มีค่าค่อนข้างสูง และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (Pi) มีค่าต่ำมาก อาจเป็นผลมาจากจำนวนประชากรต้นกำเนิด (founder population) ของแต่ละแหล่งตัวอย่างมีขนาดเล็ก โดยเฉพาะในบางประชากรพบความหลากหลายต่ำมากๆ (Hd<0.5, Pi<0.005) เช่น ประจวบคีรีขันธ์ และระยอง (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับผลการศึกษาด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Microsatellite DNA ของอภิรดี และคณะ (2563) ที่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาหมอสีคางดำในประเทศไทยมีค่าค่อนข้างต่ำ การที่ประชากรมีความหลากหลายของแฮพโพลไทป์สูง แต่มีความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ต่ำ อาจเกิดจากปรากฏการณ์คอขวด หรือ Bottleneck effect (Frankham *et al.,* 2004 และ Hamilton, 2009) หรือ อาจเกิดจากสาเหตุการเพิ่มประชากรอย่างรวดเร็วของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะจากประชากรที่มีขนาดประชากรสืบพันธุ์ขนาดเล็ก (Grant and Bowen, 1998) และ Lowe *et al.,* 2004) กลไกดังกล่าวให้ผลคล้ายคลึงกับปรากฏการณ์คอขวด (Bottleneck effect) เพียงแต่การขั้นตอนการลดลงของขนาดประชากรถูกแทนที่ด้วยการนำเข้าประชากรที่มีจำนวนน้อย และเนื่องจากปลาหมอสีคางดำที่นำเข้าไปแหล่งอื่นๆ ได้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยแล้ว และด้วยสภาพภูมิอากาศที่ไม่แตกต่างกันมากนักของประเทศปลาหมอสีคางดำจึงพร้อมที่จะขยายประชากรได้ทันทีที่ถูกนำเข้าไปท้องถิ่นใหม่ จากผลการศึกษาของอภิรดี และคณะ (2563) ได้มีการทดสอบแล้วพบว่าประชากรปลาหมอสีคางดำที่ระบาดในประเทศไทยไม่ผ่านปรากฏการณ์คอขวด และพบว่าขนาดประชากรสืบพันธุ์ของปลาหมอสีคางดำที่แพร่ระบาดในประเทศไทยจากการวิเคราะห์โดยเครื่องหมายพันธุกรรม Microsatellite DNA พบว่ามีขนาดเล็กคือ Ne=1.3-34.2 ซึ่งปรากฏการณ์แบบเดียวกันนี้มีรายงานการพบในสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น Acoupa weakfish *Cynoscion acoupa* (Rodrigues *et al*., 2008) Giant squid *Architecuthis dux* (Winkelmann *et al*., 2013) และ Largescale blackfish *Girella punctata (*Saito *et al*., 2008) เป็นต้น

2.2 ระยะห่างทางพันธุศาสตร์

Genetic distance หรือระยะห่างทางพันธุศาสตร์ระหว่างกลุ่มประชากร ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากร หากมีค่าต่ำหมายถึงประชากรทั้งสองมีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรม ในขณะที่ค่าสูงแสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร เป็นค่าที่มีประโยชน์ในการจัดกลุ่มประชากร ในการศึกษาครั้งนี้ พบค่าระยะห่างทางพันธุศาสตร์ของประชากรปลาหมอสีคางดำที่พบแพร่กระจายในพื้นที่ 6 จังหวัดของประเทศไทยมีต่ำระหว่าง 0.00085-0.00358 แสดงให้เห็นว่าประชากรไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากนัก (ตารางที่ 3) ในขณะที่การทดสอบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนโมเลกุล (AMOVA) ในเครื่องหมายพันธุกรรม Mitochondrial DNA ที่ตำแหน่ง d-loop พบว่า ประชากรปลาหมอสีคางดำที่พบแพร่กระจายในพื้นที่ 6 จังหวัดของประเทศไทยมีโครงสร้างทางพันธุกรรมที่แบ่งเป็นประชากรย่อย (p-value <0.0001) และ มีค่าประมาณสัมประสิทธิ์ Fst หรือ theta (θ) มีเท่ากับ 0.15304 (ตารางที่ 4) ซึ่งระบุถึงการแบ่งเป็นประชากรย่อยหรือมีความแตกต่างระหว่างประชากรสูง ตามเกณฑ์ของ Wright (1978), Hartl and Clark (1997) และ Frankham *et al*. (2002) เปรียบเทียบกับผลการศึกษากลุ่มประชากรย่อยด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Microsatellite DNA ซึ่งมีค่า Fst หรือ θ สูงมากเท่ากับ 0.3437 (อภิรดี และคณะ, 2563) ซึ่งน่าจะเป็นผลของความผันแปรของเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ศึกษา

ตารางที่ 3 ค่าระยะห่างทางพันธุศาสตร์ (K2P Genetic distance) ของแต่ละคู่ประชากร

	SMSK	Petch	PraJ	ChumP	Surat	Rayong
SMSK						
Petch	0.00358					
PraJ	0.00285	0.00282				
ChumP	0.00278	0.00308	0.00183			
Surat	0.00306	0.00319	0.00173	0.00209		
Rayong	0.00246	0.00246	0.00085	0.00144	0.00134	

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปลาหมอสีคางดำที่แพร่กระจายในประเทศไทยด้วยวิธี Analysis of molecular variance (AMOVA) จำนวน 1,023 permutations

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Fixation Index Fst	P value
Among populations	5	10.363	0.7959 Va	15.03	0.15034	< 0.0001
Within populations	119	53.525	0.44979 Vb	84.97		
Total	124	63.888	0.52938			

Va and FST: P(rand. value > obs. value) = 0.00000

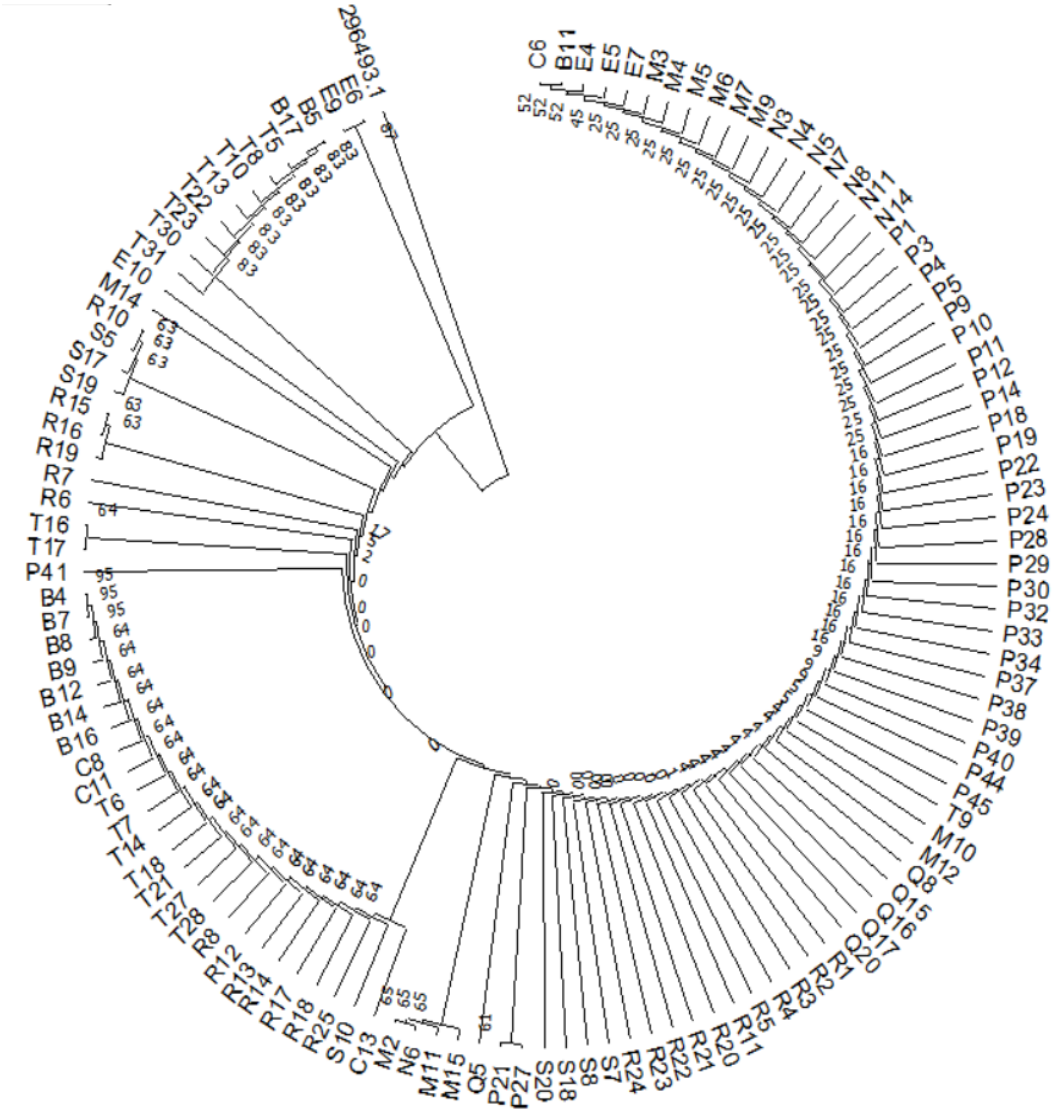
P(rand. value = obs. value) = 0.00000

P-value = 0.00000+-0.00000S

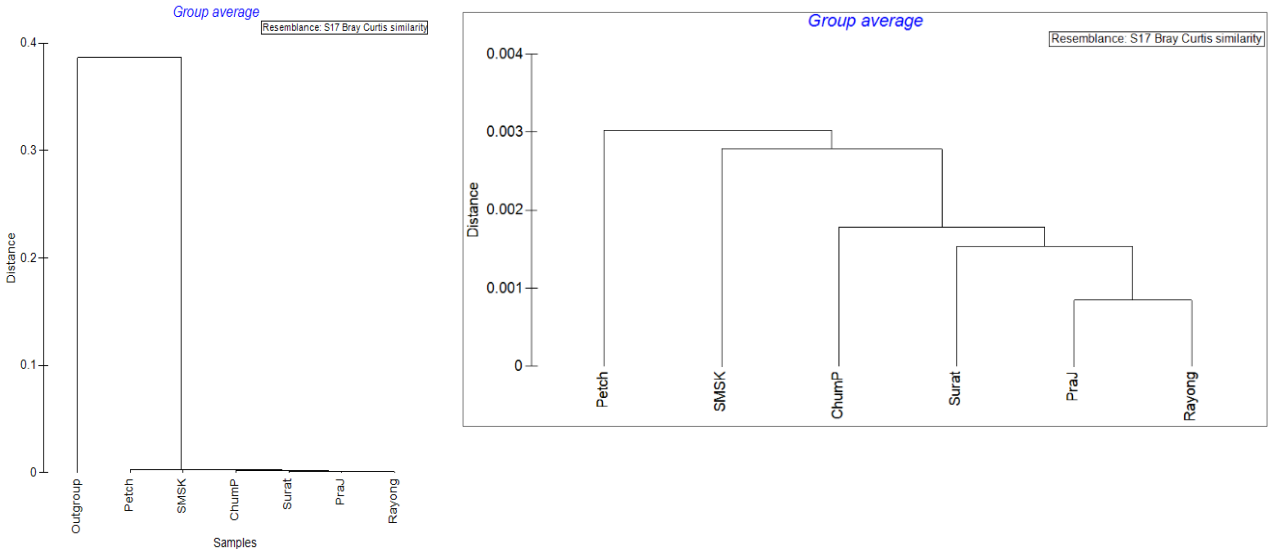
เมื่อพิจารณารูปแบบการกระจายของประชากร พบว่าคู่ประชากรเพชรบุรีและประชากรสมุทรสงครามซึ่งมีตำแหน่งที่ตั้งใกล้กันพบมีระยะห่างทางพันธุศาสตร์สูงสุด (Genetic distance = 0.00358) ในขณะที่ประชากรระยองและประจวบคีรีขันธ์ซึ่งมีระยะห่างกันมากทางภูมิศาสตร์กลับพบระยะห่างทางพันธุศาสตร์น้อยที่สุด (Genetic distance = 0.00085) หรือกล่าวได้ว่ามีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมากที่สุด อีกทั้งประชากรชุมพรซึ่งอยู่ไกลจากสมุทรสงครามมากกว่าเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์กลับมีระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยกว่าประชากรเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ (Genetic distance = 0.00278, 0.00358 และ 0.00285 ตามลำดับ) ดังตารางที่ 3 ผลจากการศึกษาด้วย Mitochondrial DNA ที่ตำแหน่ง D-loop ในครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของอภิรดี และคณะ (2563) ซึ่งไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางภูมิศาสตร์และระยะห่างทางพันธุกรรมของประชากรย่อยเมื่อศึกษาด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Microsatellite DNA เหตุการณ์ที่เกิดขึ้นเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่ากลไกการแพร่กระจายของปลาหมอสีคางดำที่แพร่ระบาดไปยังจังหวัดต่างๆ ซึ่งอยู่ห่างออกไป เช่น ระยอง ชุมพร และสุราษฎร์ธานี น่าจะเกิดจากการกระทำของมนุษย์ (anthropogenic process) มากกว่าการแพร่กระจายเองตามธรรมชาติ ซึ่งอาจจะโดยตั้งใจนำไปทดลองเพาะเลี้ยงแล้วหลุดรอดลงแหล่งน้ำธรรมชาติ หรือติดไปกับพันธุ์สัตว์น้ำอื่นโดยไม่ตั้งใจ เนื่องจากพื้นที่ที่พบการแพร่ระบาดของปลาหมอสีคางดำส่วนใหญ่เป็นพื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งอย่างหนาแน่น

3. การระบุแหล่งที่มาโดยการจัดลำดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการของประชากรปลาหมอสีคางดำที่แพร่กระจายในประเทศไทย

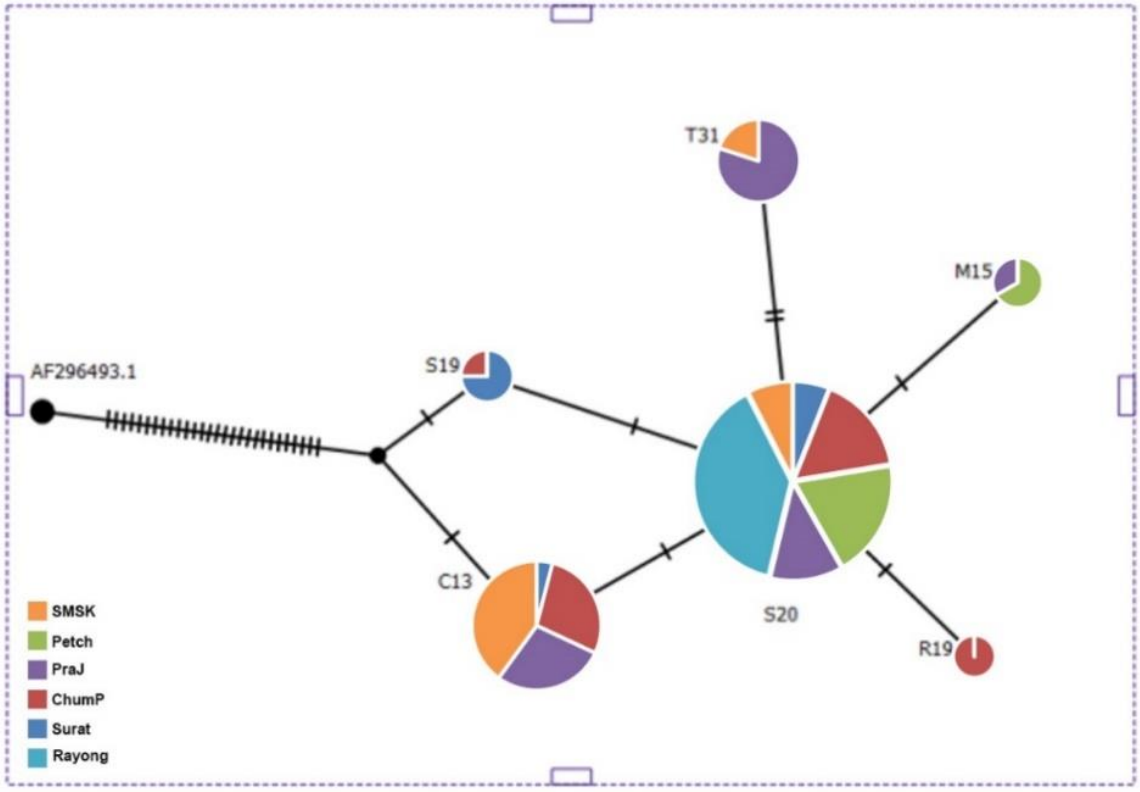
ผลการวิเคราะห์จากตัวอย่างปลาหมอสีคางดำทั้งหมดรวม 125 D-loop sequences และ 15 haplotypes จากตัวอย่างที่แพร่กระจายใน 6 จังหวัดด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ haplotype ที่พบด้วยวิธี Haplotype network และการจัดลำดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการ (hierarchical property of clusters) หรือการระบุแหล่งกำเนิดของประชากรด้วยวิธี UPGMA เมื่อวิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่าง Outgroup ปลาหมอสีคางดำของ Nagl *et al.* (2001) ที่ได้จากระบบฐานข้อมูล Genbank accession number AF 296493 พบว่าสามารถแบ่งออกตัวอย่างเป็น 2 กลุ่มคือ 1) ตัวอย่าง outgroup และ ตัวอย่างกลุ่มประชากรที่แพร่กระจายในประเทศไทยทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าประชากรในประเทศไทยทั้งหมดมีการจับกลุ่มกัน หรือมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมดังภาพที่ 2-3 นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยวิธี Median Joining Network ให้ผลเช่นเดียวกันดังภาพที่ 4 โดยกลุ่มประชากรปลาหมอสีคางดำอยู่ในกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบแพร่กระจายในประเทศไทย ประกอบด้วยตัวอย่างจากทุกจังหวัดที่พบการระบาด ชี้ให้เห็นการมีแหล่งที่มาร่วมกัน



ภาพที่ 2 Haplotype network ของตัวอย่าง D-loop sequences ของปลาหมอสีคางดำที่ระบาดในพื้นที่ 6 จังหวัดของประเทศไทย



ภาพที่ 3 การจัดลำดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการ (hierarchical property of clusters) หรือการระบุแหล่งกำเนิดของประชากรของปลาหมอสีคางดำที่ระบาดในพื้นที่ 6 จังหวัดของประเทศไทยด้วยวิธี UPGMA



ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์ Median Joining Network จากตัวอย่างทั้งหมดรวม 125 D-loop sequences 15 haplotypes ของปลาหมอสีคางดำที่ระบาดในพื้นที่ 6 จังหวัดของประเทศไทย วงกลมแสดงสัดส่วนของตัวอย่างจากแต่ละประชากรย่อยในกลุ่มนั้นๆ ตัวอักษร และตัวเลขแสดงชื่อกลุ่ม สัญลักษณ์ขีดแสดง mutation ณ แต่ละขั้นระหว่างกลุ่ม haplotype กลุ่ม S20 เป็นกลุ่มที่ประกอบด้วยตัวอย่างมากที่สุดจากทุกประชากรย่อย ในขณะที่กลุ่มอื่นๆ อีก 5 กลุ่มประกอบด้วยตัวอย่างจากบางประชากรย่อยตามสัดส่วน

การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าถึงแม้จะมีความชัดเจนในการแบ่งโครงสร้างออกเป็นประชากรย่อย (Fst= 0.15034) แต่กลุ่มประชากรโดยรวมที่พบระบาดในประเทศไทยที่นั้นมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมเนื่องจากมีระยะห่างทางพันธุศาสตร์ของแต่ละประชากรย่อยจากแต่ละจังหวัดมีค่าต่ำมาก (Genetic distance = 0.00085-0.00358) ประกอบกับผลการศึกษาเชิงวิวัฒนาการ ไม่ว่าจะเป็น 1) ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ haplotype ที่พบด้วยวิธี Haplotype network 2) การจัดลำดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการ (hierarchical property of clusters) หรือการระบุแหล่งกำเนิดของประชากรด้วยวิธี UPGMA และ 3) การจัดลำดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวัฒนาการ ด้วยวิธี Median joint network ชี้ให้เห็นถึงประชากรปลาหมอสีคางดำที่แพร่ระบาดในประเทศไทยมีแหล่งที่มาร่วมกัน และความแตกต่างระหว่างกลุ่ม haplotype อยู่ในระดับการเปลี่ยนแปลงเพียง 1-2 ลำดับเบสเท่านั้น (ภาพที่ 4) ซึ่งสามารถอธิบายความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรแต่ละจังหวัดไว้ว่าน่าจะเกิดจากกลไกของจีเนติกดริฟท์ หรือความคลาดเคลื่อนจากการสุ่มตัวอย่าง ซึ่งเกิดจากปลาที่นำไปปล่อยในพื้นที่ใหม่มีจำนวนน้อย และขาดการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างประชากร มากกว่าเกิดจากการนำเข้าหลายครั้ง (multiple introduction)

สรุปผลการศึกษา

การวิเคราะห์เส้นทางการแพร่ระบาดของปลาหมอสีคางดำในเขตพื้นที่ชายฝั่งของไทย โดยเปรียบเทียบจากลักษณะโครงสร้างพันธุกรรมของกลุ่มประชากรที่พบแพร่กระจายในเขตพื้นที่ชายฝั่ง 6 จังหวัดของไทยด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Mitochondrial DNA ที่ตำแหน่ง D-loop ผลการศึกษาพบว่าประชากรปลาหมอสีคางดำที่แพร่ระบาดในเขตพื้นที่ชายฝั่งของไทย มีค่าความหลากหลายของแฮพโพลไทป์ค่าค่อนข้างสูง (Hd=0.197-0.760) และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์มีค่าต่ำมาก (Pi=0.00045-0.00339) โดยเฉพาะในประชากรประจวบคีรีขันธ์ และระยอง พบความหลากหลายต่ำมากๆ (Hd<0.5, Pi<0.005) ระยะห่างทางพันธุศาสตร์ของประชากรทั้งหมดมีค่าต่ำระหว่าง 0.00085-0.00358 แสดงให้เห็นว่าแต่ละประชากรย่อยไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากนัก การศึกษาครั้งนี้ช่วยยืนยันที่มาของการแพร่ระบาด โดยข้อมูลระยะห่างทางพันธุศาสตร์ และการจัดลำดับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ชี้ให้เห็นว่าประชากรปลาหมอสีคางดำที่แพร่ระบาดในประเทศไทยมีแหล่งที่มาร่วมกัน

ข้อเสนอแนะ

การระบุแหล่งประชากรต้นกำเนิดของปลาหมอสีคางดำในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถชี้ชัดได้ว่ามาจากแหล่งใด เนื่องจากความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ประเมินโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม Mitochondrial DNA ที่ตำแหน่ง D-loop ไม่ได้แสดงถึงรูปแบบของประชากรที่ชัดเจน แต่เป็นความสัมพันธ์ที่เกิดจากกลไกของจีเนติกดริฟท์ หรือความคลาดเคลื่อนจากการสุ่มตัวอย่าง ดังนั้น การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์น้ำที่นำเข้าเพื่อเป็นตัวอย่างอ้างอิงในทุกครั้งสำหรับสัตว์น้ำที่มีความเสี่ยงการแพร่ระบาดจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์และพิสูจน์แหล่งประชากรต้นกำเนิดเป็นไปได้ง่ายและถูกต้องมากยิ่งขึ้น

การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมหลายๆ ตำแหน่ง ช่วยให้รายละเอียดและเพิ่มความสมบูรณ์ของผลการศึกษามากขึ้นกว่าการใช้เพียงเครื่องหมายพันธุกรรมตำแหน่งเดียว นอกจากจากชี้ให้เห็นโครงสร้างทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมแล้ว เครื่องหมายพันธุกรรม Microsatellite DNA ชี้ให้เห็นกลไกในการแพร่ระบาดและปัจจัยของการเกิดประชากรย่อย ในขณะที่เครื่องหมายพันธุกรรม Mitochondrial DNA ที่ตำแหน่ง D-loop สามารถช่วยเสริมในเรื่องการยืนยันแหล่งที่มาของตัวอย่างหรือประวัติของตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

กองวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. 2561. รายงานผลการดำเนินงานโครงการแก้ไขปัญหาการแพร่ระบาดของปลาหมอสีคางดำที่ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและระบบนิเวศในแหล่งน้ำธรรมชาติ ในระยะเร่งด่วน. กองวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 15 หน้า.

อภิรดี หันพงศ์กิตติกูล, วงศ์ปฐม กมลรัตน์, ทิวารัตน์ เถลิงเกียรติลีลา และ สุภาภรณ์ ชาวสวน. 2563. ความหลากหลายทางพันธุกรรมกับพันธุปฏิทรรศน์ของการระบาดปลาหมอสีคางดำในประเทศไทย. *วารสารการประมงอิเล็กทรอนิกส์* 3 (4): 11-31.

Boore, J. L. 1999. Survey and summary animal mitochondria genome. *Nucleic acids research* 27 (8): 1767-1780.

Drake, J. M., P. Baggenstos and D. M. Lodge. 2006. Propagule pressure and persistence in experimental populations. *Biology letters* 1: 480-483.

Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin (Version3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform Online* 1: 47-50.

Frankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 644 pp.

Frankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe. 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 220 pp.

Grant, W. S. and B. W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The American Genetic Association*. 89: 415-426. Available source: http://dx.doi.org/10.1093/jhered/89.5.415. July 14, 2022.

Guo, E., X. Li, Y. Liu, Y. Cheng and C. X. WU. 2011. Genetic variation and population structure of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) inferred from mitochondrial control region. *Mol. Biol. Rep*. 39: 1453–1463. Available source: https://doi.org/10.1007/s11033-011-0882-3. July 14, 2022.

Hall, T. 2004. Bioedit version 7.0.0. Available source: https://lochmidt.chemi.muni.cz/bioinf/files/BioEdit_help.pdf. June 30, 2018.

Hamilton, M. B. 2009. Population genetics. John Wiley & Sons, Ltd., Oxford, United Kingdom. 424 pp.

Hartl, D. L. and A. G. Clark (eds). 1997. Principles of Population Genetics. 3rd Edition. Sunderland: Sinauer Associates. 545 pp.

Jiang, B., J. Fu, Z. Dong, M. Fang, W. Zhu and L. Wang. 2019. Maternal ancestry analyses of red tilapia strains based on D-loop sequences of seven tilapia populations. *PeerJ*. 7: e7007 Available source: http://doi.org/10.7717/peerj.7007. July 14, 2022.

Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution.* 35: 1547-1549.

Leigh, J. W. and D. Bryant. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.* 6 (9): 1110–1116.

Lowe, A., S. Harris, and P. Ashton. 2004. Ecological genetics: design, analysis, and application. Blackwell Science Ltd., Oxford, United Kingdom. 432 pp.

Muchadeyi, F. C., H. Eding, H. Dimianer, C. B. A. Wollny, E. Groeneveld and S. Weigend. 2008. Mitochondrial DNA D-loop sequences suggest a Southeast Asian and Indian origin of Zimbabwean village chickens. *Animal Genetics* 39: 615-622.

Nagl, S., H. Tichy, W. E. Mayer, I. E. Samonte, B. J. McAndrew and J. Klein, 2001. Classification and phylogenetic relationships of African tilapiine. *Mol. Phylogenet. Evol.* 20 (3): 361-374.

National Library of Medicine. 2001. *Sarotherodon melanotheron* mitochondrial D-loop, partial sequence. Available source: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore. July 14, 2022.

Rodrigues, R., H. Schneider, S. Santos, M. Vallinoto, U. Sain-Paul and I. Sampaio. 2008. Low levels of genetic diversity depicted from mitochondrial DNA sequences in a heavily exploited marine fish (*Cynoscionacoupa,* Sciaenidae) from the northern coast of Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 31 (2): 487-492.

Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J. C. Sanchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S. E. Ramos-Onsins, and A. Sanchez-Gracia. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution* 34 (12): 3299-3302. Available source: https://doi.org/10. 1093/molbev/msx248. July 14, 2022.

Saito, T., S. Washio, K. Dairiki, S. Shimojo, S. Itoi and H. Sugita. 2008. High gene flow in *Girellapunctata* (Perciformes, Kyphosidae) among the Japanese Islands inferred from partial sequence of the control region in mitochondrial DNA. *Journal of Fish Biology* 73 (8): 1937-1945. Available source: https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01997.x. July 14, 2022.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Habor Laboratory Press, New York. 2,100pp.

Stecher, G., K. Tamura and S. Kumar. 2020. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution* 37, 1237-1239. Available source: https://doi.org/10.1093/molbev/msz312. July 14, 2022.

Taggart, J. B., R. Hynes, P. A. Prodohl and A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from Salmonid fishes. *J. Fish. Biol.* 40: 963-965.

Winkelmann, I., P. F. Campos, J. Strugnell, Y. Cherel, P. J. Smith, T. Kubodera and M.T.P. Gilbert 2013. Mitochondrial genome diversity and population structure of the giant squid Architeuthis: genetics sheds new light on one of the most enigmatic marine species. *Proceedings of the Royal Society B*. 280 (1759) : 203- 213. Available source: https://doi.org/10.1098/rspb.2013. 0273. July 14, 2022.

Wright, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations. Chicago: University of Chicago Press. 590 pp.

Yoboue, A. N., A. B. Adepo-Gourene, J.-F. Agnese and R. Laë. 2014. Diversite et structure genetique de *Sarotherodon melanotheron* (Pisces: Cichlidae) revelees par les microsatellites. *European Scientific Journal* 10 (33): 11-26. (in French, English abstract)