Genetic Diversity of *Lates calcarifer* Bloch populations in the Gulf of Thailand

Supaporn Sonkaew[1*], Wansuk Senanan[1] and Uthairat Na-Nakorn[2]

[1]Department of Aquatic Science, Faculty of science, Burapha University, Chon Buri, 20131
[2]Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, 10900
[*]Corresponding author, Email address: supaporn_g2364@yahoo.com

Abstract

For the past 30 years, the hatchery production of sea bass *(Lates calcarifer Bloch)* in Thailand has not used genetic data for broodstock management. Recently, hatcheries operators become concerned over the declining genetic variation of available broodstock. Using seven microsatellite DNA loci, we analyzed four hatchery samples, a stock from a private hatchery in Chonburi (TT-H), two stocks from a government hatchery at the Rayong Coastal Fisheries Research and Development Center (founding stock; RA-H and selected individuals from an F1 generation; RF-H) and a stock from a hatchery of the Nakhon Si Thammarat Coastal Fisheries Research and Development Center. (NK-H) and three wild samples, Chantaburi (CH-W), Trat (TR-W) and Nakhon Si Thammarat (PN-W). We detected 63 alleles in all samples. The genetic variation of hatchery samples (A = 5.86-7.43, A_r = 5.70-7.27, H_o = 0.68-0.78, H_e = 0.65-0.75) did not differ from that of the wild samples (A = 7.57-8.43, A_r = 6.97-7.64, H_o = 0.72-0.79, H_e = 0.71-0.75). However, RF-H tended to lose genetic variation faster than other samples.

Samples from different locations were genetically different (Global F_{st} = 0.025, $p < 0.001$). The two wild samples from the Upper Gulf of Thailand (TR-W and CH-W) were genetically different from one in the Lower Gulf of Thailand (PN-W). Hatchery samples were genetically distinct in most sample pairs. RF-H was most genetically distinct compared to other samples. Natural populations in the Gulf of Thailand might have been genetically separated by the long distance between the Upper and Lower Gulf of Thailand. Existing genetic differences among hatchery samples may be desirable as these stocks can be genetic resources for a development for a base population for a selective breeding program. Furthermore, genetic drift during hatchery production could play a major role in reducing genetic diversity and enhancing genetic divergence of a selectively bred population.

Keywords: Sea Bass, Genetic Diversity, Microsatellite

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลากะพงขาว *(Lates calcarifer Bloch)* ในบริเวณอ่าวไทย

สุภาพร สอนแก้ว[1*] วันศุกร์ เสนานาญ[1] และอุทัยรัตน์ ณ นคร[2]

[1]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131
[2]ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: supaporn_g2364@yahoo.com

บทคัดย่อ

ประเทศไทยมีการเพาะขยายพันธุ์ปลากะพงขาว *(Lates calcarifer Bloch)* ในโรงเพาะฟักมานานกว่า 30 ปี โดยไม่มีการนำข้อมูลทางพันธุศาสตร์ไปใช้ในการจัดการพ่อแม่พันธุ์ ทำให้ผู้เพาะพันธุ์ปลากะพงขาวเริ่มเป็นห่วงเกี่ยวกับระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของพ่อแม่พันธุ์เหล่านี้ การศึกษานี้จึงวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพ่อแม่พันธุ์กะพงขาวจากโรงเพาะฟัก 4 แหล่ง ได้แก่ โรงเพาะฟักเอกชน จ.ชลบุรี (TT-H), ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จ.ระยอง (ศพช. ระยอง) ซึ่งประกอบด้วย 2 รุ่น คือ รุ่นพ่อแม่ (RA-H) และปลาที่ผ่านการคัดพันธุ์ รุ่นลูก F1 (RF-H) และ ศพช. นครศรีธรรมราช (NK-H) และจากธรรมชาติ 3 แหล่ง ได้แก่ จันทบุรี (CH-W), ตราด (TR-W) และนครศรีธรรมราช (PN-W) ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ 7 ตำแหน่ง ผลการศึกษาพบว่ามีจำนวนอัลลิลทั้งหมด 63 อัลลิล ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มตัวอย่างโรงเพาะฟัก (A = 5.86-7.43, A_r = 5.70-7.27, H_o = 0.68-0.78, H_e = 0.65-0.75) มีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มธรรมชาติ (A = 7.57-8.43 A_r = 6.97-7.64, H_o = 0.72-0.79, H_e = 0.71-0.75) อย่างไรก็ตาม RF-H มีแนวโน้มสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าตัวอย่างอื่น ๆ

กลุ่มตัวอย่างปลากะพงขาวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (Global F_{st} = 0.025, p < 0.001) โดยกลุ่มตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนบน (TR-W กับ CH-W) แตกต่างทางพันธุกรรมกับตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนล่าง (PN-W) ส่วนกลุ่มตัวอย่างจากโรงเพาะฟักมีความแตกต่างกันเกือบทุกคู่ตัวอย่าง และ RF-H มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากตัวอย่างอื่นๆ มากที่สุด ความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนบนกับอ่าวไทยตอนล่างน่าจะสัมพันธ์กับระยะทางระหว่างประชากรทั้งสองกลุ่ม ส่วนความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างจากโรงเพาะฟักน่าจะเป็นสิ่งที่ดี โดยสามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมที่หลากหลายสำหรับการสร้างประชากรตั้งต้นในการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ การขาดหายทางพันธุกรรมระหว่างการเพาะพันธุ์ ยังมีบทบาทในการลดความหลากหลายภายในกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ และทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรที่ผ่านการคัดพันธุ์จากกลุ่มตัวอย่างอื่น

คำสำคัญ : ปลากะพงขาว, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ไมโครแซลเทลไลท์

บทนำ

ปลากะพงขาวเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยชนิดหนึ่งซึ่งเป็นที่รู้จักและนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากมีรสชาติที่ดีจึงเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ประเทศไทยประสบความสำเร็จการเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวโดยวิธีผสมเทียมมานานกว่า 30 ปี (สุจินต์และสวัสดิ์ 2517) จึงทำให้การเพาะพันธุ์และเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว และส่งผลให้เกษตรกรหันมาประกอบธุรกิจเลี้ยงปลากะพงขาวอย่างแพร่หลาย ซึ่งรวมถึงการทำธุรกิจโรงเพาะฟักและการเลี้ยงในบ่อ และกระชัง ปัจจุบันโรงเพาะพันธุ์ปลาเอกชนได้ผลิตลูกปลาจำหน่ายออกแก่ผู้เลี้ยงและบางส่วนก็ส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศได้แก่ มาเลเซีย สิงคโปร์ ฮ่องกง และไต้หวัน (สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งแห่งชาติ 2524)

ปัจจุบันนี้การผลิตปลากะพงขาวในกระชังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปีทั้งจำนวนฟาร์ม พื้นที่เลี้ยงและผลผลิต เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาในกระชังและบ่อเลี้ยงส่วนใหญ่ใช้ลูกพันธุ์ที่ผลิตได้จากโรงเพาะฟักของรัฐบาลและเอกชน โดยในการผลิตลูกปลาเพื่อการค้าในปัจจุบันส่วนมากแล้วนิยมใช้พ่อแม่พันธุ์ปลาจากการเลี้ยงในบ่อหรือกระชัง เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์ที่ได้จากธรรมชาติจะมีการบอบช้ำมาก จากการจับและไม่ชินกับการกักขัง ซึ่งการใช้พ่อแม่พันธุ์ลักษณะนี้อาจเสี่ยงต่อการใช้พ่อแม่พันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน

เนื่องจากประเทศไทยได้มีการเพาะเลี้ยง และใช้พ่อแม่พันธุ์จากแหล่งเลี้ยงมาเป็นเวลากว่า 30 ปี และยังขาดข้อมูลทางพันธุกรรมอยู่มาก เกษตรกรจึงเริ่มมีความกังวลว่าพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันอาจมีความใกล้ชิดทางเครือญาติประกอบกับที่ปลากะพงขาวในปัจจุบันมีปัญหาเรื่องโรค การเจริญเติบโต และการพัฒนาการของกระดูก ซึ่งการถดถอยของลักษณะดังกล่าวอาจเกี่ยวพันกับการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม (อุทัยรัตน์ 2543) นอกจากนี้การลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างรวดเร็วของพ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาวในโรงเพาะฟัก อาจเกิดจากการเลี้ยงสัตว์น้ำในโรงเพาะฟัก เป็นเวลาหลายชั่วอายุ (domestication) การใช้พ่อแม่พันธุ์จำนวนน้อย (Norris et al. 1999) การใช้พ่อแม่พันธุ์ที่ความใกล้ชิดทางเครือญาติโดยไม่ได้ตั้งใจ และการผสมพ่อแม่พันธุ์เป็นกลุ่ม (Frost et al. 2006)

การศึกษานี้จึงจะประเมินสถานภาพปัจจุบันของความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากะพงขาวในโรงเพาะฟักในแถบอ่าวไทยเมื่อเทียบกับแหล่งน้ำธรรมชาติโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีลักษณะซ้ำ ๆ เป็นช่วง ๆ และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Liu and Cordes 2004) นอกจากนี้เครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าวสามารถบ่งชี้ระดับของการมีเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟักที่มีอยู่ในปัจจุบันได้ ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจัดการพ่อแม่พันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ปลากะพงขาวในอนาคตต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

การรวบรวมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างครีบหางของปลากะพงขาวตัวเต็มวัยขนาด 0.5 เซนติเมตร จำนวน 346 ตัวอย่าง จากแหล่งเก็บตัวอย่าง 7 แหล่ง (ตารางที่1) ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% โดยระบุสถานที่ไว้ชัดเจน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ในขั้นต่อไป ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

ตัวอย่างจากโรงเพาะฟักที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นตัวแทนของโรงเพาะฟักจากบริเวณที่มีการผลิตลูกปลาอย่างแพร่หลาย ซึ่งได้แก่ภาคตะวันออก และภาคใต้ โดยเน้นประชากรพ่อแม่พันธุ์ในภาคตะวันออก นอกจากนี้ยังได้ประเมินการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของปลากะพงที่ผ่านการคัดพันธุ์ในรุ่นแรกของ ศพช. ระยอง โดยตัวอย่างจากแหล่งนี้ รวมถึงรุ่นพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้น ซึ่งเป็นกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่มาจากหลายแหล่ง (RA-H) และพ่อแม่พันธุ์รุ่นลูกที่ผ่านการคัดพันธุ์ 1 รุ่น (RF-H; F1)

ตารางที่ 1 จำนวนและแหล่งตัวอย่างของประชากรปลากะพงขาว ที่ใช้ในการศึกษานี้

ลำดับ	สถานที่เก็บตัวอย่าง	สัญลักษณ์	จำนวน
1	จังหวัดจันทบุรี	CH-W	65
2	จังหวัดนครศรีธรรมราช	PN-W	66
3	จังหวัดตราด	TR-W	53
4	ฟาร์มทะเลทอง อ.เมือง จังหวัดชลบุรี	TT-H	56
5	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง (ศพช.) จังหวัดนครศรีธรรมราช	NK-H	39
6	ศพช. จ.ระยอง (รุ่นพ่อแม่)	RA-H	31
7	ศพช. จ.ระยอง (รุ่นลูก)[1]	RF-H	36
	รวม		**346**

หมายเหตุ : W = ประชากรธรรมชาติ, H = ประชากรโรงเพาะฟัก

[1]เป็นปลารุ่นลูกของ RA-H ที่ผ่านการคัดเลือกปลาที่โตเร็วมาใช้เป็นประชากร RF-H

การสกัดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

สกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี Salt extraction โดยดัดแปลงจากวิธีของ Aljanabi and Martinez (1997) และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ใน TE เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์ จากนั้นวัดปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder M23; 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยดูความเข้มของสารเรืองแสงของดีเอ็นเอที่ย้อมติดด้วยเอธีเดียมโบรไมด์ ภายใต้แสง UV

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่บริเวณไมโครแซลเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง ซึ่งได้แก่ *LcaM08F*, *LcaM21F*, *LcaM32* (Yue et al. 2002) *Lca60*, *Lca64*, *Lca 74* (Zhu et al. 2006) และ *Lc-m05* (Sim and Othman 2005) โดยในสารละลายสำหรับพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1ไมโครลิตร (ความเข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร), 1X บัฟเฟอร์, นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 200 μM, แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 1.5 mM, ไพรเมอร์ Forward และ Reverse อย่างละ 0.2 μM และ *Taq* Polymerase 0.6 ยูนิต

วัฏจักรของการเพิ่มลดอุณหภูมิประกอบด้วย 3 วัฏจักร คือ 1) อุณหภูมิที่ทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน (Denaturing temperature) 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที 1 รอบ 2) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิที่ทำให้ไพรเมอร์มาเกาะกับสายดีเอ็นเอตั้งต้น (Annealing Temperature) 50-57 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับตำแหน่ง (สุภาพร 2553) นาน 30 วินาที และอุณหภูมิที่ *Taq* Polymerase สามารถซ่อมสายดีเอ็นเอให้สมบูรณ์เป็นดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension Temperature) 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 33 รอบ และ3) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ

แยกอัลลิลของไมโครแซลเทลไลท์ ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำผลผลิตจากกระบวนการพีซีอาร์มาเติม Loading Dye (97% Formamide, 0.4% NaOH, 0.1% Bromophenol Blue, 0.1% Xylene Cyano FF) แล้วนำมาแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซีสผ่านโพลีอะคริลาไมด์เจล 6% ผ่านกระแสไฟฟ้า 1200 โวลท์ เป็นเวลา 3.50 ชั่วโมง จากนั้นย้อมอัลลิลที่แยกด้วยเทคนิค Silver staining แล้วจึงบันทึกจีโนไทป์ที่ได้จากการย้อม โดยบันทึกขนาดของดีเอ็นเอ (base pair) บนแผ่นเจลของแต่ละตำแหน่ง โดยเทียบการเคลื่อนที่ของแต่ละอัลลิล (allele) กับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (pGEM-32f (+) sequencing marker)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรโดยคำนวณค่าจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง (*A*), Allelicrichness (A_r) ซึ่งเป็นค่าจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งที่คิดจากจำนวนตัวอย่างที่เท่ากันในทุกกลุ่มตัวอย่างและค่าเฮทเทอโรไซโกซิตีซึ่งประกอบด้วยค่าที่คำนวณได้จากข้อมูล (observed heterozygosity) และค่าที่คำนวณจาก

ความถี่อัลลิลซึ่งเป็นค่าที่คาดหวังหากตัวอย่างมีพฤติกรรมเหมือนกับประชากรทางทฤษฎี (expected heterozygosity) นอกจากนี้ยังทดสอบการเบี่ยงเบนความถี่ของจีโนไทป์จากสมดุลย์ฮาร์ดี-ไวน์เบริ์ก (Hardy-Weinberg equilibrium; HWE) คำนวณดัชนีเหล่านี้ด้วยโปรแกรม GenAlEx version 6.1 (Peakall and Smouse 2006), FSTAT version 2.9.3 (Goudet 2001) และ GENEPOP version 4 (Rousset 2008)

ประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ค่าความแตกต่างระหว่างความถี่อัลลิล (genic population differentiation) โดย Exact tests ด้วยโปรแกรม GENEPOP version 4 (Rousset 2008), การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Analysis of Molecular Variance; AMOVA) ด้วยโปรแกรม ARLEQUIN version 3.11 (Excoffier et al. 2006), ระยะห่างทางพันธุกรรมแบบ Cavalli-Sforza's genetic distance ด้วยโปรแกรม MSA version 4.05 (Dieringer and Schlotterer 2003) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ UPGMA ด้วยค่าระยะห่างพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม PHYLIP version 3.67 (Felsenstein 2007) ทั้งนี้สุ่มข้อมูล และสร้างแผนภูมิซ้ำ 1,000 ครั้ง (bootstrap) เพื่อทดสอบระดับความเสถียรของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่าง

ผลการทดลอง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มตัวอย่าง

ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างจากโรงเพาะฟักไม่แตกต่างจากประชากรธรรมชาติ (Mann-Whitney U rank test, $p > 0.05$) โดยกลุ่มตัวอย่างจากธรรมชาติมีค่าจำนวนอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่งอยู่ระหว่าง 7.57 (CH-W) ถึง 8.43 (PN-W) ค่าเฉลี่ย A_r อยู่ระหว่าง 6.97 (CH-W) ถึง 7.64 (PN-W) ค่าเฉลี่ย H_o อยู่ระหว่าง 0.72 (CH-W) ถึง 0.79 (TR-W) ในขณะที่ค่า H_e อยู่ระหว่าง 0.71 (TR-W, PN-W ถึง 0.75 (CH-W) (ตารางที่ 2) ส่วนในประชากรโรงเพาะฟักมีจำนวนอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่งอยู่ระหว่าง 5.86 (RF-H) ถึง 7.43 (TT-H) ค่าเฉลี่ย A_r อยู่ระหว่าง 5.70 (RF-H) ถึง 7.27 (RA-H) ค่าเฉลี่ย H_o อยู่ระหว่าง 0.68 (NK-H) ถึง 0.78 (RA-H) ในขณะที่ค่าเฉลี่ย H_e อยู่ระหว่าง 0.65 (RF-H) ถึง 0.75 (RA-H) แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ RF-H มีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง และค่าเฉลี่ย A_r น้อยกว่าตัวอย่างกลุ่มอื่น ๆ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างปลากะพงขาวที่ศึกษามีความแตกต่างทางพันธุกรรม (ค่า Global $F_{ST} = 0.024$; AMOVA, $p < 0.0001$) การทดสอบ AMOVA พบว่า 2.46% ของความแปรปรวนเกิดจากความแตกต่างระหว่างประชากร และ 97.54% ของความแปรปรวนที่เกิดจากความแตกต่างระหว่างสมาชิกในประชากร

เมื่อพิจารณาความต่างระหว่างคู่ตัวอย่างจากธรรมชาติ (3 แหล่ง) พบว่า กลุ่มตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนบน TR-W กับ CH-W ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (p สำหรับ exact tests = 0.007 และ FST ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง = 0.006, $p = 0.120$) ในขณะที่ PN-W ต่างกับทั้งสองกลุ่มตัวอย่าง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง ในกลุ่มตัวอย่างปลากะพงขาวจากโรงเพาะฟัก 4 แหล่ง และธรรมชาติ 3 แหล่ง ที่รวบรวมจากบริเวณอ่าวไทย

กลุ่มตัวอย่าง (จำนวนตัวอย่าง)	ค่าเฉลี่ย อัลลิลต่อตำแหน่ง *(A)*	Mean Heterozygosity		
		ค่าเฉลี่ย Allelic Richness *(A_r)*	ค่าเฉลี่ย Observed *(H_o)*	ค่าเฉลี่ย Expected *(H_e)*
TT-H (56)	7.43 ± 3.55	7.05 ± 3.22	0.75 ± 0.17	0.74 ± 0.14
RA-H (31)	7.29 ± 3.55	7.27 ± 3.52	0.78 ± 0.16	0.75 ± 0.13
RF-H (36)	5.86 ± 2.48	5.70 ± 2.31	0.71 ± 0.25	0.65 ± 0.19
NK-H (39)	7.29 ± 3.64	7.11 ± 3.51	0.68 ± 0.21	0.73 ± 0.17
CH-W (65)	7.57 ± 3.64	6.97 ± 3.31	0.72 ± 0.14	0.75 ± 0.13
TR-W (53)	7.71 ± 3.86	7.02 ± 3.52	0.79 ± 0.19	0.71 ± 0.17
PN-W (66)	8.43 ± 4.79	7.64 ± 4.27	0.74 ± 0.17	0.71 ± 0.15

ส่วนในกลุ่มตัวอย่างจากโรงเพาะฟัก (4 แหล่ง) พบว่าทุกแหล่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรม เมื่อทดสอบด้วย exact tests ($p < 0.002$) แต่มีบางแหล่งที่ไม่ต่างทางพันธุกรรมเมื่อพิจารณาจากค่า F_{ST} ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง (NK-H กับ TT-H, $F_{ST} = 0.006$, $p = 0.048$)

เมื่อพิจารณาตัวอย่างทั้งหมด (จากธรรมชาติและโรงเพาะฟัก) พบว่าตัวอย่างจากโรงเพาะฟักบางแหล่งไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากตัวอย่างจากธรรมชาติ ซึ่งได้แก่ NK-H ที่มีความคล้ายทางพันธุกรรมกับทั้ง TR-W และ CH-W ($F_{ST} = 0.002$, $p = 0.225$ และ $F_{ST} = 0.002$, $p = 0.210$) ค่า F_{ST} ยังแสดงความคล้ายทางพันธุกรรมระหว่างโรงเพาะฟักในภาคตะวันออก (TT-H และ RA-H) กับตัวอย่างจากธรรมชาติอ่าวไทยตอนบน CH-W ($F_{ST} = 0.003$, $p = 0.120$ และ $F_{ST} = 0.012$, $p = 0.003$)

เมื่อพิจารณาแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างคู่ตัวอย่างที่สร้างจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรม Cavalli-Sforza and Edward's distance (รูปที่ 1) กลุ่มตัวอย่างจากธรรมชาติมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบ Exact tests และค่า F_{ST} กล่าวคือกลุ่มตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนบน (TR-W และ CH-W) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกัน และต่างจากกลุ่มตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนล่าง (PN-W) ส่วนในกลุ่มตัวอย่างจากโรงเพาะฟัก RA-H และ RF-H แตกต่างจากตัวอย่างอื่น ๆ มากที่สุด เมื่อพิจารณาตัวอย่างทั้งหมดพบว่ากลุ่มตัวอย่างจากโรงเพาะฟัก ยังมีลักษณะคล้ายกับกลุ่มตัวอย่างจากธรรมชาติ ดังนี้คือ TT-H คล้ายกับ CH-W (bootstrap value = 53.6%) และ NK-H คล้ายกับ TR-W (bootstrap value = 58%) นอกจากนี้จากแผนภาพยังแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่าง RA-H และ RF-H (bootstrap value = 59.5%)

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

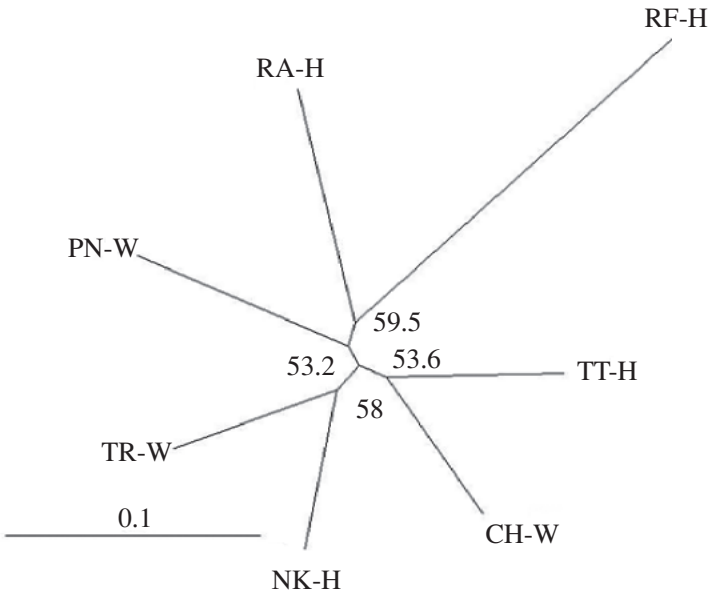
ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปลากะพงขาว

กลุ่มปลากะพงขาวจากธรรมชาติในการศึกษานี้ มีค่า H_o และ H_e ที่คำนวณจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมา (Zhu et al. 2006; Yue et al. 2009) แต่มีค่าเฉลี่ย อัลลิลต่อตำแหน่งต่ำกว่าประชากรปลาธรรมชาติในการศึกษาดังกล่าว ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการศึกษาทั้งสองการศึกษา วิเคราะห์จำนวนตัวอย่างที่มากกว่าการศึกษานี้ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าอัลลิลต่อตำแหน่งที่มีการปรับขนาดของตัวอย่าง (A_r) พบว่าค่าที่พบในกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้มีค่าสูงกว่าที่พบใน Yue et al. (2009) ซึ่งเป็นไปตามความคาดหมาย เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างจากอ่าวไทยที่รวมอยู่ใน Yue et al. (2009) เป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงสุด

ตารางที่ 3 ค่าความน่าจะเป็น (*P*-value) ของการทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากร โดย Exact tests สำหรับ genic differentiation (ด้านบน) และค่า pairwise F_{ST} (ด้านล่าง) ของกลุ่มตัวอย่างปลากะพงขาว 7 แหล่ง

	TT	RA	RF	NK	CH	TR	PN
TT	-	0.000000*	Highly sign.	0.000019*	0.000537*	Highly sign.	Highly sign.
RA	0.016*	-	Highly sign.	Highly sign.	0.000190*	Highly sign.	Highly sign.
RF	0.052*	0.056*	-	0.000000*	Highly sign.	Highly sign.	Highly sign.
NK	0.006 ns	0.018*	0.049*	-	0.002315 ns	0.539147 ns	0.000005*
CH	0.003 ns	0.012 ns	0.050*	0.002 ns	-	0.007921 ns	0.000000*
TR	0.016*	0.036*	0.057*	0.002 ns	0.006 ns	-	0.000005*
PN	0.029*	0.038*	0.083*	0.020*	0.022*	0.013*	-

หมายเหตุ : เครื่องหมาย * และ Highly sign. แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P < 0.002$ ซึ่งเป็นค่าความน่าจะเป็นที่มีการปรับสำหรับการใช้ข้อมูลวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple tests) ด้วย Bonferroni correction (0.05/21) (Rice 1989)



รูปที่ 1 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สร้างจาก Cavalli-Sforza and Edward's distance โดยวิธี UPGMA ของกลุ่มตัวอย่างปลากะพงขาว 7 กลุ่ม (ตัวเลขที่แสดงบนจุดแยกคือค่าร้อยละของการทำซ้ำจากการสุ่ม (bootstrap) 1,000 ครั้ง)

ตัวอย่างจากโรงเพาะฟัก บริเวณอ่าวไทย (การศึกษานี้) มีค่าเฉลี่ย A_r (6.78) สูงกว่าค่าในการศึกษาของ Yue et al. (2009) (A_r = 5.33) ซึ่งน่าจะเป็นเพราะตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาวที่ใช้ในการศึกษาดังกล่าว ผ่านการคัดพันธุ์มาแล้วหลายรุ่น หรือใช้พ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นที่นำเข้าจากต่างประเทศซึ่งอาจมีจำนวนไม่มากนัก (Yue et al. 2009) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟักในการศึกษานี้ในครั้งนี้ส่วนใหญ่ไม่แตกต่างกับค่าที่วัดได้ในประชากรธรรมชาติ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากโรงเพาะฟักในประเทศไทยมีการกระจายอยู่ทั่วประเทศไทยจึงมีการใช้ปลาในแหล่งน้ำท้องถิ่นบางส่วนมาเป็นพ่อแม่พันธุ์และมีระดับการแลกเปลี่ยนพ่อแม่พันธุ์/ลูกพันธุ์ในวงกว้าง (นิพนธ์ ติดต่อเป็นการส่วนตัว) ซึ่งการจัดการพันธุกรรมในลักษณะนี้เห็นได้จากปลาน้ำจืดหลายชนิดในประเทศไทย เช่น ปลากัด (Meejui et al. 2005), และปลาสวาย (ทักขิณาและอุทัยรัตน์ 2550) ที่เกษตรกรตั้งใจที่จะรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการผสมไขว้ปลาที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้ขัดแย้งกับหลายการศึกษาที่พบว่าประชากรโรงเพาะฟักของสัตว์น้ำหลายชนิดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าธรรมชาติ เนื่องจากใช้พ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นจำนวนน้อยและไม่มีการผสมแหล่งพันธุกรรมที่หลากหลายเพิ่มเติม เช่น ปลาแซลมอนแอตแลนติก *(Salmo salar)* (Norris et al. 1999), หอยเชลล์ *(Patinopecten yessoensis)* (Li et al. 2007) และหอยเป๋าฮื้อ *(Haliotis discus)* (Li et al. 2004)

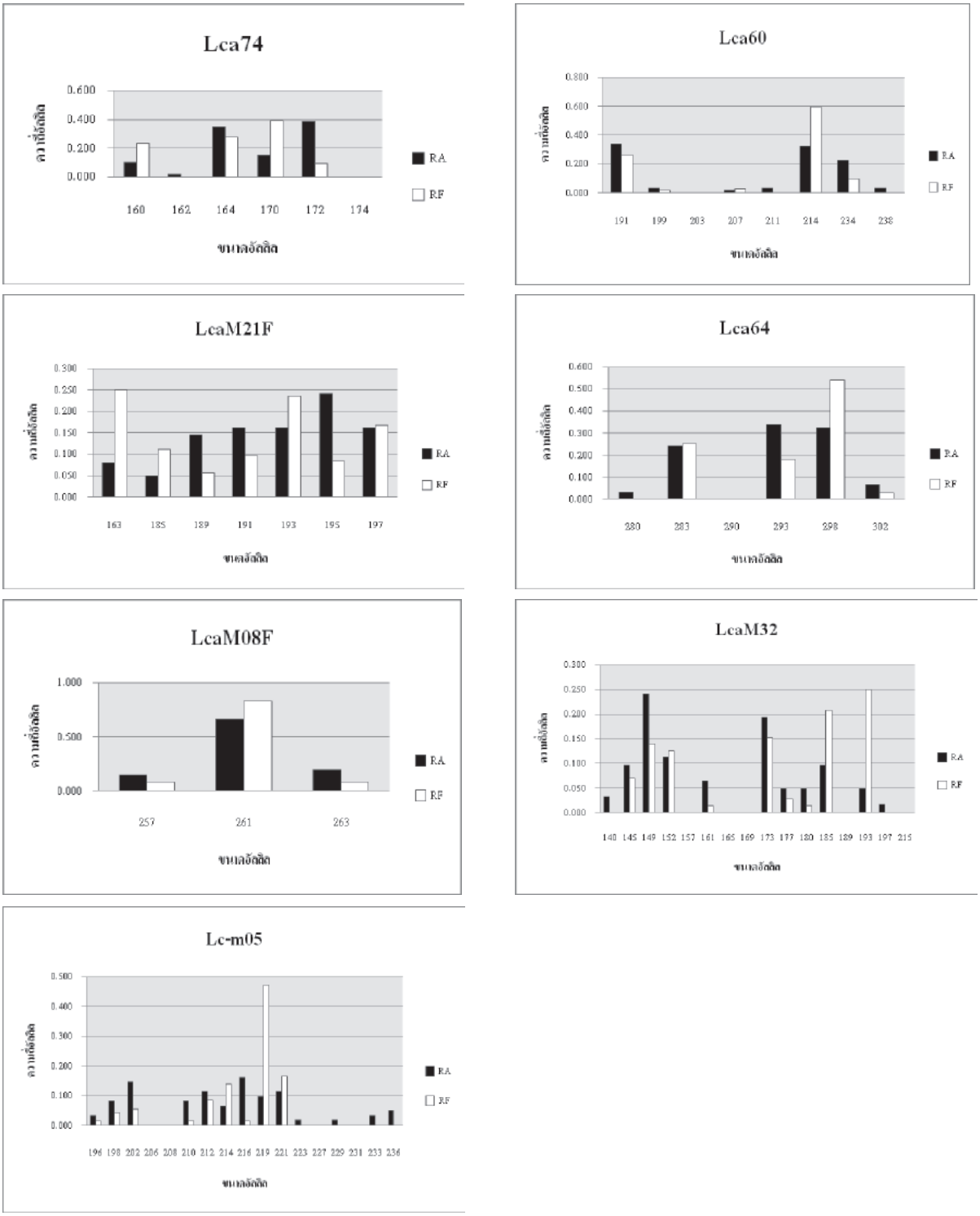
กลุ่มตัวอย่างโรงเพาะฟักที่มีแนวโน้มสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมเร็วกว่าประชากรอื่น ได้แก่ RF-H ซึ่งเป็นปลารุ่นลูกที่โตเร็วของ RA-H โดยพบว่าหลังจากการคัดพันธุ์เพียง 1 รุ่น มีการสูญหายและเปลี่ยนความถี่ของบางอัลลิล (รูปที่ 2) ซึ่งน่าจะเป็นผลของการขาดช่วงทางพันธุกรรม นอกจากนี้ค่า effective population size (Ne) ของ RF-H มีค่าลดลงจากรุ่น RA-H มากกว่า 6 เท่า (สุภาพร 2553) การลดลงของ Ne ใน RF-H น่าจะเกิดจากวิธีการเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวในโรงเพาะฟักมีการผสมพันธุ์เป็นกลุ่ม ซึ่งพ่อแม่พันธุ์ที่ปล่อยไปอาจไม่ได้รับการผสมทุกตัว (Frost et al. 2006) และการคัดเลือกปลาบางตัวของรุ่น (โตเร็ว; นิพนธ์ ติดต่อเป็นการส่วนตัว) อาจเป็นสัดส่วนที่น้อยเมื่อเทียบกับปลาทั้งรุ่น ข้อมูลในลักษณะนี้เป็นบทเรียนที่สำคัญในการคัดพันธุ์ปลากะพงขาวในอนาคต ที่ต้องให้ความสำคัญกับลักษณะการผสมพันธุ์ที่จะรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพ่อแม่พันธุ์รุ่นถัดไป ทั้งนี้การประยุกต์ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในการติดตามครอบครัวน่าจะเป็นวิธีหนึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าว

ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่าง

โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรธรรมชาติของปลากะพงขาวที่พบในการศึกษาในครั้งนี้ ที่กลุ่มตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนบนแตกต่างจากกลุ่มตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนล่าง

คล้ายกับโครงสร้างทางพันธุกรรมที่พบในสัตว์ชนิดอื่นในอ่าวไทย เช่น กุ้งแชบ๊วย (Penaeus merguiensis; ศรีรัตน์ และ พนม กระจ่างพจน์ 2541; Wanna et al. 2004) ทั้งนี้โครงสร้างทางพันธุกรรมของปลากะพงขาวน่าจะเกิดจากรูปแบบการพัดพาตัวอ่อนซึ่งมีลักษณะล่องลอยไปตามกระแสน้ำโดยมวลน้ำที่ต่างกัน โดยระยะทางมากกว่า 400 กิโลเมตร ประกอบกับอิทธิพลของลมมรสุม ทำให้มวลน้ำอ่าวไทยตอนบนกันอ่าวไทยตอนล่างแยกออกจากกัน (Camerlengo and Demmler 1997) โครงสร้างทางพันธุกรรมในธรรมชาติสะท้อนถึงต้นทุนทางพันธุกรรมของปลาชนิดนี้ในประเทศไทย

กลุ่มตัวอย่างโรงเพาะฟักที่ศึกษามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมเกือบทุกคู่ประชากรซึ่งสะท้อนถึงความมีเอกลักษณ์



รูปที่ 2 การกระจายและความถี่อัลลิลที่เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง ของตัวอย่าง RA-H กับ RF-H

ทางพันธุกรรม ซึ่งขัดแย้งกับความเชื่อที่ว่าพ่อแม่ปลากะพงขาวส่วนใหญ่ของประเทศไทยมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม การที่ปลากะพงขาวมีความแตกต่างทางพันธุกรรมนับว่าเป็นสิ่งที่ดีเนื่องจากเป็นแหล่งพันธุกรรมที่หลากหลายสำหรับการสร้างประชากรตั้งต้นในการปรับปรุงพันธุ์ อย่างไรก็ตาม การผสมข้ามกลุ่มที่มีเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมต้องทำด้วยความระมัดระวัง มิฉะนั้น อาจนำไปสู่การสูญเสียเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของประชากรที่มีคุณค่าได้ (Hallerman 2004) ส่วนคู่ตัวอย่างที่มีการคล้ายกันทางพันธุกรรมคือ NK-H กับ TT-H อาจเป็นเพราะจากการใช้พ่อแม่พันธุ์จากแหล่งเดียวกัน แม้ว่า ศพช. นครศรีธรรมราช จะซื้อพ่อแม่พันธุ์จากเกษตรกรที่เลี้ยงปลากะพงขาวเป็นปลาเนื้อในบริเวณจังหวัดนครศรีธรรมราช แต่เกษตรกรได้มีการรับลูกพันธุ์ปลามาจากจังหวัดฉะเชิงเทรา (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจังหวัดนครศรีธรรมราช ติดต่อเป็นการส่วนตัว) ซึ่งเป็นฟาร์มที่ฉะเชิงเทราส่วนใหญ่รับลูกพันธุ์มาจากภาคตะวันออกเอง (ฟาร์มทะเลทอง ติดต่อเป็นการส่วนตัว)

ประชากรปลาธรรมชาติภาคตะวันออก น่าจะเป็นองค์ประกอบทางพันธุกรรมที่สำคัญของประชากรโรงเพาะฟักที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CH-W และบริเวณใกล้เคียง ดังจะเห็นได้จากระดับความคล้ายทางพันธุกรรมของตัวอย่างจากโรงเพาะฟักส่วนใหญ่ รวมถึง NK-H จาก ศพช. นครศรีธรรมราช ส่วนความแตกต่างทางพันธุกรรมของ RF-H ซึ่งเป็นปลาที่ผ่านการคัดพันธุ์ของ ศพช. ระยอง จากกลุ่มตัวอย่างอื่น ๆ แม้แต่ RA-H น่าจะเป็นผลมาจากการขาดช่วงทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนความถี่อัลลิลในรุ่นลูก (รูปที่ 2) ซึ่งผลของการขาดช่วงทางพันธุกรรมลักษณะนี้สามารถพบเห็นได้บ้างในสัตว์น้ำชนิดอื่น เช่นปลา Salmo obtusirostris ซึ่งมีการเคลื่อนย้ายสัตว์บางส่วนจากแหล่งที่อยู่เดิม ไปยังที่อยู่ใหม่ทำให้ปลากลุ่มใหม่สูญเสียบางอัลลิล และมีความถี่อัลลิลที่เปลี่ยนไป จนทำให้ปลา 2 กลุ่มมีความแตกต่างทางพันธุกรรมหลังจากการย้ายเพียงไม่กี่รุ่น (Snoj et al., 2007)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานสนับสนุนการวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศาสตราจารย์ อุทัยรัตน์ ณ นคร) ทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์/ดุษฎีนิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2553 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2553 มหาวิทยาลัยบูรพา นอกจากนี้ยังขอขอบคุณผู้มีส่วนสนับสนุนการเก็บตัวอย่าง ซึ่งได้แก่ ฟาร์มทะเลทอง จ.ชลบุรี, ผู้อำนวยการและเจ้าหน้าที่ ศพช. จ.นครศรีธรรมราช, ผู้อำนวยการและคุณนิพนธ์ เสนอินทร์ จาก ศพช. จ.ระยอง รวมถึงผู้รวบรวมตัวอย่างและชาวประมง จ.นครศรีธรรมราช, จ.จันทบุรี และจ.ตราด

เอกสารอ้างอิง

ทักขิณา เหมยคำ และอุทัยรัตน์ ณ นคร (2550). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวาย *(Pangasianodon hypophthalmus)*. ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาประมง. 63-69.

สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งแห่งชาติ. (2524). การเพาะพันธุ์ปลากะพงขาว *(Lates calcarifer)*. กรมประมงน้ำกร่อย.

สุจินต์ มณีวงศ์ และสวัสดิ์ วงศ์สมนึก (2517). การทดลองเพาะพันธุ์ปลากะพงขาว โดยวิธีผสมเทียม. ในรายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 13 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 4-6 กุมภาพันธ์ 2517. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภาพร สอนแก้ว (2553). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลากะพงขาว *(Lates calcarifer Bloch)* ในบริเวณอ่าวไทย. วิทยานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต. สาขาวาริชศาสตร์. วิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยบูรพา.

ศรีรัตน์ สอดศุข และพนม กระจ่างพจน์ สอดศุข (2541). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกุ้งแชบ๊วยจาก 3 แหล่งในประเทศไทย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 17/2541, สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อุทัยรัตน์ ณ นคร (2543). พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

Carmerlengo A., and Demmler M.L. (1997). Wind-driven circulation of penisular Malaysiaís eastern continental shelf. Scientia Marina, 61(2). 203-211.

Dieringer D., and Schlotterer C. (2003). Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. Molecular Ecology Notes. 3. 167-169.

Excoffier L., Laval G., and Schneider S. (2006). An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG) Institute of Zoology University of Berne.

Felsenstein J. (2007). PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.67, Department of Genome Sciences and Department of Biology, University of Washington, Seattle, Wash, USA.

Frost L.A., Brad S.E., & Jerry D.R. (2006). Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi *(Lates calcarifer)*. Aquaculture, 261. 1056-1064.

Goudet J. (2001). FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Version 2.9.3. Available from www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html.

Hallerman E.M. (ed.) (2004). Population genetics: Principles and applications for fisheries scientists. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.

Li Q., Park C., Endo T., and Kijima A. (2004). Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone *(Haliotis discus hannai)*. Aquaculture, 235. 207-222.

Li Q., Xu K., and Yu R. (2007). Genetic variation in Chinese hatchery population of the Japanese scallop *(Patinopecten yessoensis)* inferred from microsatellite data. Aquaculture, 269. 211-219.

Liu Z.J., and Cordes J.F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture, 238. 1-37.

Meejui O., Sukmanomon S., and Na-Nakorn U. (2005). Allozyme revealed substantial genetic diversity between hatchery stocks of Siamese fighting fish, *Betta splendens*, in the province of Nakornpathom, Thailand. Aquaculture, 250. 110-119.

Norris A.T., Bradley D.G., and Cunningham E.P. (1999). Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon *Salmo salar* populations. Aquaculture, 180. 47-264.

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

Rice W.R. (1989). Analyzing tables of statistical test. Evolution, 43(1). 223-225.

Rousset F. (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources. 8. 103-106.

Sim M.P., and Othman A.S. (2005). Isolation and characterization of microsatellite DNA loci in sea bass, *lates calcarifer* Bloch. Molecular Ecology Notes, 5. 873-875.

Snoj A., Razpet A., and Tomljanovic T. (2007). Genetic composition of the Jadro softmouth trout following translocation into a new habitat. Conservation Genetics, 8. 1212-1217.

Wanna W., Rolland J-L., Bonhomme F., and Phongdara A. (2004). Population genetic structure of *Penaeus merguiensis* in Thailand based on nuclear DNA variation. Marine Biology and Ecology, 311. 63-78.

Yue G.H., Li Y., Chao T.M., Chou R., and Orban L. (2002). Novel Microsatellites from Asian Sea Bass *(Lates calcarifer)* and Their Application to Broodstock Analysis. Marine biotechnology, 4. 503-511.

Yue G.H., Zhu Z.Y., Lo L.C., Wang C.M., Lin G., Feng F., Pang H.Y., Gong P., Liu H.M., Tan J., Chou R., Lim H., and Orban L. (2009). Genetic variation and population structure of Asian Sea Bass *(Lates calcarifer)* in the Asia-Pacific region. Aquaculture, 293. 22-28.

Zhu Z.Y., Lin G., Lo L.C., Xu Y.X., Feng F., Chou R., and Yue G.H. (2006). Genetic analyses of Asian Sea Bass stock using novel polymorphic microsatellites. Aquaculture, 256. 167-173.