รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูน้ำจืดในภาคกลางของประเทศไทย

Genetic Diversity Among Populations of Fresh-Water Crabs in the Central Part of Thailand

ชื่อผู้วิจัย

1. นางนงลักษณ์	สกุลญานนท์วิทยา*	หัวหน้าโครงการ
2. นายอนันต์	พู่พิทยาสถาพร*	
3. นางสาวพันธุ์สิน	เกตุทัต*	
4. นางสุมณฑา	พรหมบุญ*	ที่ปรึกษาโครงการ
5. นายไพบูลย์	นัยเนตร**	ที่ปรึกษาโครงการ

* ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

595.3842
ร451

219	รายงานการวิจัยการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูน้ำจืดในภาคกลางของประเทศไทย	นงลักษณ์ สกุลญานนท์วิทยา ... [และ	595.3842 ร451	31011101701514

595.3842
ส451

รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูน้ำจืดในภาคกลางของประเทศไทย

Genetic Diversity Among Populations of Fresh-Water Crabs in the Central Part of Thailand

ชื่อผู้วิจัย

1.	นางนงลักษณ์	สกุลฌานนท์วิทยา*	หัวหน้าโครงการ
2.	นายอนันต์	พู่พิทยาสถาพร*	
3.	นางสาวพันธุ์สิน	เกตุทัต*	
4.	นางสุมณฑา	พรหมบุญ*	ที่ปรึกษาโครงการ
5.	นายไพบูลย์	นัยเนตร**	ที่ปรึกษาโครงการ

* ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

26 พ.ย. 2542

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ งบประมาณปี 2537 จำนวนเงิน 77,000.00 บาท คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัย และฝ่ายวิจัยของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดียิ่ง

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2542

บทคัดย่อ

ปูนา *Sayamia bangkokensis* จากจังหวัด อยุธยา อ่างทอง สุพรรณบุรี ปทุมธานี นครปฐม และลพบุรี จังหวัดละ 20 ตัวอย่าง นำมาศึกษาแบบแผนโปรตีนของเอนไซม์ 10 ชนิด คือ ALDOX ACP AKP G-6-PD HBDH PGM ODH SOD XDH EST โดยวิธี Starch - gel Electrophoresis เพื่อดูความแปรผันทางพันธุกรรมของ *S. bangkokensis* ในต่างสถานที่ พบว่าค่าเฉลี่ยของ Observed heterozygosity มีค่า 0.2471 ค่าเฉลี่ย G_{ST} เท่ากับ 0.0578 ค่าความคล้ายทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.9542 - 0.9995 และระยะห่างระหว่างพันธุ์อยู่ในช่วง 0.0005 - 0.0469 ผลจากการคำนวณดังกล่าว *S. bangkokensis* จาก 6 จังหวัด มีความคล้ายทางพันธุกรรมกันมาก หรือมีระยะห่างระหว่างพันธุ์น้อย

Abstract

Twenty samples of *Sayamia bangkokensis* collected from Ayudhaya, Angthong, Supanburi, Patumtani, Nakornpathom and Lopburi were studied on ten metabolic enzymes (ALDOX ACP AKP G-6PD HBDH PGM ODH SOD XDH EST) by using starch-gel electrophoresis. Genetic variation among crabs from the six localities was inferred from the variation of those enzymes. The average proportion of Observed Heterozygosity was 0.2471 and the average G_{ST} value was 0.0578. The calculated Genetic Identity (I) ranged from 0.9542 - 0.9995 while the Genetic Distance (D) ranged from 0.0005 - 0.0469.

Considering the outcome calculation, it was shown that *S. bangkokensis* from this six localities were similar in Genetic Identity whereas their Genetic Distances were very narrow.

สารบัญเรื่อง

หน้า

บทนำ 1

วิธีการดำเนินการวิจัย 1

การเก็บข้อมูลตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา .....

การเตรียมเจล .....

การย้อมสีเจล .....

การแปรผลแถบเอนไซม์ที่ได้จากการย้อมสีโดยการคำนวณ .....

ผลการวิจัย 4

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย 5

หนังสืออ้างอิง 6

ภาคผนวก

ตาราง 1 Electrode และ gel buffer 8

ตาราง 2 ส่วนผสมสีและสารในการย้อม gel 9

ตาราง 3 ความถี่ของ Genotype ของ enzyme 11

ตาราง 4 ความถี่ของ allele ของ enzyme 12

ตาราง 5 อัตราส่วนของ polymorphism 13

ตาราง 6 Observed Heterozygosity 14

ตาราง 7 Expected Heterozygosity 14

ตาราง 8 ค่า $\overline{H}_S$, H_T, and G_{ST} 15

ตาราง 11 Genetic Identity และ Genetic Distances 17

สารบัญภาพ

ภาพแสดง Electrophoretic mobility ของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาจาก 6 จังหวัด ดังต่อไปนี้

ภาพที่		หน้า
1	HBDH, XDH และ PGM	19
2	AKP และ G-6PD	20
3	ALDOX	21
4	ACP และ EST	22
5	ODH และ SOD	23

บทนำ

ปูนา (*Somanniathelphusa bangkokensis* Naiyanetr, 1982) เป็นปูน้ำจืดที่พบได้ทั่วไปตามคันนา ท้องนา โดยมีการกระจายอยู่ในพื้นที่ต่าง ๆ 25 จังหวัด และพบในภาคกลางมากที่สุดถึง 20 จังหวัด ในปัจจุบันสกุล *Somanniathelphusa* ได้แบ่งออกเป็นสกุลใหม่ 3 สกุล คือ *Sayamia*, *Esanthelphusa* และ *Chulathelphusa* โดยพิจารณาจากความแตกต่างของรูปร่างกระดอง โครงสร้างของ Post-orbital-crest และรูปร่างของอวัยวะเพศผู้คู่ที่หนึ่ง (Gonopod) โดยที่ปูนาที่ศึกษาในครั้งนี้จัดอยู่ใน *Sayamia bangkokensis* และเป็นกลุ่มประชากรส่วนใหญ่ของปู 3 สกุลใหม่ที่กล่าวถึงข้างต้น (Naiyanetr 1994)

การศึกษา Isozyme ในประชากรปูโดยวิธี Electrophoresis นี้ จะทำให้ทราบถึงกลไกของ gene-enzyme system ของประชากรปู ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรม โดยวิธีการดังกล่าว จะใช้ในการสนับสนุนการจัดจำแนกชนิดของปูนาตามหลักอนุกรมวิธาน รวมทั้งเป็นแนวทางในการศึกษาอนุกรมวิธานในระดับไมเลกุล หรืออาจจะเป็นข้อมูลที่สนับสนุนว่าการกระจายพันธุ์ไปตามพื้นที่ต่าง ๆ ของปูนั้นได้รับอิทธิพลของสภาพแวดล้อม และภัยธรรมชาติซึ่งอาจมีผลต่อลักษณะทางกายวิภาคของปู และอิทธิพลของสภาพแวดล้อมมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงหรือการแปรผันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตจริงหรือไม่และอย่างไร

การวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของปูนา *S. bangkokensis* ในจังหวัด นครปฐม ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา อ่างทอง สุพรรณบุรี และลพบุรี โดยศึกษา Isozyme ด้วยวิธี Electrophoresis ที่สามารถแยกแบบแผนของเอนไซม์ และนำไปจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต เพื่อดูว่า จากลักษณะภายนอกที่จัดจำแนกชนิดของปูนานี้ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลทางพันธุกรรม จะสอดคล้องกันหรือไม่

วัสดุและวิธีการทดลอง

1. *S. bangkokensis* ขนาดใกล้เคียงกันดูได้จากความกว้างของกระดอง เก็บรวบรวมจากแต่ละอำเภอเมือง ของจังหวัด นครปฐม ปทุมธานี สุพรรณบุรี อยุธยา อ่างทอง และลพบุรี แห่งละประมาณ 30-40 ตัว จากนั้นนำเฉพาะส่วนของ hepatopancreas ของแต่ละตัวนำมาแยกปั่นใน tris buffer pH 7.0 ที่ 4°C ความเร็ว 10,000 rpm ประมาณ 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายใส (supernatant) ข้างบน เก็บไว้ใน -20° C จนกว่าจะใช้

2. นำ Sample ที่ได้จากข้อ 1 มาศึกษาแถบของเอนไซม์ โดยกระบวนการ Electrophoresis ใน 12 % Starch gel (ตาราง 1) โดยเอนไซม์ที่ศึกษาได้แก่

ชื่อเอนไซม์	ชื่อย่อ
Aldehyde Oxidase	ALDOX
Acid Phosphatase	ACP
Alkaline Phosphatase	AKP
Glucose-6-Phosphate dehydrogenase	G-6-PD
β-Hydroxy butyrate dehydrogenase	HBDH
Phosphoglucomutase	PGM
Octanol dehydrogenase	ODH
Superoxide dismutase	SOD
Xanthine dehydrogenase	XDH
Esterase	EST

3. จากผลของ Electrophoresis นำมาย้อมสีของเจล เพื่อศึกษา Enzyme activity stain ตามวิธีของ Steiner, W.W.W. and D.J. Joslyn, 1979 และ Pasteur, N. et al, 1988 (ตาราง 2)

4. จากผลของแถบ Enzyme activity stain นำมาคำนวณหาค่าความแปรผันทางพันธุกรรมของปู ได้ดังนี้

4.1 คำนวณค่าความถี่ของอัลลีล (Allele frequency) จากสูตร

$$\text{ความถี่ของอัลลีล} = \frac{\text{จำนวนอัลลีลที่พบในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง}}{\text{จำนวนอัลลีลทั้งหมดที่พบในกลุ่มตัวอย่าง}}$$

4.2 คำนวณค่าพอลิมอร์ฟิซึม (Polymorphism) จากสูตร

$$\text{ค่าพอลิมอร์ฟิซึม} = \frac{\text{จำนวนพอลิมอร์ฟิคโลคัส}}{\text{จำนวนโลคัสทั้งหมด}}$$

(พอลิมอร์ฟิคโลคัส หมายถึง โลคัสที่ไม่มีอัลลีลใดมีความถี่เกิน 0.98)

4.3 คำนวณค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต (observed heterozygosity) จากสูตร

$$\text{ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่เป็นเฮเทอโรไซโกต}}{\text{จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา}}$$

4.4 คำนวณค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากความคาดหวัง (expected heterozygosity) จากหลักของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Principle)

ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากความคาดหวัง = $1-(A_1^{\ 2} + A_2^{\ 2})$

โดย A_1 = ความถี่ของอัลลีล A_1

A_2 = ความถี่ของอัลลีล A_2

4.5 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic Differentiation : G_{ST}) (Nei, M.1975)

$$G_{ST} = \frac{H_T - \overline{H}_S}{H_T}$$

H_T = อัตราส่วนของเฮเทอโรไซโกซิตีในประชากรรวมทุกกลุ่ม

H_S = อัตราส่วนของเฮเทอโรไซโกซิตีในประชากรย่อยแต่ละกลุ่ม

$\overline{H}_S$ = ค่าเฉลี่ยของ H_S ของทุกกลุ่ม

4.6 ค่าความคล้ายทางพันธุกรรม (Genetic Similarity : I) (Nei, M. 1975) ของประชากร X และ Y

$$I = J_{XY} \ / \ \sqrt{J_X J_Y}$$

โดย

$j_X = \sum X_i^{\ 2}$

$j_Y = \sum Y_i^{\ 2}$

$j_{XY} = \sum X_i Y_i$

J_X = ค่าเฉลี่ยของ j_X ทุกโลคัส

J_Y = ค่าเฉลี่ยของ j_Y ทุกโลคัส

J_{XY} = ค่าเฉลี่ยของ j_{XY} ทุกโลคัส

X_i = ความถี่ของอัลลีลที่โลคัส i ในประชากร X

Y_i = ความถี่ของอัลลีลที่โลคัส i ในประชากร Y

4.7 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic Distance : D)

$$D = \log_e I$$

ผลการทดลอง

1. จากผลของ Enzyme activity stain แถบโปรตีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ Enzyme ในประชากรของ *S. bangkokensis* จาก 6 จังหวัดดังกล่าวในเขตภาคกลางของประเทศไทย พบว่า เป็นดังต่อไปนี้

1.1 เอนไซม์ XDH, PGM และ HBDH มี 1 โลคัส (locus) พบแถบโปรตีนแถบเดียว เป็น Homozygotes monomeric และ electrophoretic mobility ของทั้ง 6 จังหวัด ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 1)

1.2 เอนไซม์ AKP และ G -6 PD มี 1 โลคัส แถบโปรตีนพบทั้งมี 1 แถบ เป็น Homozygotes monomeric และ แถบโปรตีน 2 แถบ เป็น Heterozygotes monomeric และ Electrophoretic mobility ของทั้ง 6 จังหวัด ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 2)

1.3 เอนไซม์ ALDOX มี 2 โลคัส คือ ALDOX 1 และ ALDOX 2 ALDOX 1 มี 2 แถบโปรตีน เป็น Heterozygotes monomeric และ ALDOX 2 มีโปรตีน 1 แถบ เป็น Homozygote monomeric (ภาพที่ 3)

1.4 เอนไซม์ ACP และ EST แถบ Activity Stain ของทั้ง 2 เอนไซม์ มี 3 โลคัส โดยผลเป็นดังนี้

ACP_1 พบโปรตีน 2 แถบ เป็น Heterozygotes monomeric ส่วน ACP_2 และ ACP_3 มี 1 แถบโปรตีนเป็น Homozygotes monomeric (ภาพที่ 4)

EST_1 และ EST_3 พบ 2 แถบเป็น Heterozygotes monomeric ส่วน EST_2 เป็น Homozygotes monomeric (ภาพที่ 4)

1.5 เอนไซม์ ODH และ SOD แถบ Activity Stain มี 2 โลคัส โดยที่ ODH_1 และ SOD_1 พบ 3 แถบโปรตีน เป็น Dimeric ส่วน ODH_2 และ SOD_2 เป็น Homozygote monomeric และ electrophoretic mobility ของเอนไซม์ ทั้ง 2 ของ 6 จังหวัดไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 5)

2. ตารางที่ 4 แสดงถึงความถี่ของอัลลีลและคำนวณวัดหาค่าสัดส่วนของยีนที่ผันแปร (Polymorphism) มีค่าเฉลี่ยของ 6 จังหวัด 0.4314 (ตาราง 5)

3. คำนวณค่ายีนที่เป็น Heterozygosity ของทั้ง 6 จังหวัด ค่าเฉลี่ยของ Observed heterozygosity มีค่าเท่ากับ 0.2471 ค่าเฉลี่ยของ Expected heterozygosity มีค่า 0.1980 (ตาราง 6 และตาราง 7)

4. ค่า G_{ST} จากตาราง 8 ค่าเฉลี่ยต่อโลคัส = 0.0578 หรือ 5.78 %

5. ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (I) และระยะห่างของพันธุ์ (D) ของ *S. bangkokensis* ใน 6 จังหวัด (ตาราง 11)

พบว่า *S. bangkokensis* จาก ปทุมธานี และนครปฐม มีความใกล้ชิดระหว่างพันธุ์กันมากที่สุด (I = 0.9995, D = 0.0005) ในขณะที่ *S. bangkokensis* จาก ปทุมธานีและสุพรรณบุรี มีความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์น้อยที่สุด โดยที่มีค่า I = 0.9542 และ D = 0.0469

สรุปและวิจารณ์ผล

ในการศึกษาเอนไซม์ 10 ชนิด จากส่วน hepatopancreas ของปูนา ***S. bangkokensis*** ในเขตจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ลพบุรี สุพรรณบุรี อ่างทอง นครปฐม ปทุมธานี พบว่า เอนไซม์ทั้ง 10 ชนิดควบคุมโดยยีน 17 โลคัส และเอนไซม์ XDH PGM HBDH เป็น Homozygote ยีนที่เป็น homozygote จำนวน 6 โลคัส ได้แก่ ACP_2, ACP_3, $ALDOX_2$, EST_2, ODH_2 และ SOD_2 ยีนที่เป็น heterozygote monomeric มี 6 โลคัส AKP, G-6PD, ACP_1, $ALDOX_1$, EST_1, EST_3 และ heterozygote dimeric จำนวน 2 โลคัส ODH_1 และ SOD_1

จากค่าสัดส่วนของยีนที่ผันแปร (Polymorphism) พบว่าจังหวัดนครปฐมและปทุมธานี มีความผันแปรทางพันธุกรรมน้อยกว่าอีก 4 จังหวัด ที่ศึกษาและค่า Observed, Expected heterozygosity มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.2471 และ 0.1980 ตามลำดับ จากค่าเฉลี่ยที่ได้แสดงว่าประชากรที่ศึกษา เป็นประชากรที่สมดุลตามแบบฮาร์ดี - ไวน์เบิร์ก

ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (G_{ST}) เฉลี่ยของยีนที่ศึกษา 17 โลคัส มีค่าเท่ากับ 0.0578 หมายความว่ากลุ่มตัวอย่างนี้ ความแตกต่างของประชากรปูในระหว่างจังหวัดมีค่าเท่ากับ 5.78 % และอีก 94.22 % เป็นความแตกต่างของประชากรปูภายในแต่ละจังหวัด ผลจากค่า Genetic Similarity และ Genetic Distance จากความแปรผันทางพันธุกรรมในระดับเอนไซม์ พบว่า *S. bangkokensis* ในจังหวัดที่ศึกษา 6 จังหวัดในภาคกลาง อยู่ในช่วง 0.9542 - 0.9995 และ . 0.0005 - 0.0469 ตามลำดับ นับว่ามีความแปรผันทางพันธุกรรม ที่ไม่แตกต่างกันมาก เมื่อเทียบกับค่าเหล่านี้ของ *S. dugasti* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นงลักษณ์ และคณะ, 2536)

บรรณานุกรม

ไพบูลย์ นัยเนตร. "การแพร่กระจายของปูน้ำจืด *(Somanniathelphusa germaini)* ในประเทศไทย". **บทคัดย่อการประชุมวิชาการสาขาสัตว์ ครั้งที่ 14**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2518.

_____. "การกระจายทางภูมิศาสตร์ของปูน้ำจืดในประเทศไทย". **วารสารภูมิศาสตร์**. 3(3) : 24-43, 2521.

นงลักษณ์ สกุลญานนท์วิทยา, อนันต์ พู่พิทยาสถาพร, พันธุ์สิน เกตุทัต, สุมณฑา พรหมบุญ และไพบูลย์ นัยเนตร การวัดความแปรผันทางพันธุกรรมของปูนา *Somanniathelphusa dugasti* ใน 6 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทยด้วยวิธี Starch-gel electrophoresis **พันธุศาสตร์ยุคใหม่ รวมผลงานสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 8** 29 มี.ค - 1 เม.ย. 2536 มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม

Kijiviriya, V. "The Studies of the Asiatic Clams (*Corbicula*, MUHLFED, 1811) in Thailand : Electrophoretic Estimates of Enzyme Variation and the Use of Anatomy as a Species Indicator," Ph.D. Thesis, Mahidol University; 1990.

Lewontin, R.C. "Twenty-Five Years Ago in Genitics : Electrophoresis in the Development of Evolutionary Genetics : Milestone or Millstone," **Genetics.** 128 : 657-662; 1991.

Naiyanetr, P. "On Three New Genera of Thai Ricefield Crab Allied to *Somanniathelphusa* Bott, 1968 (Crustacea : Decapoda : Brachyura : Parathelphusidae)." **Raffles Bulletin of Zoology**. 42(3) : 695-700, 1994.

_____. "**Checklist of Crustacean Fauna in Thailand.**" Office of Environmental Policy and Planning. Ministry of Science Technology and Environment, 1998.

Nei, M. **Molecular Population Genetics and Evolution**. New York; North-Holland Publishing Company, Inc; 1975.

Pasteur, N. and others. **Practical Isozyme Genetics**. English Edition Ellis Horwood Limited; 215p; 1988.

Richardson, B.J.,P.R. Baverstock and M. Adams. **Allozyme Electrophoresis : A Handbook for Animal Systematics and Population Studies**. Academic press; 401p; 1986.

Shaw, R.C. and R. Prasad. "Starch Gel Electrophoresis of Enzymes-A Compilation of Recipies," **Biochem Genet.** 4 : 297- 320; 1970.

Steiner, W.W.M. and D.J. Joslyn. "Electrophoretic Techniques Use for the Genetic Study of Mosquitoes," **Mosquito News.** 39(1) : 35-54; 1979.

Yong, H.S. and others. "Genetic Variation in the Malaria Mosquito Vector *Anopheles maculatus* from Peninsular Malaysia," **Southeast Asian. J. Trop. Med. PUB. Hlth.** 19(4) : 681-687; 1988.

ตาราง 1 Electrode and gel buffers ที่ใช้ในการทดลอง

System	Enzymes	Electrode buffer	Gel buffer
LioH	ALDOX, ODH, SOD, PGM	0.036 M Lithium Hydroxide, 0.194 M Boric acid (pH 8.25)	0.074 M Trizma base 0.009 M Citric acid (pH 8.45)
CA-8	HBDH	1.37 M Trizma base 0.314 M Citric acid (pH 8.10)	0.074 M Trizma base 0.009 M Citric acid (pH 8.45)
CA-7	G-6PD	0.135 M Trizma base 0.040 M Citric acid (pH 6.90)	0.009 M Trizma base 0.003 M Citric acid (pH 7.10)
T.C.8.0	ACP, AKP, EST, XDH	0.6774 M Trizma base 0.1623 M Citric acid (pH 8.0)	0.018 M Trizma base 0.0053 M Citric acid (pH 8.0)

Note : LioH, CA-8 Cathode tray : dilute stock 1:3 (v/v)
Anode tray : dilute stock 1:4 (v/v)

ตาราง 2 ส่วนผสมสีและสารที่ใช้ในการย้อมเจล

Enzyme	Substrates	Coenzyme	Stain buffer	สารอื่น ๆ
ALDOX	acetaldehyde 0.1 ml	-	0.1 M Tris -HCl pH 8.0 2.5 ml	MTT 0.1 ml PMS 0.1 ml
ODH	octanol 0.2 ml	NAD 0.1 ml	0.1 M Tris-HCl pH 8.0 2 ml	MTT 0.1 ml PMS 0.1 ml
SOD	-	-	0.1 M Tris-HCl pH 8.0 2 ml	MTT 0.1 ml PMS 0.1 ml
PGM	Glucose-1-phosphate 10 mg	NADP 0.1 ml	0.1 M Tris - HCl pH 8.0 2 ml	1 M $MgCl_2$ 0.1 ml MTT 0.1 ml PMS 0.1 ml Glucose-6-phosphate dehydrogenase 2 unit (1.6 /ul)
HBDH	Hydroxy-butyrate 20 mg	NAD 0.1 ml	0.1 M Tris-HCl pH 8.0 2 ml	MTT 0.1 ml PMS 0.1 ml
G-6PD	Glucose- 6 - phosphate 6 mg	NADP 0.1 ml	0.1 M Tris-HCl pH 8.0 2 ml	MTT 0.1 ml PMS 0.1 ml 1 M $MgCl_2$ 0. 1 ml
ACP	Na-α- napthyl acid phosphate (10 mg)	-	0.06 M Acetate buffer pH 8.0 2.5 ml	Fast blue RR 6 mg
AKP	Na-α- napthyl acid phosphate 8mg	-	0.1 M Tris-HCl pH 8.5 2 ml	Fast blue RR 8 mg
EST	α - napthyl acetate 8 mg	-	0.1 M Tris-HCl pH 7.0 2 ml	Black K salt 5 mg
XDH	Hypoxanthine 8 ml	NAD 0.1 ml	0.1 M Tris-HCl pH 8.0 2 ml	MTT 0.1 ml PMS 0.1 ml

MTT = methyl thiazolyl tetrazolium

PMS = phenazine methosulphate

NAD = β-nicotinamide adenine dinucleotide

NADP = β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

ตาราง 8 จำนวนอีโนไทป์ของ *S. bangkokensis*

	พระนครศรีอยุธยา				ลพบุรี				สุพรรณบุรี				อ่างทอง				นครปฐม				ปทุมธานี			
enzyme	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2	N	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2	N	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2	N	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2	N	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2	N	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2	N
ACP_1	2	12	6	20	3	10	7	20	0	14	6	20	2	12	6	20	5	12	2	19	4	15	0	19
ACP_2	20	0	0	20	19	0	0	19	20	0	0	20	19	0	0	19	20	0	0	20	20	0	0	20
ACP_3	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	19	0	0	19	19	0	0	19
AKP	0	14	6	20	6	11	3	20	2	12	6	20	2	13	5	20	20	0	0	20	20	0	0	20
$ALDOX_1$	5	8	6	19	9	8	1	18	7	9	3	19	4	10	4	18	10	7	3	20	9	8	3	20
$ALDOX_2$	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20
EST_1	5	8	6	19	3	11	8	22	0	11	8	19	2	12	6	20	20	0	0	20	20	0	0	20
EST_2	20	0	0	20	20	0	0	20	19	0	0	19	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20
EST_3	5	14	1	20	0	20	0	20	2	15	2	19	2	14	4	20	2	14	4	20	2	17	1	20
G-6-PD	5	14	1	20	5	13	2	20	5	12	3	20	5	12	3	20	2	18	0	20	3	17	0	20
HBDH	19	0	0	19	18	0	0	18	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20
ODH_1	1	9	10	20	1	8	11	20	0	7	13	20	0	7	13	20	6	13	1	20	8	12	0	20
ODH_2	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20
PGM	20	0	0	20	19	0	0	19	18	0	0	18	19	0	0	19	20	0	0	20	19	0	0	19
SOD_1	9	9	2	20	11	7	2	20	8	11	1	20	11	8	1	20	8	6	6	20	9	5	6	20
SOD_2	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	19	0	0	19	19	0	0	19
XDH	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	19	0	0	19	19	0	0	19

ตาราง 4 ความถี่ของอัลลีล

	พระนครศรีอยุธยา		ลพบุรี		สุพรรณบุรี		อ่างทอง		นครปฐม		ปทุมธานี			เฉลี่ยทุกจังหวัด			H_T =2XA$_1$เฉลี่ย
enzyme	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2		A_1	A_2		XA$_2$ เฉลี่ย
ACP_1	0.4	0.6	0.4	0.6	0.35	0.65	0.4	0.6	0.57895	0.42105	0.60526	0.39474		0.4557	0.5443		0.4961
ACP_2	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0		1	0		0
ACP_3	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0		1	0		0
AKP	0.35	0.65	0.575	0.425	0.4	0.6	0.425	0.575	1	0	1	0		0.625	0.375		0.4688
$ALDOX_1$	0.47368	0.52632	0.72222	0.27778	0.60526	0.39474	0.5	0.5	0.675	0.325	0.65	0.35		0.60436	0.39564		0.4782
$ALDOX_2$	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0		1	0		0
EST_1	0.47368	0.52632	0.38636	0.61364	0.28947	0.71053	0.4	0.6	1	0	1	0		0.59159	0.40841		0.4832
EST_2	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0		1	0		0
EST_3	0.6	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.45	0.55	0.45	0.55	0.525	0.475		0.50417	0.49583		0.5000
G-6-PD	0.6	0.4	0.575	0.425	0.55	0.45	0.55	0.45	0.55	0.45	0.575	0.425		0.56667	0.43333		0.4911
HBDH	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0		1	0		0
ODH_1	0.275	0.725	0.25	0.75	0.175	0.825	0.175	0.825	0.625	0.375	0.7	0.3		0.36667	0.63333		0.4644
ODH_2	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0		1	0		0
PGM	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0		1	0		0
SOD_1	0.675	0.325	0.725	0.275	0.675	0.325	0.75	0.25	0.55	0.45	0.575	0.425		0.65833	0.34167		0.4499
SOD_2	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0		1	0		0
XDH	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0		1	0		0

ตาราง 5 ค่า polymorphism ของ *S. bangkokensis* ใน 6 จังหวัด

ประชากร	จำนวน polymorphic locus	จำนวน locus ทั้งหมด	ค่า polymorphism
พระนครศรีอยุธยา	8	17	0.4706
ลพบุรี	8	17	0.4706
สุพรรณบุรี	8	17	0.4706
อ่างทอง	8	17	0.4706
นครปฐม	6	17	0.3529
ปทุมธานี	6	17	0.3529
		ค่า polymorphism =	0.4314

ตาราง 6 observed heterozygote ของประชากรปู 6 จังหวัด

	อยุธยา	ลพบุรี	สุพรรณบุรี	อ่างทอง	นครปฐม	ปทุมธานี	เฉลี่ย
enzyme	(H_S)	(H_S)	(H_S)	(H_S)	(H_S)	(H_S)	(H_S)
ACP_1	0.6	0.5	0.7	0.6	0.6316	0.7895	0.6368
ACP_2	0	0	0	0	0	0	0
ACP_3	0	0	0	0	0	0	0
AKP	0.7	0.55	0.6	0.65	0	0	0.4167
$ALDOX_1$	0.4211	0.4444	0.4737	0.5556	0.35	0.4	0.4408
$ALDOX_2$	0	0	0	0	0	0	0
EST_1	0.4211	0.5	0.5789	0.6	0	0	0.35
EST_2	0	0	0	0	0	0	0
EST_3	0.7	1	0.7895	0.7	0.7	0.85	0.7899
G-6-PD	0.7	0.65	0.6	0.6	0.9	0.85	0.7167
HBDH	0	0	0	0	0	0	0
ODH_1	0.45	0.4	0.35	0.35	0.65	0.6	0.4667
ODH_2	0	0	0	0	0	0	0
PGM	0	0	0	0	0	0	0
SOD_1	0.45	0.35	0.55	0.4	0.3	0.25	0.3833
SOD_2	0	0	0	0	0	0	0
XDH	0	0	0	0	0	0	0
เฉลี่ย/โลคัส	0.2613	0.2585	0.27307	0.26209	0.20774	0.21997	
					ค่าเฉลี่ย observed heterozygosity =		0.2471

ตาราง 7 expected heterozygote ของประชากรปู 6 จังหวัด

	อยุธยา	ลพบุรี	สุพรรณบุรี	อ่างทอง	นครปฐม	ปทุมธานี	เฉลี่ย
enzyme	(H_S)	(H_S)	(H_S)	(H_S)	(H_S)	(H_S)	(H_S)
ACP_1	0.48	0.48	0.455	0.48	0.4875	0.4778	0.4767
ACP_2	0	0	0	0	0	0	0
ACP_3	0	0	0	0	0	0	0
AKP	0.455	0.4888	0.48	0.4888	0	0	0.3188
$ALDOX_1$	0.4986	0.4012	0.4778	0.5	0.4388	0.455	0.4619
$ALDOX_2$	0	0	0	0	0	0	0
EST_1	0.4986	0.4742	0.4114	0.48	0	0	0.3107
EST_2	0	0	0	0	0	0	0
EST_3	0.48	0.5	0.5	0.495	0.495	0.4988	0.4948
G-6-PD	0.48	0.4888	0.495	0.495	0.495	0.4888	0.4904
HBDH	0	0	0	0	0	0	0
ODH_1	0.3988	0.375	0.2888	0.2888	0.4688	0.42	0.3733
ODH_2	0	0	0	0	0	0	0
PGM	0	0	0	0	0	0	0
SOD_1	0.4388	0.3988	0.4388	0.375	0.495	0.4888	0.4392
SOD_2	0	0	0	0	0	0	0
XDH	0	0	0	0	0	0	0
เฉลี่ย/โลคัส	0.2194	0.2122	0.2086	0.2119	0.16941	0.1664	
					ค่าเฉลี่ย expected heterozygosity =		0.1980

ตาราง 8 ค่า G_{ST} ของแต่ละ locus และค่า G_{ST} เฉลี่ย

enzyme	H_T	H_S	G_{ST}
ACP_1	0.4961	0.4767	0.0391
ACP_2	0	0	0.0000
ACP_3	0	0	0.0000
AKP	0.4688	0.3188	0.3200
$ALDOX_1$	0.4782	0.4619	0.0341
$ALDOX_2$	0	0	0.0000
EST_1	0.4832	0.3107	0.3570
EST_2	0	0	0.0000
EST_3	0.5000	0.4948	0.0104
G-6-PD	0.4911	0.4904	0.0014
HBDH	0	0	0.0000
ODH_1	0.4644	0.3733	0.1962
ODH_2	0	0	0.0000
PGM	0	0	0.0000
SOD_1	0.4499	0.4392	0.0238
SOD_2	0	0	0.0000
XDH	0	0	0.0000
		G_{ST} เฉลี่ย =	0.0578

ตาราง 9 frequency ของอัลลีล A_1 จากข้อมูลในตาราง 4

enzyme	อยุธยา	ลพบุรี	สุพรรณบุรี	อ่างทอง	นครปฐม	ปทุมธานี
ACP_1	0.4	0.4	0.35	0.4	0.5789	0.6053
ACP_2	1	1	1	1	1	1
ACP_3	1	1	1	1	1	1
AKP	0.35	0.575	0.4	0.425	1	1
$ALDOX_1$	0.4737	0.7222	0.6053	0.5	0.675	0.65
$ALDOX_2$	1	1	1	1	1	1
EST_1	0.4737	0.3864	0.2895	0.4	1	1
EST_2	1	1	1	1	1	1
EST_3	0.6	0.5	0.5	0.45	0.45	0.525
G-6-PD	0.6	0.575	0.55	0.55	0.55	0.575
HBDH	1	1	1	1	1	1
ODH_1	0.275	0.25	0.175	0.175	0.625	0.7
ODH_2	1	1	1	1	1	1
PGM	1	1	1	1	1	1
SOD_1	0.675	0.725	0.675	0.75	0.55	0.575
SOD_2	1	1	1	1	1	1
XDH	1	1	1	1	1	1
รวม $(A_1)^2 = (j_x)$	10.9825	11.3303	10.7714	10.8488	12.9889	13.2158
$j_x/n = J_x$	0.6460	0.6665	0.6336	0.6382	0.7641	0.7774

ตาราง 10 ค่า J_{XY}, ค่า J_X. J_Y, ค่า I, ค่า D

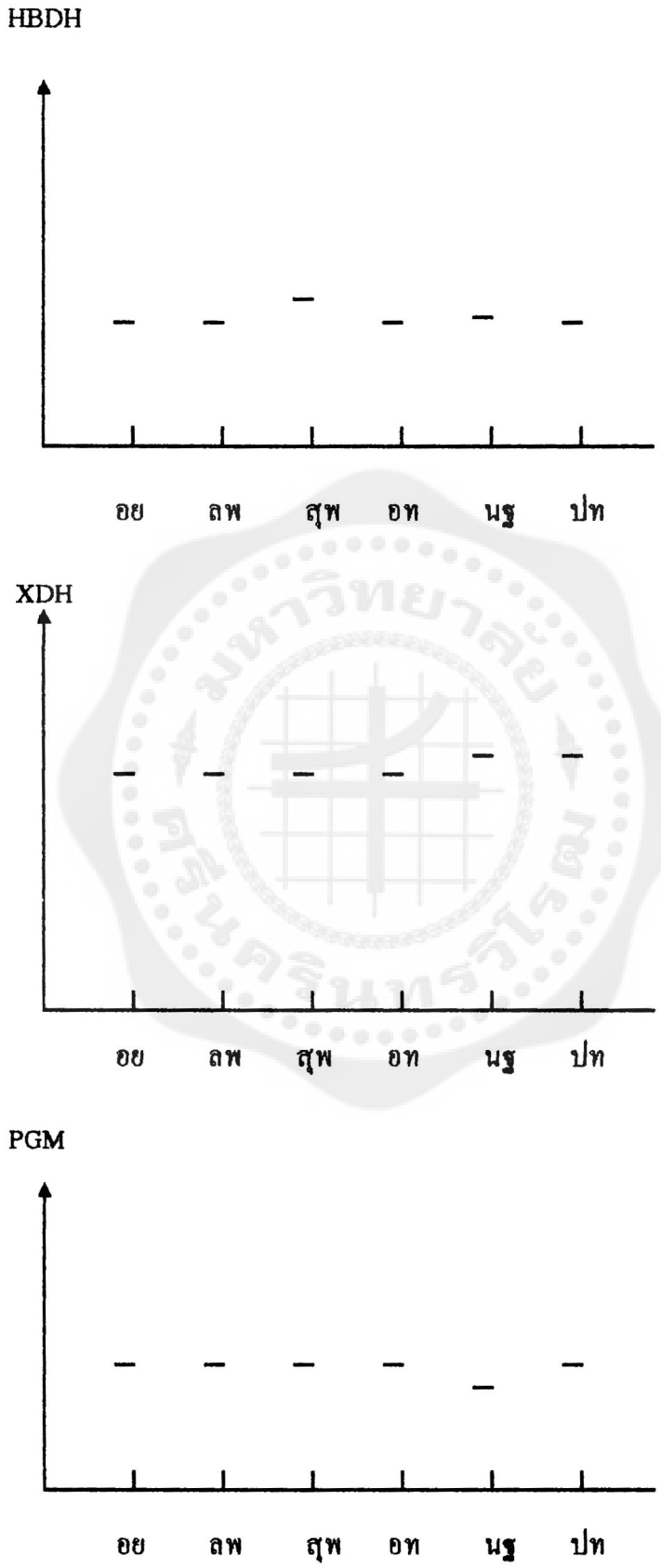
	พระนครศรีอยุธยา					ลพบุรี				สุพรรณบุรี			อ่างทอง		นครปฐม
enzyme	ลพบุรี	สุพรรณ	อ่างทอง	นครปฐม	ปทุมธานี	สุพรรณ	อ่างทอง	นครปฐม	ปทุมธานี	อ่างทอง	นครปฐม	ปทุมธานี	นครปฐม	ปทุมธานี	ปทุมธานี
ACP_1	0.1600	0.1400	0.1600	0.2316	0.2421	0.1400	0.1600	0.2316	0.2421	0.1400	0.2026	0.2119	0.2316	0.2421	0.3504
ACP_2	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
ACP_3	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
AKP	0.2013	0.1400	0.1488	0.3500	0.3500	0.2300	0.2444	0.5750	0.5750	0.1700	0.4000	0.4000	0.4250	0.4250	1.0000
$ALDOX_1$	0.3421	0.2867	0.2369	0.3197	0.3079	0.4371	0.3611	0.4875	0.4694	0.3027	0.4086	0.3934	0.3375	0.3250	0.4388
$ALDOX_2$	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
EST_1	0.1830	0.1371	0.1895	0.4737	0.4737	0.1119	0.1546	0.3864	0.3864	0.1158	0.2895	0.2895	0.4000	0.4000	1.0000
EST_2	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
EST_3	0.3000	0.3000	0.2700	0.2700	0.3150	0.2500	0.2250	0.2250	0.2625	0.2250	0.2250	0.2625	0.2025	0.2363	0.2363
G-6-PD	0.3450	0.3300	0.3300	0.3300	0.3450	0.3163	0.3163	0.3163	0.3306	0.3025	0.3025	0.3163	0.3025	0.3163	0.3163
HBDH	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
ODH_1	0.0688	0.0481	0.0481	0.1719	0.1925	0.0438	0.0438	0.1563	0.1750	0.0306	0.1094	0.1225	0.1094	0.1225	0.4375
ODH_2	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
PGM	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
SOD_1	0.4894	0.4556	0.5063	0.3713	0.3881	0.4894	0.5438	0.3988	0.4169	0.5063	0.3713	0.3881	0.4125	0.4313	0.3163
SOD_2	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
XDH	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
j_{XY}	11.0895	10.8376	10.8895	11.5181	11.6144	11.0184	11.0488	11.7767	11.8580	10.7928	11.3088	11.3842	11.4209	11.4984	13.0954
$J_{XY} = j_{XY}/n$	0.6523	0.6375	0.6406	0.6775	0.6832	0.6481	0.6499	0.6927	0.6975	0.6349	0.6652	0.6697	0.6718	0.6764	0.7703
J_X. J_Y	0.4306	0.4093	0.4123	0.4936	0.5022	0.4223	0.4253	0.5092	0.5181	0.4043	0.4841	0.4926	0.4876	0.4961	0.5940
I	0.9941	0.9964	0.9976	0.9644	0.9640	0.9974	0.9966	0.9708	0.9690	0.9984	0.9561	0.9542	0.9621	0.9603	0.9995
D	0.0059	0.0036	0.0024	0.0363	0.0366	0.0026	0.0034	0.0297	0.0314	0.0016	0.0449	0.0469	0.0386	0.0405	0.0005

ตาราง 11 ค่า Genetic Similarity (I) & Genetic Distance (D)

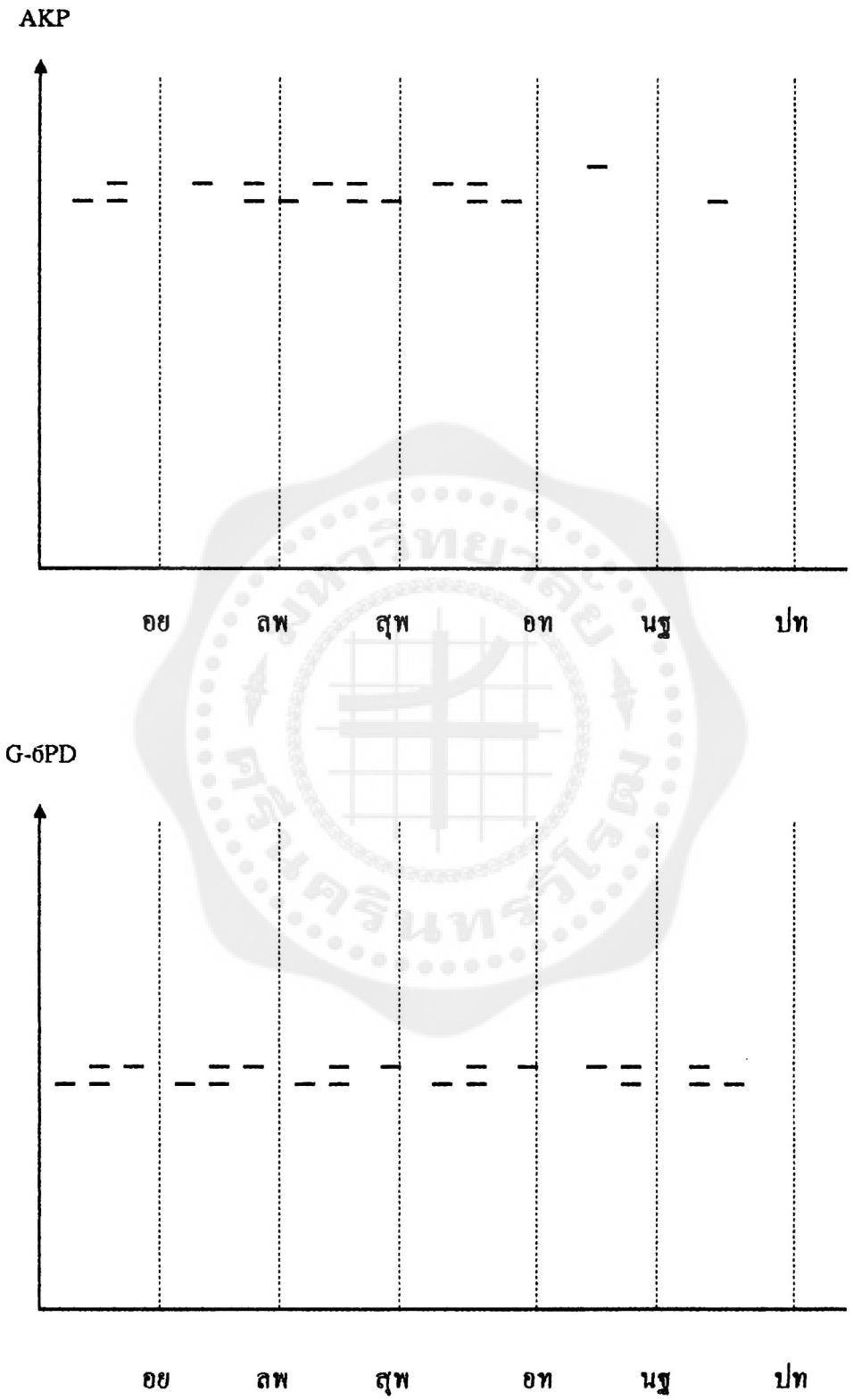
D / I	พระนครศรีอยุธยา	ลพบุรี	สุพรรณบุรี	อ่างทอง	นครปฐม	ปทุมธานี
พระนครศรีอยุธยา	-	0.9941	0.9964	0.9976	0.9644	0.964
ลพบุรี	0.0059	-	0.9974	0.9966	0.9708	0.9690
สุพรรณบุรี	0.0036	0.0026	-	0.9984	0.9561	0.9542
อ่างทอง	0.0024	0.0034	0.0016	-	0.9621	0.9603
นครปฐม	0.0363	0.0297	0.0449	0.0386	-	0.9995
ปทุมธานี	0.0366	0.0314	0.0469	0.0405	0.0005	-

ความหมายของอักษรย่อ

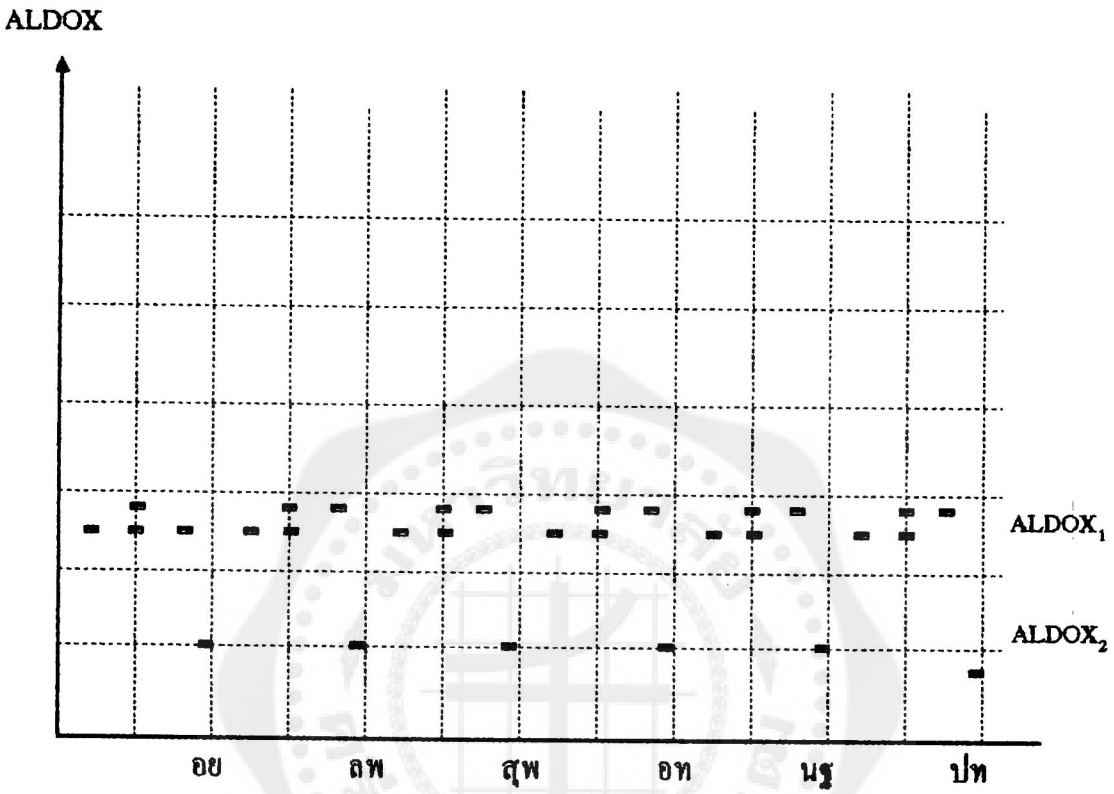
อย	=	พระนครศรีอยุธยา
ลพ	=	ลพบุรี
สุพ	=	สุพรรณบุรี
อท	=	อ่างทอง
นฐ	=	นครปฐม
ปท	=	ปทุมธานี



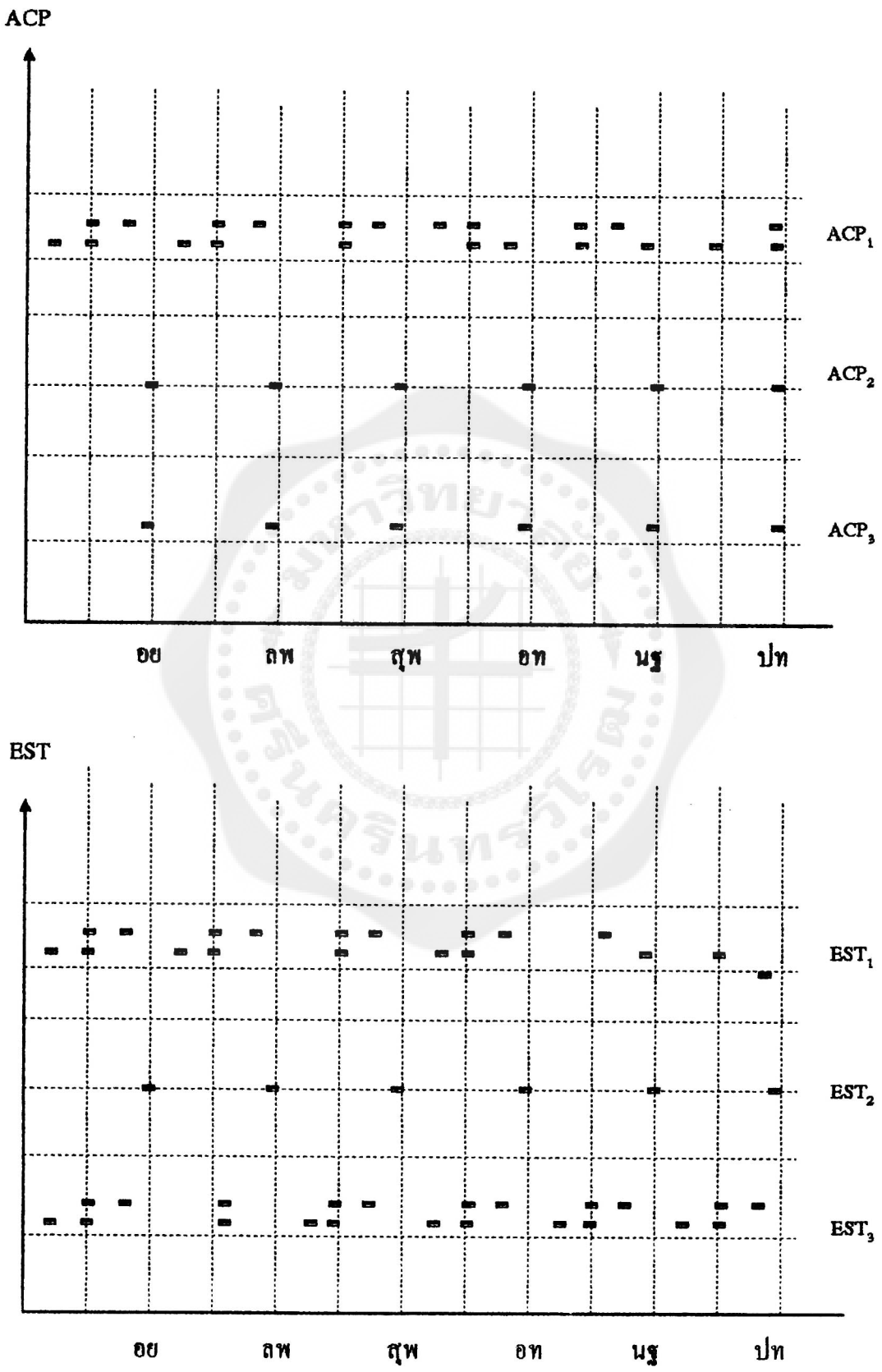
ภาพที่ 1 Electrophoretic mobility ของ XDH, PGM และ HBDH จาก 6 จังหวัด



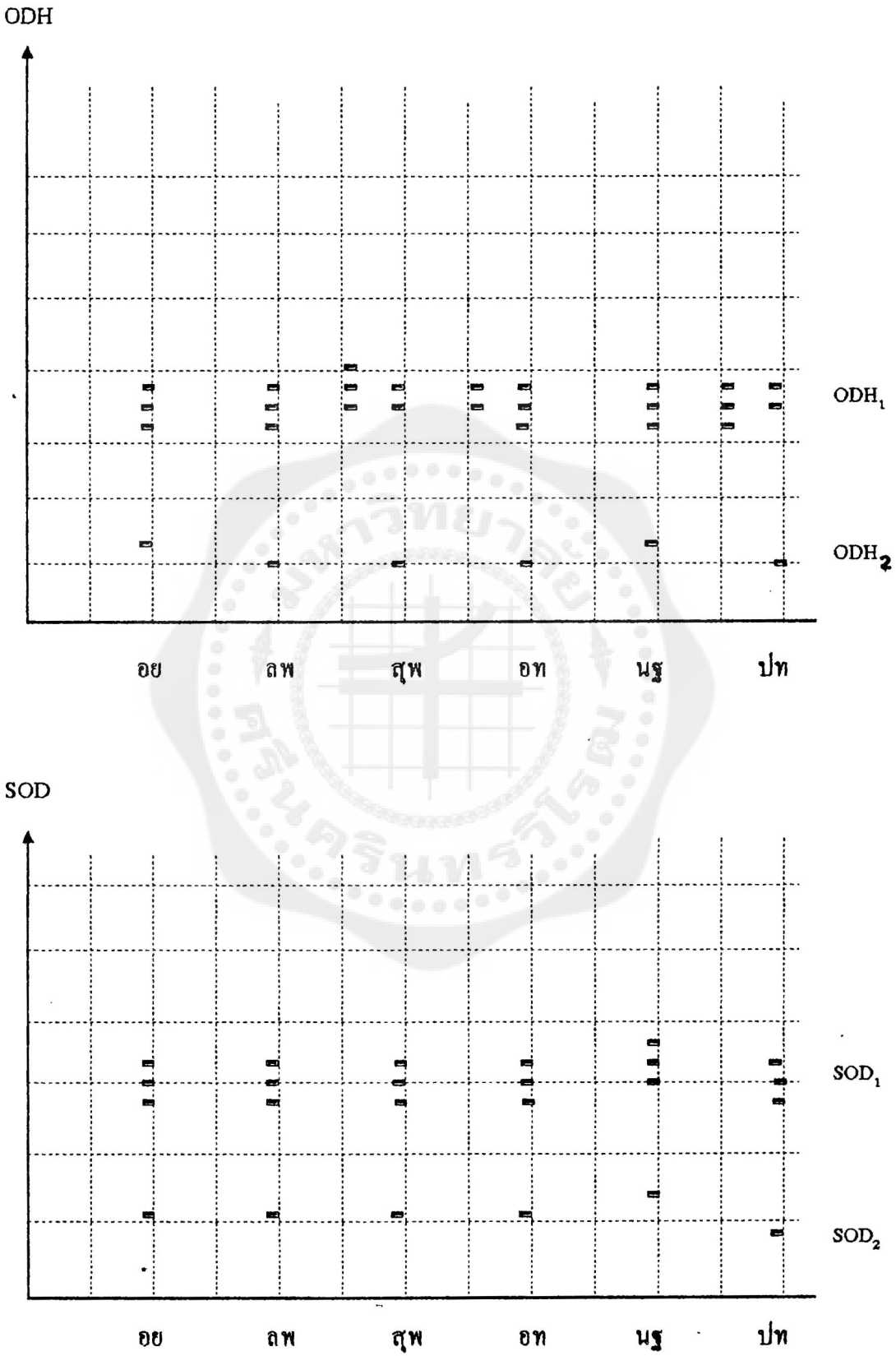
ภาพที่ 2 Electrophoretic mobility ของ AKP และ G-6PD จาก 6 จังหวัด



ภาพที่ 3 Electrophoretic mobility ของ ALDOX จาก 6 จังหวัด



ภาพที่ 4 Electrophoretic mobility ของ ACP, EST จาก 6 จังหวัด



ภาพที่ 5 Electrophoretic mobility ของ ODH และ SOD ใน 6 จังหวัด