ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรปลาเลียหิน (*Garra cambodgiensis*) ในลำน้ำว้า (ลำน้ำสาขาของแม่น้ำน่านตอนบน) จังหวัดน่าน

Genetic variation of wild population Stone lapping minnow (*Garra cambodgiensis*) in the Wa River (tributary of upper Nan River watershed), Nan province

เชาวลีย์ ใจสุข[1*] และ พัชรา นิธิโรจน์ภักดี[2]

Chaowalee Jaisuk[1*] and Patchara Nithirojpakdee[2]

บทคัดย่อ: การจัดการทรัพยากรปลาท้องถิ่นเพื่อการคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางชีวภาพที่แท้จริงควรให้ความสำคัญต่อความหลากหลายถึงระดับพันธุกรรม การศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปลาเลียหินในพื้นที่ลำน้ำว้า (ลำน้ำสาขาของแม่น้ำน่านตอนบน) อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน จากจำนวน 5 กลุ่มตัวอย่างๆ ได้แก่ ลำน้ำว้า 2 กลุ่มตัวอย่าง (WSW และ WPS) และลำน้ำมาง (ลำน้ำสาขาของลำน้ำว้า) 3 กลุ่มตัวอย่าง (MPK, MNK และ MHK) เก็บตัวอย่างกลุ่มละ 48 ตัว โดยเครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง พบว่ามีความหลากหลายภายในประชากรเฉลี่ยดังนี้ จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง (*A*) มีค่าอยู่ระหว่าง 5.80 (WSW)-8.40 (MHK), ค่า effective number of allele (A_e) 3.60 (WSW)-4.65(MNK), allelic richness (A_r) 5.69 (WSW)-8.16 (MHK), ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกต (H_o) 0.622 (WSW)-0.720 (WPS) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้จากการคาดหมาย (H_e) 0.694 (WSW)-0.773 (MPK) ไม่พบการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในทุกกลุ่มตัวอย่าง จากการพบความหลากหลายภายในพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูงในปลาเลียหินเป็นผลมาจากความชุกชุมของปลาและการผสมพันธุ์วางไข่ในช่วงฤดูน้ำหลากลูกพันธุ์ที่เกิดมีโอกาสแพร่กระจายได้กว้าง สำหรับระดับพันธุกรรมที่ค่อนข้างต่ำใน WSW เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ อาจเป็นผลมาจากระยะทางและระดับความสูงของพื้นที่ สำหรับความแตกต่างทางพันธุกรรมไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย AMOVA และค่า F_{st} ในขณะที่แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (UPGMA) แสดงความต่างกันในบางกลุ่มตัวอย่าง ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงสถานการณ์ทางพันธุกรรมของปลาเลียหินในลำน้ำว้ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มสูงและไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่าง

คำสำคัญ: ปลาเลียหิน, ความแปรปรวนทางพันธุกรรม, ไมโครแซทเทลไลท์

Received December 12, 2018

Accepted June 12, 2019

[1] สาขาวิชาประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา วิทยาเขตน่าน
Faculty of Science and Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Lanna Nan Campus, Nan

[2] สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออกวิทยาเขตจันทบุรี
Faculty of Argo-Industrial Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-ok Chanthaburi Campus, Chanthaburi

[*] Corresponding author: chaowalee2009@hotmail.com

ABSTRACT: The management for preserving the local fish biodiversity should be concerned for their genetic diversity. Therefore, the objective of this study was set up for evaluation of the genetic variation of *Garra cambodgiensis* in the Wa River (a tributary of the upper Nan River watershed), Bokluea district, Nan province, Thailand. We examined fin clip of G. cambodgiensis collected from five locations in Wa River, comprising of 2 locations from Wa River (WSW and WPS) and 3 locations from Mang River where is a tributary of Wa River (MPK, MNK and MHK) by collecting 48 samples of each group. Using polymorphic microsatellite 5 loci. Genetic diversity of *G. cambodgiensis* which means each allele per locus (A) ranging from 5.80 (WSW)-8.40 (MHK), effective number of allele (A_e) 3.60 (WSW)-4.65(MNK), allelic richness (A_r) 5.69 (WSW)-8.16 (MHK), the observed heterozygosity (H_o) 0.622 (WSW)-0.720 (WPS) and the expected heterozygosity (H_e) 0.694 (WSW)-0.773 (MPK). The observed genotypes were not significantly departed from the Hardy-Weinberg equilibrium in all samples. We conclusively predicted that there are numerous of *G. cambodgiensis* and they were spawned during the rainy season. Therefore, the juvenile were widely distributed causing high genetic diversity of *G. cambodgiensis*. In addition, the low genetic diversity of the WSW was affected by the distance and altitude as well. The genetic differentiation such as Global F_{st} estimated by the AMOVA and F_{st} were not significantly different. Whereas, the UPGMA also showed that some samples were separated. In conclusion, the *G. cambodgiensis* in the Wa River was in a high genetic diversity and genetic differentiation among these samples were not be able to detect.
Keywords: Stone lapping minnow (*Garra cambodgiensis*), Genetic variation, Microsatellite

บทนำ

การจัดการทรัพยากรธรรมชาติในปัจจุบันมีความมุ่งหมายเพื่อการคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางชีวภาพ และเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน การดำเนินงานเพื่อให้เป็นไปตามเป้าหมายดังกล่าวมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการที่จะต้องอาศัยข้อมูลที่มีความชัดเจนและเป็นประโยชน์ต่อการดำเนินงานจัดการทรัพยากรจึงจะสามารถดำเนินการวางแผนงานเพื่อจัดการทรัพยากรได้อย่างเหมาะสมและเกิดประสิทธิภาพ สำหรับทรัพยากรสัตว์น้ำโดยเฉพาะปลาท้องถิ่นในปัจจุบันการดำเนินงานทั้งโดยภาครัฐและชุมชนมีความพยายามในการจัดการและอนุรักษ์ แต่ยังคงพบว่าทรัพยากรปลาท้องถิ่นมีจำนวนลดลงในแทบทุกแหล่งน้ำรวมทั้งแม่น้ำน่านตอนบน (อมรชัย, 2551) ทั้งนี้สาเหตุการลดลงอาจเกิดได้จากหลายปัจจัยทั้งที่เกิดจากธรรมชาติและกิจกรรมของมนุษย์ที่ส่งผลกระทบต่อแหล่งที่อยู่ แหล่งอาหาร นอกจากนั้นปลาท้องถิ่นยังมีชีววิทยาบางประการที่เป็นข้อจำกัดในการอยู่รอด เช่น การแพร่กระจาย การใช้พื้นที่สำหรับสืบพันธุ์ การแยกออกจากกันของประชากรด้วยระดับความสูงของพื้นที่ ระยะทางระหว่างแหล่งที่อยู่ ซึ่งกระบวนการทางนิเวศวิทยาเหล่านี้มีผลต่อพลวัติประชากรของปลา

การศึกษานี้ให้ความสำคัญต่อข้อมูลพันธุกรรมของปลาท้องถิ่นในแหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่ต้นน้ำของแม่น้ำน่านตอนบน โดยพื้นที่เป้าหมายเป็นบริเวณลำน้ำว้า (ลำน้ำสาขาของแม่น้ำน่านตอนบน) จังหวัดน่าน ซึ่งจัดได้ว่าเป็นลำน้ำสาขาสายสำคัญของแม่น้ำน่านตอนบน และมีความหลากหลายของปลาน้ำจืดอย่างน้อย 43 ชนิด (อมรชัย และเอกชัย, 2553) โดยปลาท้องถิ่นที่ศึกษา คือ ปลาเลียหิน (*Garra cambodgiensis*) มีชื่อท้องถิ่นว่า “ปลามัน” (อมรชัย, 2551) เป็นปลาเขตร้อนขนาดเล็กที่พบกระจายทั่วไปในแม่น้ำน่าน ปัจจุบันปลาเลียหินถูกคุกคามอย่างมากเนื่องจากการลดลงของพื้นที่ป่า ความเสื่อมโทรมของสภาพแวดล้อม การใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ส่งผลกระทบถึงระบบนิเวศแหล่งน้ำและด้วยความนิยมรับประทานปลาชนิดนี้ในฤดูกาลวางไข่เนื่องจากในช่วงฤดูนี้ปลามีความมันมากกว่าปกติทำให้รสชาติของเนื้อปลาอร่อยซึ่งเป็นที่มาของชื่อท้องถิ่น ในช่วงฤดูวางไข่ปลามีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 500-600 บาท ส่งผลให้ปลาเลียหินในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็ว (เชาวลีย์ และคณะ, 2557)

การลดลงอย่างรวดเร็วของประชากรเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร เนื่องจากเมื่อจำนวนประชากรที่สามารถสืบพันธุ์และถ่ายทอด

พันธุกรรมได้ (effective population, N_e) มีจำนวนลดลงมีผลทำให้เกิดการขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) ซึ่งการขาดช่วงทางพันธุกรรมจะพบได้ในกรณีที่ประชากรมีสภาวะคอขวด (bottleneck) และการถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างประชากรมีน้อย ดังที่พบในปลา Brook charr และปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulate*) ประชากรที่อยู่ห่างออกไปจากประชากรอื่นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ (Castric et al., 2001; Barson et al., 2009) นอกจากนั้น Abbas et al. (2010) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างทางพันธุกรรมของปลา Yellowcheek carp (*Elopichthys bambusa*) จำนวน 5 ประชากร ในแม่น้ำ Yangtze มีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลา Yellowcheek carp อยู่ในระดับที่ค่อนข้างต่ำในทุกประชากร และประชากรที่ศึกษาส่วนมากมีโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรและพบการมีปรากฏการณ์ Wahlund's effect และ heterozygote deficits แสดงถึงมีการผสมเลือดชิด การขาดช่วงพันธุกรรม เกิดขึ้นในกลุ่มประชากรเหล่านี้ทั้งนี้การศึกษาดังกล่าวคาดว่าเป็นผลมาจากการลดลงของจำนวน Yellowcheek carp เนื่องจากการจับที่มากเกินไป และในบริเวณแม่น้ำ Yangtze ปลายังถูกล่าแบบผิดวิธี เช่น การระเบิด การใช้ยา การใช้ไฟฟ้าช็อต ปัญหาในเรื่องการขาดแคลนพื้นที่วางไข่ของปลาเนื่องจากการถูกรบกวน ส่งผลกระทบต่อการแพร่พันธุ์ของปลาและต่อเนื่องไปถึงจำนวนประชากรที่จะเจริญเติบโตเป็นวัยเจริญพันธุ์ (N_e)

การศึกษานี้จึงดำเนินงานเพื่อให้ได้ข้อมูลพันธุกรรมของปลาเลียหินโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งเป็นบริเวณบนสายดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุด แต่ละชุดจะประกอบด้วยเบสที่ซ้ำกัน 1-6 เบส มีความหลากหลายสูงสามารถใช้ศึกษาประชากรที่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยได้ดี (Chistiakov et al., 2006) ข้อมูลที่ได้มีความสำคัญต่อการประเมินถึงโอกาสการมีภาวะวิกฤติทางพันธุกรรมและความสามารถในการปรับตัวในระยะยาวของประชากรศักยภาพในการดำรงพันธุ์ของกลุ่มประชากรปลาเลียหินและประโยชน์ในการคัดเลือกแหล่งพันธุ์เพื่อการเพาะพันธุ์แล้วปล่อยคืนธรรมชาติ นอกจากนั้นข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จากปลาชนิดนี้สามารถอนุมานไปถึงระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาท้องถิ่นชนิดอื่นที่มีชีววิทยาใกล้เคียงกับปลาเลียหินได้

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่างภาคสนาม

รวบรวมตัวอย่างปลาเลียหิน (*Garra cambodgiensis*) จากลำน้ำว้าในพื้นที่ อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน ช่วงเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557 จากจำนวน 5 กลุ่มตัวอย่างๆ ได้แก่ ลำน้ำว้า 2 กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ WSW (บ้านสว้าใต้) และ WPS (บ้านผาสุก) และลำน้ำมาง 3 กลุ่มตัวอย่าง (ลำน้ำมางเป็นสาขาของลำน้ำว้า) ได้แก่ MNK (บ้านนาคอก), MPK (บ้านผาคับ) และ MHK (ห้วยก๊วะ) อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน เก็บตัวอย่างกลุ่มละ 48 ตัว (Table 1, Figure 1) รวบรวมตัวอย่างโดย ชาวบ้านในพื้นที่จับปลาด้วยแหและมองปลามัน (เครื่องมือประมงพื้นบ้าน) ใช้ผ้าชุบน้ำช่วยในการจับปลาเพื่อให้ปลานิ่ง สลบปลาโดยใช้น้ำมันกานพลูความเข้มข้น 15 ppm จากนั้นตัดครีบหางขนาด 0.5 เซนติเมตร เก็บรักษาตัวอย่างครีบหางในแอลกอฮอล์ 95 % ก่อนนำมาทำการสกัดดีเอ็นในห้องปฏิบัติการ สำหรับปลาหลังจากตัดครีบ

Table 1 Sampling locations of *Garra cambodgiensis* in Wa River

	Location	Code	Note	Elevation (MSL)
1	Wa River, Sawatai	WSW	Wa River	718
2	Wa River, Phasook	WPS	Wa River	485
3	Mang River, Phakub	MPK	Mang River	627
4	Mang River, Nakok	MNK	Mang River	610
5	Mang River, Huay Kua	MHK	Tributary of Mang River	590

หางจะทายาโพวิโดนไอโอดีนแล้วใส่ลงในถังน้ำรอปลาฟื้นแล้วจึงปล่อยคืนสู่แหล่งน้ำ หากในการรวบรวมตัวอย่างมีปลาตายจะเก็บตัวอย่างใส่ขวดโหลแก้วและรักษาสภาพด้วยแอลกอฮอล์ 95 % แล้วนำกลับไปเก็บไว้ในห้องปฏิบัติการ

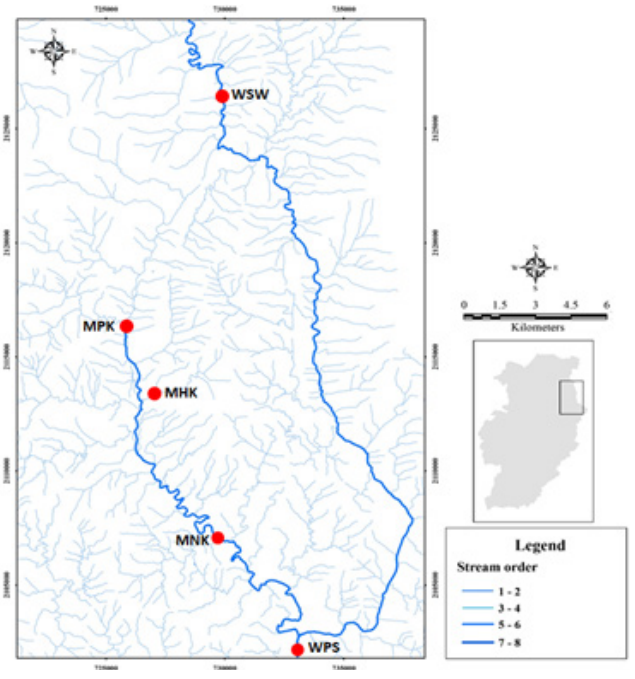

Figure 1 Locations of population samples of Garra cambodgiensis in Wa River (WSW and WPS) and Mang River (MPK, MHK and MNK)

การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Salt extraction ดัดแปลงจากวิธีของ Aljanabi and Martinez (1997) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสจากไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ GC203, GC187 (เชาวลีย์ และคณะ, 2557), GAR3, GAR6 และ GAR13 (Su et al., 2013) **(Table 2)** สารละลายพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นประมาณ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร), 1X บัฟเฟอร์, นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 0.2 มิลลิโมล, แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 1.5 มิลลิโมล, ไพรเมอร์ Forward และ Reverse อย่างละ 0.2 ไมโครโมล และ Taq Polymerase 0.12 ไมโครลิตร (Vivantis; 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) วัฏจักรของการเพิ่มลดอุณหภูมิประกอบไปด้วย 5 วัฏจักร คือ 1. อุณหภูมิที่ทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน (Denaturation) 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ 2. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิที่ไพร์เมอร์มาเกาะกับสายดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับทุกไพร์เมอร์ (annealing temperature; Ta) 54 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิที่ Taq Polymerase สามารถซ่อมสายดีเอ็นเอให้สมบูรณ์เป็นดีเอ็นเอเส้นใหม่ (extension Temperature) 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และ 3. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสผ่าน 6% denaturing polyacrylamide gel ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิสแนวตั้ง (SCIE-PLAS SEQ3341, United

Kingdom) ย้อมดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Silver staining (Promega, USA) และวัดขนาดของอัลลิล (base pair, bp) บนแผ่นเจลทีแต่ละตำแหน่งโดยเทียบกับตำแหน่งที่แน่ชัดของลำดับเบสของ pGEM-3Zf (+) Vector (Promega, USA) บันทึกจีโนไทป์ของตัวอย่าง

Table 2 Descriptions of primer sequences and annealing temperature (Ta) (°C) of microsatellite loci analyzed

Locus name	Primer sequences 5'----> 3'	Ta (°C)	Ref.
GC 203	F : GTTCTCCAGGTGTGGATTTCTC R : AACATACACTCACAGTTTGGCCT	54	(Jaisuk et al., 2014)
GC 187	F : GTGGACTACCTGCTGAGAAACC R : GCGTGGACTAACTTTGCTTTTAG	54	
GAR 3	F : ATTACTGATGCTCCCG R : GTTGCTGCTCTTGTCC	54	
GAR 6	F : GCTTTACCTCCATCGC R : GTCACTCCACCAACCC	54	(Su et al., 2013)
GAR 13	F : ACTCACGCAGACTCGC R : GACTACAGAAATAGGGTT	54	

การวิเคราะห์ข้อมูล

ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรจากค่าจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ (ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้จากการคาดหมาย (H_e) และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกต (H_o) โดยโปรแกรม GenAlEx version 6.1 (Peakall and Smouse, 2006) คำนวณค่า allelic richness (A_r) โดยใช้โปรแกรม FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2001) ทดสอบการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก โดยการประเมินค่า exact p-value ด้วยวิธี markov chain ตามวิธีของ Guo and Thompson (1992) ในโปรแกรม GENEPOP version 4 (Rousset, 2008) และปรับระดับความน่าจะเป็น (*P*-value) สำหรับการใช้ข้อมูลวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple tests) ด้วยวิธี Bonferroni correction (Rice, 1989) วิเคราะห์การมี null allele โดยใช้โปรแกรม Micro Checker version 2.2.3 (Oosterhout et al., 2004) ทดสอบความแตกต่างของระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการทดสอบ Mann-Whitney U วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างประชากรเทียบกับความแปรปรวนภายในประชากร ทดสอบสอบค่าสถิติ ΦST ระหว่างคู่ตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.11 (Excoffier et al., 2006) Genetic differentiation (pairwise F_{st}) ทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลีลของแต่ละประชากรโดย Exact test ตามวิธีของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization = 1000, Batches = 1000, Iterations per batch = 1000) ในโปรแกรม GENEPOP version 4 (Rousset, 2008) และปรับระดับความน่าจะเป็น (*P*-value) สำหรับการใช้ข้อมูลวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple test) ด้วย Bonferroni correction (Rice, 1989) สร้างแผนผังความสัมพันธ์จากค่า F_{st} และค่า Cavalli-Sforza and Edwards chord distance (1967) ที่เกิดจากการสุ่มข้อมูล 1,000 ครั้ง ด้วยวิธี UPGMA แสดงแผนผังในรูปของ

consensus dendrogram ที่มีข้อมูลจากการสุ่มซ้ำแต่ละประชากร สร้างแผนผังด้วย NEIGHBOR และ CONSENSE โดยใช้โปรแกรม PHYLIP version 3.67 (Felsenstein, 1993)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างปลาเลียหิน 5 กลุ่มตัวอย่างที่รวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติใน ลำน้ำว้า ได้แก่ WSW (บ้านสว้าใต้) และ WPS (บ้านผาสุก) และลำน้ำมาง ได้แก่ MNK (บ้านนาคอก), MPK (บ้านผาคับ) และ MHK (ห้วยกั๊วะ) อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน พบผลดังนี้

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

ปลาเลียหิน 5 กลุ่มตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างเฉลี่ย 44.20 (MPK) ถึง 45.80 (MHK) ตัวอย่างต่อกลุ่ม พบความหลากหลายทางพันธุกรรมมีค่าเฉลี่ยดังนี้ จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งมีค่าอยู่ระหว่าง 5.80 (WSW) ถึง 8.40 (MHK), ค่า effective number of allele (A_e) 3.60 (WSW) ถึง 4.65 (MNK), ค่า allelic richness (A_r) 5.69 (WSW) ถึง 8.16 (MHK), ค่าเฮตเทอ โรไซโกซิตี้จากการสังเกต (H_o) 0.622 (WSW) ถึง 0.720 (WPS) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้จากการคาดหมาย (H_e) 0.694 (WSW) ถึง 0.773 (MPK) **(Table 3)** ที่เครื่องหมายทุกตำแหน่งในทุกประชากรไม่เบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (P>0.002, หลังจากปรับ Bonferroni correction = 0.05/ 25) และไม่พบ null allele จากข้างต้นระดับความหลากหลายที่พบในปลาเลียหินในลำน้ำว้า อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูงและใกล้เคียงกับในปลาเลียหินในลำน้ำอื่นๆ ในพื้นที่จังหวัดน่าน ดังการศึกษาของเชาวลีย์ และคณะ (2558) ศึกษาพันธุกรรมปลาเลียหินจากบริเวณลำน้ำกอน (ลำน้ำสาขาของแม่น้ำน่าน) ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง พบมีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง 6.00-10.40, ค่า allelic richness (A_r) 5.90-8.66, ค่า effective number of allele (A_e) 3.91-6.66, ค่า H_o 0.56-0.67, มีค่า H_e 0.73-0.83 นอกจากนั้นระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเลียหินจากการศึกษานี้มีค่าใกล้เคียงกับปลากลุ่ม Garra ในแหล่งน้ำธรรมชาติจากการศึกษาอื่นๆ ดังที่พบในปลา *Garra orientalis* บริเวณ Wanquan River ประเทศจีน จากเครื่องหมายไมโครแซลเทลไลท์ 14 ตำแหน่ง พบ G. orientalis มีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง 8-25 อัลลิล, มีค่า H_o 0.56-1.00, ค่า H_e 0.72-0.96 (Su et al., 2013) เมื่อเปรียบเทียบระดับพันธุกรรมของปลาเลียในการศึกษานี้กับปลาท้องถิ่นชนิดอื่นๆ ในพื้นที่อำเภอบ่อเกลือ พบว่าปลาเลียหินมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าปลาชนิดอื่น ดังรายงานของ เชาวลีย์ และคณะ (2557) ที่เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์ 3 ตำแหน่ง ปลาน้ำหมึก (Barilius pulchellus) มีอัลลิลต่อตำแหน่ง 3-5 อัลลิล, ค่า H_o 0.11-0.80 และค่า H_e 0.11-0.70, ปลาพลวงหิน (*Neolissochilus stracheyi*) มีอัลลิลต่อตำแหน่ง 3 อัลลิล, ค่า H_o 0.49-0.60 และค่า H_e 0.42-0.56 และปลามั่ม (*Scaphiodonichthys acanthopterus*) มีอัลลิลต่อตำแหน่ง 3-13 อัลลิล, มีค่า H_o 0.52 -0.62 และค่า H_e 0.56-0.89 การพบปลาเลียหินมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าปลาท้องถิ่นชนิดอื่นๆ เนื่องจากปลาเลียหินในลำน้ำในเขตพื้นที่อำเภอบ่อเกลือมีความชุกชุมกว่าปลาชนิดอื่นๆ ประกอบกับชีววิทยาการแพร่กระจายของปลาชนิดนี้ที่ผสมพันธุ์วางไข่ช่วงฤดูน้ำหลากพ่อ แม่พันธุ์จะถูกน้ำพัดมารวมกันในบริเวณที่เหมาะสมต่อการวางไข่ซึ่งเป็นบริเวณนาข้าวหรือลำห้วย การที่น้ำพัดพ่อแม่พันธุ์จำนวนมากจากหลายๆ บริเวณมาอยู่รวมกันปลามีโอกาสการถ่ายเทยีนระหว่างกลุ่มประชากรซึ่งส่งผลให้ปลาเลียหินมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (เชาวลีย์ และคณะ, 2557) ดังรายงานของ Braga et al. (2012) ปลา *Mimagonigates microlepis* ในช่วงที่มีน้ำท่วมไหลหลากไข่และตัวอ่อนจะถูกพัดพาไปทางตอนล่างทำให้มีการกระจายพันธุ์ไปทั่วลำน้ำส่งผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติ

สำหรับการพิจารณาระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมในแต่ละกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาพบว่าระดับความหลากหลายภายในแต่ละกลุ่มตัวอย่างไม่ต่างกัน (P>0.05) มีข้อสังเกตที่พบว่า WSW มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรค่อนข้างต่ำกว่ากลุ่มตัวอย่างอื่นคาดว่าเป็นผลมาจากกลุ่มตัวอย่าง WSW อยู่ในแหล่งน้ำที่

ไกลจากปลาเลียหินกลุ่มอื่นเป็นระยะทาง 38.85-47.28 กิโลเมตรและเป็นพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 712 เมตร ปลาเลียหินในบริเวณดังกล่าวจึงมีการอพยพเข้าหรือออกของต่างประชากรน้อย ขาดโอกาสแลกเปลี่ยนพันธุกรรมกับต่างประชากร ซึ่งการพบว่ากลุ่มประชากรที่อยู่ไกลออกไปจากประชากรอื่นมีความหลากหลายภายในประชากรต่ำสามารถพบได้ในปลา *Poecilia reticulata* บริเวณ Caroni Drainage ปลาทางตอนบนของลำน้ำมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าทางตอนล่าง โดยประชากรทางตอนบนมีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง 1.50-2.53 และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ 0.023-0.252 ในขณะที่ประชากรทางตอนล่างมีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง 8.24-11.26 และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ 0.610-0.719 นอกจากนั้นยังพบว่าประชากรทางตอนล่างมีอัตราการอพยพเข้า (immigration) สูงกว่าประชากรทางตอนบน โดยอัตราอพยพเข้าในประชากรทางตอนล่างมีค่าอยู่ระหว่าง 2.51-8.78 ในขณะที่ประชากรทางตอนบนมีค่า 0.337-2.202

Table 3 Average allelic variability at 5 microsatellite loci of Garra cambodgiensis in the Wa River

Sample		WSW	WPS	MHK	MPK	MNK
Average at all loci	N	45.60	45.00	45.80	44.20	45.20
	A	5.80	6.80	8.40	8.00	8.00
	A_e	3.60	4.04	4.33	4.61	4.65
	A_r	5.69	6.70	8.16	7.91	7.92
	H_o	0.622	0.720	0.659	0.704	0.627
	H_e	0.694	0.747	0.761	0.773	0.704
	F_{is}	0.105	0.030	0.136	0.091	0.093
	P	0.178	0.235	0.050	0.180	0.152

The indices included the sample size (N), number of alleles per locus (A), effective number of alleles (A_e), allelic richness (A_r), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), fixation index (F_{is}) (F_{is} values and probability of significant deviationfrom Hardy-Weinberg equilibrium (P) are given for each population and locus.)

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

การทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมพบปลาเลียหินที่ศึกษามีค่า Global F_{st} = 0.08228; AMOVA, P=0.0001 แสดงถึงปลาเลียหินทั้ง 5 กลุ่มตัวอย่างไม่มีความต่างทางพันธุกรรม การทดสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม AMOVA พบว่า 8.23% ของความแปรปรวนเกิดจากความแตกต่างระหว่างประชากร และ 91.77% ของความ

แปรปรวนเกิดจากความแตกต่างระหว่างสมาชิกในประชากร สำหรับการพิจารณาความต่างระหว่างคู่ตัวอย่าง 5 กลุ่ม กลุ่มตัวอย่างแต่ละคู่ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย pairwise F_{st} (จะพบความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P \leq 0.005$ ซึ่งเป็นค่าความน่าจะเป็นที่มีการปรับสำหรับการใช้ข้อมูลวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple tests) ด้วย Bonferroni correction (0.05/10) (Rice, 1989)) โดยพบค่า F_{st} มีค่าน้อยที่สุด 0.0020 ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง WPS กับ MHK และมีค่ามากสุด 0.093 ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง WPS กับ MNK **(Table 4)** สำหรับการทดสอบโดยแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างที่สร้างจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรม Cavalli-Sforza and Edward's distance แสดงให้เห็นว่ากลุ่มตัวอย่าง WPS กับ MHK มีพันธุกรรมคล้ายคลึงกันมากที่สุดสอดคล้องกับค่า F_{st} ในขณะที่กลุ่มตัวอย่าง WSW ต่างกันจากกลุ่มอื่นๆ มากที่สุด **(Figure 2)** ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเป็นผลมาจากการแยกออกจากกันของประชากร ทั้งนี้การแยกออกจากกันของประชากรเป็นผลมาจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม สภาพภูมิศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับโอกาสหรือระดับของมีการถ่ายเทยีน (gene flow) (Frankham et al., 2010) ซึ่งส่วนมากเกิดจากระยะทางระหว่างแหล่งที่อยู่ ดังที่พบในการศึกษานี้กลุ่มตัวอย่าง MPK มีความต่างทางพันธุกรรมกับ MHK น้อย (F_{st} 0.028) เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างมีระยะทางห่างกัน 1 กิโลเมตร และพบว่ากลุ่มตัวอย่างที่อยู่ไกลออกไปมีค่า F_{st} มากขึ้น ดังที่พบในกลุ่มตัวอย่าง WSW กับ WNK มีระยะห่าง 42.97 กิโลเมตร มีค่า F_{st} 0.090, WSW กับ MPK ระยะห่าง 47.28 กิโลเมตร มีค่า F_{st} 0.089 และ WSW กับ MHK ระยะห่าง 46.37 กิโลเมตร มีค่า F_{st} 0.091 สอดคล้องกับรายงานของ Waits et al. (2008) ปลา Central stonerollers (*Campostoma anomalum*) บริเวณ Mill Creek catchment (Ohio, สหรัฐอเมริกา) จากผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมร่วมกับความห่างตามระยะทางพบว่าประชากรทางตอนบนของอ่างเก็บน้ำมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับประชากรทางตอนล่างซึ่งแสดงถึงความต่างทางพันธุกรรมเป็นผลมาจากระยะทางที่ห่างกัน Lamphere and Blum (2012) ปลา *Cottus bairdi* จากบริเวณ Nantahala River (North Carolina, สหรัฐอเมริกา) ประชากรในแต่ละแหล่งมีความต่างทางพันธุกรรมมากตามระยะทางที่เพิ่มขึ้น Meeuwig et al. (2010) ศึกษาถึงสภาพพื้นที่มีผลต่อความต่างทางพันธุกรรมของปลา Bull trout (*Salvelinus confluentus*) บริเวณ Glacier National Park (Montana, สหรัฐอเมริกา) โดยวิธีการจำลองสภาพพื้นที่พิจารณาร่วมกับข้อมูลทางพันธุกรรมของปลา ผลพบว่าความต่างทางพันธุกรรม (ค่า F_{st}) ของปลา Bull trout เพิ่มขึ้นตามระยะทางโดยที่ระยะทางเพิ่มขึ้น 1 กิโลเมตร ค่า F_{st} เพิ่มขึ้นจาก 0.002 เป็น 0.003

Table 4 Pairwise F_{ST} values (lower diagonal) and geographic distance (km) (upper diagonal) among *Garra cambodgiensis* population samples in the Wan River

	WSW	WPS	MHK	MPK	MNK
WSW		38.85	46.37	47.28	42.97
WPS	0.056		13.52	14.43	9.97
MHK	0.051	0.020		1.00	3.55
MPK	0.051	0.034	0.028		4.46
MNK	0.090	0.093	0.091	0.089	

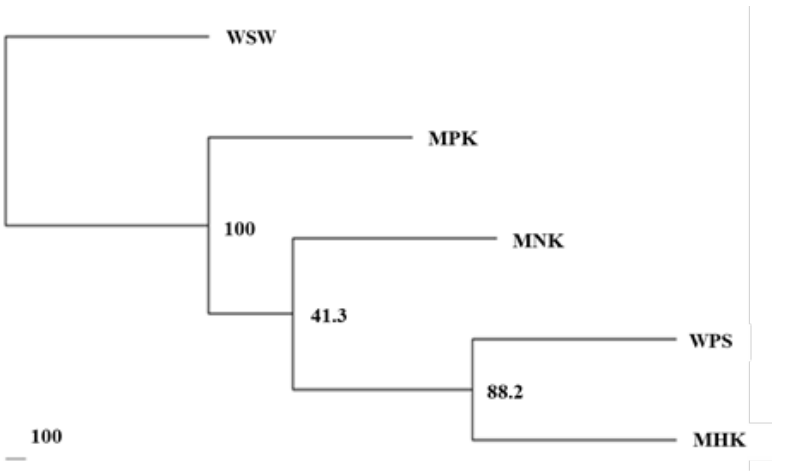

Figure 2 Dendrogram of five population samples of *Garra cambodgiensis* in the Wa River.

จากผลการศึกษาถึงระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมและความต่างทางพันธุกรรมของปลาเลียหินช่วยให้ทราบข้อมูลสถานการณ์ทางพันธุกรรมของประชากรปลาเลียหินในแหล่งน้ำธรรมชาติโดยพบว่าปลาเลียหินมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มค่อนข้างสูงและไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งจากการศึกษาผลข้างต้นมีข้อสังเกตจากการพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปลาเลียหินในพื้นที่ศึกษาได้รับผลมาจากสภาพพื้นที่ของแหล่งที่อยู่ของปลาในแต่ละกลุ่มตัวอย่างแสดงถึงการลดลงของจำนวนประชากรปลาหรือการเปลี่ยนแปลงสภาพแหล่งที่อยู่มีผลต่อพันธุกรรมของปลาในธรรมชาติ ซึ่งหากพบการถดถอยทางพันธุกรรมเกิดขึ้นในปลาธรรมชาติการจัดการทรัพยากรโดยการช่วยเพิ่มจำนวนประชากรในแหล่งน้ำธรรมชาติหรือการปรับปรุงคุณภาพแหล่งที่อยู่ให้ดีขึ้นจะเป็นแนวทางที่จะช่วยดูแลทรัพยากรได้ (Frankham et al., 2010) ข้อมูลที่ได้เป็นประโยชน์ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและการวางแผนฟื้นฟูประชากรเพื่อช่วยในการตัดสินใจเลือกแหล่งพันธุกรรมเพื่อดำเนินงานเพาะพันธุ์แล้วปล่อยลูกคืนธรรมชาติเพื่อการอนุรักษ์ปลาท้องถิ่นทั้งทางปริมาณและการคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากการเพาะพันธุ์ปลาเพื่อนำลูกปลาที่ได้ไปปล่อยคืนสู่ธรรมชาติปลาที่จะปล่อยลงสู่ธรรมชาติต้องมีพันธุกรรมคล้ายคลึงกับประชากรธรรมชาติมากที่สุดเพื่อไม่ให้แหล่งพันธุกรรมตามธรรมชาติเปลี่ยนแปลงเมื่อเกิดการผสมพันธุ์กับประชากรใหม่ (อุทัยรัตน์, 2543)

สรุป

จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างปลาเลียหิน ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง พบว่า

1. กลุ่มตัวอย่างปลาเลียหินในพื้นที่ลำน้ำว้า (ลำน้ำสาขาของแม่น้ำน่านตอนบน) ทั้ง 5 กลุ่มมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มไม่ต่างกันทางสถิติ โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบค่อนข้างสูง คาดว่าเป็นผลมาจากความชุกชุมของปลาชนิดนี้ในพื้นที่อำเภอบ่อเกลือและการมีโอกาสถ่ายเทยีนระหว่างประชากรเนื่องจากช่วงเวลาของการผสมพันธุ์เกิดขึ้นในฤดูน้ำหลากพ่อแม่พันธุ์ถูกน้ำพัดมาอยู่รวมกันเพื่อผสมพันธุ์วางไข่

2. ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้ง 5 กลุ่ม มีความต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงถึงปลาเลียหินในการศึกษานี้ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม

3. การพบกลุ่มตัวอย่าง WSW มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มที่ค่อนข้างต่ำและมีความต่างทางพันธุกรรมจากกลุ่มตัวอย่างอื่นๆ คาดว่าเป็นผลมาจากกลุ่มตัวอย่าง WSW อยู่ในแหล่งน้ำที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลที่ค่อนข้างสูงและไกลจากปลาเลียหินกลุ่มอื่น

ข้อเสนอแนะ

1. ระดับพันธุกรรมปลาท้องถิ่นในแหล่งน้ำธรรมชาติในการศึกษาเป็นระดับพันธุกรรมที่มีความหลากหลายและไม่มีความต่างทางพันธุกรรม แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมหรือสภาพพื้นที่อาจส่งผลต่อพันธุกรรมปลาท้องถิ่นได้ในอนาคตจึงควรมีการติดตามระดับพันธุกรรมอย่างต่อเนื่อง

2. การศึกษาในอนาคตควรนำข้อมูลทางพันธุกรรมวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลเชิงพื้นที่เพื่อสร้างความเข้าใจถึงผลของสภาพพื้นที่ต่อความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมประชากร

เอกสารอ้างอิง

เชาวลีย์ ใจสุข, อมรชัย ล้อทองคำ, จุลทรรศน์ คีรีแลง และสุภาวดี ศรีแย้ม. 2557. การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมปลาท้องถิ่นบางชนิดในแม่น้ำน่าน. Rajabhat journal of science, humanities & social sciences. 15: 12-22.

เชาวลีย์ ใจสุข, อมรชัย ล้อทองคำ และมุทิตา วงศ์สงคราม. 2558. การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรปลาเลียหิน (*Garra cambodgiensis*) บริเวณลำน้ำกอน (ลำน้ำสาขาของแม่น้ำน่าน) โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์เพื่อการจัดการและการอนุรักษ์. รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนาน่าน.

อมรชัย ล้อทองคำ. 2551. ความหลากชนิดของปลาในลุ่มน้ำน่าน (ระบบแม่น้ำเจ้าพระยา) ในเขตจังหวัดน่าน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อมรชัย ล้อทองคำ และเอกชัย ดวงใจ. 2553. ความหลากชนิดของปลาในลุ่มแม่น้ำว้า (แม่น้ำสาขาของลุ่มแม่น้ำน่านตอนบน) ในเขตอำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน. น. 426-481. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48. 3-5 กุมภาพันธ์ 2553.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2543. พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Abbas, K., X. Zhou, Y. Li, Z. Gao, and W. Wang. 2010. Microsatellite diversity and population genetic structure of yellowcheek, *Elopichthys bambusa* (Cyprinidae) in the Yangtze River. Biochemical Systematics and Ecology. 38: 806-812.

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

Barson, N. J., J. Cable, and C. V. Oosterhout. 2009. Population genetic analysis of microsatellite variation of guppies (*Poecilia reticulata*) in Trinidad and Tobago: evidence for a dynamic source-sink metapopulation structure, founder events and population bottlenecks. Evolution Biology. 22: 485-497.

Braga, R. R., R. M. Braga, and S. R. J. Vitule. 2012. Population structure and reproduction of *Mimagoniates microlepis* with a new hypothesis of ontogenetic migration: implications for stream fish conservation in the Neotropics. Environmental Biology of Fishes. 96: 21-31.

Chistiakov, D. A., B. Hellemans, and A. M. Volckaert. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. Aquaculture. 255: 1-29.

Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin (Version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 47-50.

Felsenstein, J. 1993. PHYLYP (phylogeny inference package) version 3.5c. University of Washington, Seattle.

Frankham, R., J. D. Ballou, and D.A. Briscoe. 2010. Introduction to conservation genetics. Cambridge University press, New York, United Kingdom.

Freeland, J. R. 2005. Molecular Ecology. John Wiley & Sons, Ltd., England.

Guo, S. W, and E. A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. Biometrics. 48: 361-372.

Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indice (version2.9.3)(Computer software). Lausanne University, Lausanne, Switzerland.

Lamphere, A. B, and J. M. Blum. 2012. Genetic estimates of population structure and dispersal in a benthic stream fish. Ecology of Freshwater Fish. 21: 75-86.

Meeuwig, H., C. Guy., T. S. Kalinowski, and A. W. Fredenberg. 2010. Landscape influences on genetic differentiation among bull trout populations in a stream-lake network. Molecular Ecology. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04655.x

Osborne, M. J., E. W. Carson, and T. F. Turner. 2012. Genetic monitoring and complex population dynamics: insights from a 12-year study of the Rio Grande silvery minnow. Evolutionary Applications. 1752-4571.

Oosterhout, C.R., W. F. Hutchinson., D. P. M. Will, and P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes. 4: 535-538.

Peakall, R, and P. E. Smouse. 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: 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.

Su, W. L., Z. Z, Liu., T. C. Wang., Z. Zhen., Y. A. Liu., Q. W. Tang, and Q. J. Yang. 2013. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the fish *Garra orientalis* (oriental sucking barb). Conservation Genet Resource. 5: 231-233.

Waits, R. E., J. M. Bagley., J. M. Blum., H. F. Mccormick, and M. J. Lazorchak. 2008. Source-sink dynamics sustain central stonerollers (*Campostoma anomalum*) in a heavily urbanized catchment. Freshwater Biology. 53: 2061-2075.