

การศึกษาเบื้องต้นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมในประชากรม้าน้ำแคระ (*Hippocampus mohnikei*) : ความเป็นไปได้ของชนิดซ่อนเร้น

A Preliminary Study of Genetic Differentiation in the Japanese Seahorse (*Hippocampus mohnikei*) Populations: a Possibility of Cryptic Species

ทรรดิน ปณิธานะรักษ์ และ รติมา คารุวรรณเจริญ

Thadsin Panithanarak and Ratima Karuwanjaroen

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

Institute of Marine Science, Burapha University

Received : 4 September 2018

Revised : 3 January 2019

Accepted : 13 January 2019

บทคัดย่อ

ม้าน้ำแคระ (*Hippocampus mohnikei*) เคยถูกรายงานว่าพบเฉพาะในญี่ปุ่น แต่ปัจจุบันพบแพร่กระจายในหลายประเทศของทวีปเอเชีย เช่น อินเดีย สิงคโปร์ ไทย กัมพูชา มาเลเซีย และเวียดนาม ซึ่งอาจทำให้การแลกเปลี่ยนยีนระหว่างประชากรที่อยู่ห่างกันลดน้อยลงไป จนเกิดความแตกต่างระหว่างประชากรได้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรและระยะห่างทางพันธุกรรมของประชากรที่พบในอ่าวไทย เปรียบเทียบกับประชากรที่พบในน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน โดยการวิเคราะห์ลำดับทางพันธุกรรมบริเวณ cytochrome *b* ขนาด 702 คู่เบส การศึกษาลำดับทางพันธุกรรมของประชากรในอ่าวไทย (2 haplotypes, $n = 6$, หาดบางแสน จ. ชลบุรี) เปรียบเทียบกับน่านน้ำญี่ปุ่น (2 haplotypes, $n = 3$) และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน (29 haplotypes, $n = 50$, Yangmadao และ Laizhouwan) พบว่าประชากรจากอ่าวไทยแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมกับประชากรที่พบในน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนอย่างมีนัยสำคัญ (F_{ST} , $P < 0.05$) พบความผันผวนทางพันธุกรรมสูงระหว่างสองกลุ่มประชากร (63.89%, $P < 0.0001$) ระยะห่างทางพันธุกรรม (Kimura 2-parameter) ระหว่างประชากรอ่าวไทยกับชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนและอ่าวไทยกับน่านน้ำญี่ปุ่นมีค่าสูง (13.54-14.46 % และ 14.42-14.79 % ตามลำดับ) เทียบเท่ากับระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างม้าน้ำต่างชนิดกัน ผลการศึกษาทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าประชากรอ่าวไทยแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจนและมีโอกาสเกิดชนิดซ่อนเร้นขึ้นในเขตแพร่กระจายของประชากรม้าน้ำแคระ การศึกษาเพิ่มเติมทางอณูพันธุศาสตร์ร่วมกับฐานฐานวิทยาจึงมีความสำคัญในการจำแนกชนิดม้าน้ำแคระในประเทศไทย

คำสำคัญ : ม้าน้ำแคระ, *Hippocampus mohnikei*, ระยะห่างทางพันธุกรรม, อ่าวไทย

*Corresponding author. E-mail : thadsin@buu.ac.th

Abstract

The Japanese seahorse (*Hippocampus mohnikei*) had been confirmed to present only in Japan, although recently its range has greatly expanded to many countries in Asia such as India, Singapore, Thailand, Cambodia, Malaysia, and Vietnam. This could possibly reduce gene flow between distant populations, allowing differentiation to occur. Therefore, this study aimed to investigate levels of genetic differentiations, population genetic structure and genetic distances among the populations found in the Gulf of Thailand, Japanese waters and North China's coast based on cytochrome *b* sequence analyses (702 bp). The analyses of the Gulf of Thailand sequences (2 haplotypes, $n = 6$, Bangsaen Beach, Chonburi Province) compared with Japanese waters (2 haplotypes, $n = 3$) and North China's coast (29 haplotypes, $n = 50$, Yangmadao and Laizhouwan) suggested that the population in the Gulf of Thailand was significantly different from those in Japan and North China's coast (F_{ST} , $P < 0.05$). High genetic variance was observed among the 2 population groups (63.89%, $P < 0.0001$). Genetic distances (Kimura 2-parameter) between the populations from the Gulf of Thailand and North China's coast, and those from the Gulf of Thailand and Japan were high (13.54-14.46 % and 14.42-14.79 %, respectively), similar to the distances observed between species. This suggests genetically distinct population in the Gulf of Thailand and the possibility of cryptic species within *H. mohnikei* population range. More studies based on both genetic and morphological data are important to correctly identify the Japanese seahorse found in Thai waters.

Keywords : Japanese seahorse, *Hippocampus mohnikei*, genetic distance, Gulf of Thailand

บทนำ

ม้าน้ำแคระ (*Hippocampus mohnikei*) เป็นม้าน้ำที่มีขนาดเล็ก มีขนาดลำตัวยาวประมาณ 5-8 เซนติเมตร มักพบในบริเวณชายฝั่ง ปากแม่น้ำ และบริเวณแหล่งหญ้าทะเลซึ่งมีความลึกตั้งแต่ 0-10 เมตร (Lourie *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบม้าน้ำแคระในบริเวณป่าชายเลน ฟาร์มหอยนางรมและหอยแมลงภู่ รวมถึงพบอาศัยอยู่ร่วมกับม้าน้ำชนิดอื่น ได้แก่ ม้าน้ำดำ (*H. kuda*) ม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*) ม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*) และปลาจิ้มฟันจระเข้ในสกุล *Trachyrhampus*, *Acentronura* และ *Halicampus* (Yagi *et al.*, 2011; Laksanawimol *et al.*, 2013; Lipton & Thangaraj, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Aylesworth *et al.*, 2016) ในอดีตมีการรายงานว่าม้าน้ำแคระพบเฉพาะในประเทศญี่ปุ่น และคาดว่าจะมีการแพร่กระจายลงไปยังบริเวณทะเลจีนใต้และอ่าวไทย (Lourie *et al.*, 1999; 2004) ปัจจุบันมีการรายงานการพบม้าน้ำแคระเพิ่มเติมในหลายพื้นที่ ได้แก่ บริเวณชายฝั่งของอ่าว Palk Bay ทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศอินเดีย (Thangaraj & Lipton, 2007) ประเทศสิงคโปร์ (Lim, 2013) บริเวณชายฝั่งทางตะวันตกของคาบสมุทรมลายู ได้แก่ Kuala Gula, Sepentang และปีนัง ประเทศมาเลเซีย เกาะลิบงและเกาะพระทอง ในบริเวณทะเลอันดามันของประเทศไทย (Aylesworth *et al.*, 2016) นอกจากนี้ม้าน้ำแคระยังพบในบริเวณเมือง Sep และจังหวัดกำปอต (Kampot) ประเทศกัมพูชา บริเวณชายฝั่งทางตะวันออกของอ่าวไทย และเกาะฟูก็อก (Phu Quoc) ประเทศเวียดนาม (Aylesworth *et al.*, 2016) ผลการวิเคราะห์ขอบเขตและการแพร่กระจายของม้าน้ำแคระโดยใช้ข้อมูลที่ได้มีการสำรวจและตีพิมพ์ตั้งแต่แรกเริ่มจนถึงปัจจุบัน

(Aylesworth *et al.*, 2016) พบว่าม้าน้ำแควะมีการแพร่กระจายตั้งแต่อ่าว Mannar ประเทศอินเดียไปจนถึงชายฝั่งของทะเลอันดามัน ลงไปถึงประเทศสิงคโปร์ และพบแพร่กระจายทั่วทั้งอ่าวไทยขึ้นไปจนถึงตอนเหนือของเกาะฮอนชู ประเทศญี่ปุ่น

การขยายขอบเขตการแพร่กระจายของม้าน้ำแควะจากที่เคยระบุไว้ในอดีต ส่งผลต่อความเป็นไปได้ของการแยกกลุ่มประชากรออกเป็นประชากรย่อย โดยปกติแล้วประชากรย่อยจะมีการผสมพันธุกันภายในกลุ่มและอาจมีการผสมพันธุ์ข้ามกลุ่มประชากรบ้างหรืออาจจะไม่มีเลย การผสมพันธุ์ข้ามกลุ่มประชากรทำให้เกิดโอกาสในการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างประชากรย่อย ซึ่งถ้ามีการแลกเปลี่ยนยีนมากประชากรก็จะแตกต่างกันน้อย ถ้ามีการแลกเปลี่ยนยีนน้อยหรือไม่มีเลยประชากรก็จะแตกต่างกันมาก นอกจากนี้แล้วระยะห่างระหว่างประชากรยังเป็นอุปสรรคต่อการผสมพันธุ์และการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างประชากรที่อยู่ห่างไกลกัน เมื่อโอกาสในการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างประชากรลดลงหรือไม่มีเลยประชากรก็จะแตกต่างกันมาก เช่น ในกรณีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างม้าน้ำแควะจากประเทศญี่ปุ่นและเวียดนาม จากการเปรียบเทียบลำดับทางพันธุกรรมในบริเวณยีน cytochrome oxidase subunit I (COI) ขนาด 648 คู่เบส ของตัวอย่างม้าน้ำแควะจากประเทศญี่ปุ่นและเวียดนาม พบความแตกต่างทางพันธุกรรมประมาณ 2.25% (BOLD, 2016) ในขณะที่ความแตกต่างของลำดับทางพันธุกรรมบริเวณยีน cytochrome *b* ขนาด 780 คู่เบส ระหว่างประชากรจากชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนมีค่าเท่ากับ 0.35% (Zhang *et al.*, 2014) ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับประชากรในธรรมชาติของม้าน้ำแควะ มีเพียงการสำรวจการใช้ประโยชน์จากม้าน้ำแควะทั้งโดยตั้งใจ เช่น การดำน้ำจับเพื่อนำไปขายให้กับผู้ที่ต้องการเลี้ยงเพื่อความสวยงาม และไม่ตั้งใจ เช่น ม้าน้ำแควะที่ติดมากับเครื่องมือประมง มีการนำไปขายต่อในรูปแบบม้าน้ำตากแห้งเพื่อเป็นเครื่องประดับ และเป็นส่วนผสมในการปรุงยาจีน (Aylesworth *et al.*, 2016) ในประเทศไทย ม้าน้ำแควะเป็นชนิดหนึ่งที่พบในการค้าขายภายในประเทศ โดยพบเป็นชนิดเด่นซึ่งมีสัดส่วนถึง 75.75% ของจำนวนม้าน้ำทั้งหมดในการซื้อขายม้าน้ำมีชีวิตให้กับตลาดปลาสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำในท้องถิ่น (Laksanawimol *et al.*, 2013) นอกจากนี้แล้วแหล่งที่อยู่อาศัยที่สำคัญของม้าน้ำแควะ เช่น แหล่งหญ้าทะเลและป่าชายเลน ยังถูกบุกรุกทำลายจนมีจำนวนลดลงซึ่งเป็นผลกระทบจากการกระทำของมนุษย์ ในอดีตมีการรายงานการลดจำนวนของม้าน้ำแควะในหลายประเทศ มีการคาดการณ์ว่าประชากรม้าน้ำแควะมีจำนวนลดลงอย่างน้อย 30% ในช่วงเวลา 10 ปีที่ผ่านมา (Pollom, 2017) และมีแนวโน้มว่าการลดจำนวนของประชากรม้าน้ำแควะจะคงดำเนินต่อไปในอนาคต ดังนั้นม้าน้ำแควะจึงจัดเป็นม้าน้ำอีกชนิดหนึ่งที่เกือบอยู่ในข่ายใกล้การสูญพันธุ์ (Vulnerable) ตามบัญชีแดงไอยูซีเอ็น (IUCN Red List) (Pollom, 2017)

จากสถานภาพของม้าน้ำแควะในปัจจุบันที่มีจำนวนลดลงอย่างเห็นได้ชัดและมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ แม้ว่าในปัจจุบันจะมีข้อมูลยืนยันว่าม้าน้ำแควะมีขอบเขตและการแพร่กระจายครอบคลุมในหลายประเทศของทวีปเอเชีย ซึ่งบ่งบอกถึงความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ยังอยู่ในระดับต่ำ (Dulvy *et al.*, 2003) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมหรือการเกิดโครงสร้างพันธุศาสตร์ (genetic structure) ในเขตแพร่กระจายของประชากรม้าน้ำแควะ ข้อมูลโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของม้าน้ำแควะมีความสำคัญและจำเป็นต่อการกำหนดแนวทางในการอนุรักษ์และจัดการกับประชากรเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นโดยใช้ข้อมูลลำดับทางพันธุกรรมบริเวณยีน cytochrome *b* ในไมโทคอนเดรียของม้าน้ำแควะที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ ได้แก่ ม้าน้ำแควะของอ่าวไทย (Panithanarak, 2015) น่านน้ำญี่ปุ่น (Casey *et al.*, 2004) และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน (Zhang *et al.*, 2014) มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินพันธุศาสตร์ประชากรของม้าน้ำแควะเบื้องต้น โดยการตรวจสอบระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม โครงสร้างพันธุศาสตร์

ประชากร และระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรม้าน้ำแคระที่พบในอ่าวไทย เปรียบเทียบกับประชากรจากน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาข้อมูลลำดับทางพันธุกรรม

ข้อมูลลำดับทางพันธุกรรมของม้าน้ำแคระบริเวณยีน cytochrome *b* (cytb) ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ ข้อมูลลำดับทางพันธุกรรมของม้าน้ำแคระที่พบในอ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่น และบริเวณชายฝั่งทางตอนเหนือของประเทศจีน ข้อมูลลำดับทางพันธุกรรมของม้าน้ำแคระที่พบในอ่าวไทยมาจากการศึกษาของ Panithanarak (2015) ข้อมูลลำดับทางพันธุกรรมของม้าน้ำแคระที่พบในน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนได้จากการสืบค้นข้อมูลลำดับทางพันธุกรรมของม้าน้ำแคระบริเวณยีน cytb จากฐานข้อมูล GenBank และเป็นข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือ ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ (Casey *et al.*, 2004 และ Zhang *et al.*, 2014 ตามลำดับ) รายละเอียดของข้อมูลลำดับทางพันธุกรรมที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตารางที่ 1 [ตัวอย่างม้าน้ำแคระจากทุกรายงานการศึกษาในที่นี่ผ่านการจัดจำแนกชนิดว่าเป็นม้าน้ำแคระ (*Hippocampus mohnikei* Bleeker 1853) จากผู้เชี่ยวชาญโดยใช้เอกสารจัดจำแนกชนิดของ Lourie *et al.* (2004)]

ตารางที่ 1 ข้อมูลลำดับทางพันธุกรรมของม้าน้ำแคระบริเวณยีน cytb ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ บริเวณที่พบ (ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนตัวอย่าง) จำนวน haplotypes (H) ชื่อ haplotypes GenBank accession numbers และเอกสารอ้างอิง

บริเวณที่พบ	H	ชื่อ haplotypes	Accession numbers	เอกสารอ้างอิง
อ่าวไทย (n=6) -หาดบางแสน จ. ชลบุรี	2	moh TH1 และ moh TH2	EU179923 และ EU179924	Panithanarak (2015)
น่านน้ำญี่ปุ่น (n=3)	2	JAP.346.7 และ JAP.346.8	AF192688 และ AF192689	Casey <i>et al.</i> (2004)
ชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน (n=50) -Yangmadao (n=30) -Laizhouwan (n=20)	29	HJ1 – HJ29	KC527556 – KC527584	Zhang <i>et al.</i> (2014)

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรม ความแตกต่างทางพันธุกรรม และโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

เปรียบเทียบข้อมูลลำดับทางพันธุกรรมของม้าน้ำแคระที่พบบริเวณอ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้โปรแกรม Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการคำนวณค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (π) โดยใช้โปรแกรม DnaSP 6.12.01 (Rozas *et al.*, 2017) ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ของประชากรโดยการคำนวณค่า pairwise F_{ST} (distance method = Pairwise difference) และตรวจสอบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร (population genetic structure) โดยวิธี AMOVA (A

Molecular Variance Analysis, Michalakis & Excoffier, 1996) ด้วยโปรแกรม Arlequin ver 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005) (distance method = Pairwise difference)

2. ระยะห่างทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ตรวจสอบระยะห่างทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรของอ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน โดยการคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ของ haplotype (pairwise genetic distance, distance measure = Kimura 2-parameter) โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0 beta 10 (Swofford, 2002) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationships) ของประชากรแม่น้ำแควที่พบในอ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนโดยการสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยวิธี neighbor-joining (NJ, Saitou & Nei, 1987) ใช้การตั้งค่าเช่นเดียวกับการคำนวณค่า pairwise genetic distance และยืนยันผลการสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยค่าความเชื่อมั่นทางสถิติจากวิธี bootstrapping จำนวน 1,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0 beta 10 (Swofford, 2002)

ผลการวิจัย

จากการศึกษาข้อมูลลำดับทางพันธุกรรมบริเวณ cytb ขนาด 702 bp ของแม่น้ำแควจำนวน 33 haplotypes (อ่าวไทย 2 haplotypes น่านน้ำญี่ปุ่น 2 haplotypes และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน 29 haplotypes, ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบลำดับทางพันธุกรรมใน 33 haplotype พบว่ามีความแตกต่างกันมาก มีนิวคลีโอไทด์ที่แสดงความแตกต่างกัน 116 ตำแหน่ง ซึ่งเกิดจากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์แบบ transition และ transversion (ภาพที่ 1) ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์มีค่าเท่ากับ 0.02384 ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบภายในประชากรเดียวกันจำนวนตำแหน่งที่แสดงความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ลดลงโดยมีค่าต่ำสุด 2 ตำแหน่ง และสูงสุด 25 ตำแหน่ง ในประชากرن่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนตามลำดับ เช่นเดียวกัน ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบภายในประชากรเดียวกัน โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.00285-0.00570 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรอ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน ได้แก่ จำนวนประชากร (n) จำนวน haplotype (H) จำนวนตำแหน่งที่แสดงความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ (S) และความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ ($\pi \pm SD$)

ประชากร	n	H	S	$\pi \pm SD$
อ่าวไทย	6	2	4	0.00570 \pm 0.00285
น่านน้ำญี่ปุ่น	3	2	2	0.00285 \pm 0.00142
ชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน	50	29	25	0.00513 \pm 0.00051
รวม	59	33	116	0.02384 \pm 0.00895

ความแตกต่างทางพันธุกรรมและโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรที่พบในอ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน โดยการคำนวณค่า population pairwise F_{ST} (distance method: Pairwise difference) พบว่าประชากรจากอ่าวไทยมีความแตกต่างกับประชากรที่พบในน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.015$ และ $P < 0.0001$ ตามลำดับ, ตารางที่ 3) นอกจากนี้แล้ว ประชากรของน่านน้ำญี่ปุ่นยังแสดงความแตกต่างจากประชากรชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.0001$, ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่า population pairwise F_{ST} (distance method: Pairwise difference) (ในตารางซ้าย-ล่าง) และค่า F_{ST} P-value (ในตารางขวา-บน) ที่ได้จากการเปรียบเทียบระหว่างคู่ของประชากรจากอ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน

	อ่าวไทย	น่านน้ำญี่ปุ่น	ชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน
อ่าวไทย	-	0.015	<0.0001
น่านน้ำญี่ปุ่น	0.985	-	<0.0001
ชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน	0.965	0.899	-

จากการตรวจสอบโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของม้าน้ำแควโดยวิธี AMOVA (distance method: Pairwise difference) หรือการเปรียบเทียบความผันผวนทางพันธุกรรม (genetic variance) ระหว่างประชากรที่พบในอ่าวไทย และกลุ่มของประชาน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน โดยแบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 3 ระดับคือ เปรียบเทียบความผันผวนทางพันธุกรรมภายในประชากรเดียวกัน เปรียบเทียบภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มประชากร ผลการศึกษาในตารางที่ 4 พบว่าเปอร์เซ็นต์ของความผันผวนทางพันธุกรรมภายในประชากรเดียวกันมีค่าเท่ากับ 3.46% ($P = 0.337$) ภายในกลุ่มประชากรเดียวกันมีค่าเท่ากับ 32.65% ($P < 0.0001$) และระหว่างกลุ่มประชากรมีค่าเท่ากับ 63.89% ($P < 0.0001$) ผลการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรชี้ให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์ความผันผวนทางพันธุกรรมมาจากความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรมากที่สุด นั่นคือประชากรจากอ่าวไทยมีความแตกต่างจากกลุ่มของประชากรที่พบในน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์ความผันผวนทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรของน่านน้ำญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนมีค่าสูง และประชากรทั้งสองแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 4 โครงสร้างพันธุศาสตร์ของประชากรม้าน้ำแคะจากการตรวจสอบโดยวิธี AMOVA โดยเปรียบเทียบความผันผวนทางพันธุกรรมระหว่างประชากรอ่าวไทย กับกลุ่มประชากรของน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน

ระดับการเปรียบเทียบ	d.f.	% ความผันผวนทางพันธุกรรม	Fixation Indices	P-value
ภายในประชากรเดียวกัน	56	3.46	0.63890	0.337
ภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน	1	32.65	0.96543	<0.0001
ระหว่างกลุ่มประชากร	1	63.89	0.90428	<0.0001

ระยะห่างทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (pairwise genetic distance, distance measure = Kimura 2-parameter) ภายในประชากรของอ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน (ตารางที่ 5) มีค่า 0.57%, 0.29% และระหว่าง 0.14-5.90% ตามลำดับ สำหรับค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างอ่าวไทยกับชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน และอ่าวไทยกับน่านน้ำญี่ปุ่นมีค่าสูง โดยมีค่าระหว่าง 13.54-14.46% และ 14.42-14.79% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ค่าระยะห่างระหว่างประชากรชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนกับน่านน้ำญี่ปุ่นมีค่าต่ำกว่า คือมีค่าระหว่าง 4.42-5.19% (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (pairwise genetic distance, distance measure = Kimura 2-parameter) ภายในประชากรอ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน (ตัวเลขในวงเล็บ) และระหว่างประชากรค่าระยะห่างทางพันธุกรรมแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์

	อ่าวไทย	น่านน้ำญี่ปุ่น	ชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน
อ่าวไทย	(0.57)	14.42-14.79	13.54-14.46
น่านน้ำญี่ปุ่น	-	(0.29)	4.42-5.19
ชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน	-	-	(0.14-5.90)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของประชากรม้าน้ำแคะที่พบในอ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน โดยการสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี neighbor-joining พบแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ดีที่สุดจากวิธีการค้นหาแบบ neighbor-joining จำนวน 100 แผนผัง โดยในที่นี้จะแสดงแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ 50% majority rule consensus (ภาพที่ 2) จากแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า การจัดกลุ่มของ haplotypes แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน กลุ่มแรก คือ haplotypes จากชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนและน่านน้ำญี่ปุ่น กลุ่มที่สอง คือ haplotypes จากอ่าวไทย การจัดกลุ่มนี้มีค่าความเชื่อมั่นทางสถิติสูงจากค่า bootstrap support 100%

วิจารณ์ผลการวิจัย

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรม้าน้ำแคระชี้ให้เห็นว่าม้าน้ำแคระแต่ละประชากร (อ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน) มีความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ ($\pi = 0.00570, 0.00285$ และ 0.00513 ตามลำดับ, ตารางที่ 2) ใกล้เคียงกับความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *cytb* ที่พบในม้าน้ำชนิดอื่นจากรายงานการศึกษาวิวัฒนาการของม้าน้ำ 7 ชนิดที่พบในน่านน้ำไทย (Panithanarak, 2015) เช่น ม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*) ม้าน้ำหางปล้อง (*H. comes*) ม้าน้ำยักษ์ (*H. kelloggi*) และม้าน้ำดำ (*H. kuda*) ($\pi = 0.00249, 0.00292, 0.00404$ และ 0.00639 ตามลำดับ) แต่เมื่อพิจารณาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำแคระทั้งสามประชากรรวมกัน กลับพบว่าม้าน้ำแคระมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *cytb* ของม้าน้ำแคระจากทั้งสามประชากรรวมกัน ($\pi = 2.38\%$, ตารางที่ 2) มีค่ามากกว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *cytb* ของม้าน้ำชนิดอื่นที่พบมีการแพร่กระจายในหลายพื้นที่เช่นเดียวกัน เช่น ม้าน้ำ long-snouted (*H. guttulatus*) และม้าน้ำ short-snouted (*H. hippocampus*) ซึ่งพบแพร่กระจายทั่วทวีปยุโรปและแอฟริกาเหนือ ($\pi = 1.23\%$ และ 1.94% ตามลำดับ, Woodall *et al.*, 2018)

สาเหตุของความแตกต่างทางพันธุกรรม

ประชากรม้าน้ำแคระของอ่าวไทยแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมจากประชากรของน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนสอดคล้องกับการตรวจพบความผันผวนทางพันธุกรรมสูงหรือโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรระหว่างประชากรอ่าวไทยกับกลุ่มของประชกรน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน ความแตกต่างระหว่างประชากรม้าน้ำแคระของอ่าวไทยกับประชกรของน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนน่าจะมีสาเหตุมาจากระยะห่างระหว่างประชกรตามสภาพภูมิศาสตร์ (geographical distance) ความไม่ต่อเนื่องของแหล่งที่อยู่อาศัย และการปรับตัวในท้องถิ่น (local adaptation) เนื่องจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันระหว่างน่านน้ำในเขตร้อน (อ่าวไทย) และเขตอบอุ่น (น่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน) เช่น อุณหภูมิของน้ำทะเล เป็นต้น นอกจากนี้แล้ว ผลการศึกษาที่พบว่าทั้งสามประชกร (อ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอาจอธิบายได้จากการศึกษาทางธรณีวิทยาที่พบว่าทะเลญี่ปุ่น ทะเลบริเวณตะวันออกของจีน และทะเลจีนใต้ (อ่าวไทยเป็นน่านน้ำที่อยู่ในทะเลจีนใต้) เคยแยกออกจากกันในช่วงยุคน้ำแข็ง (Wang, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาทางอนุพันธุศาสตร์โดย Liu *et al.* (2007) ที่พบว่าปลาทะเลบางชนิดมีรูปแบบของวิวัฒนาการในบริบทของภูมิศาสตร์ (phylogeography) สอดคล้องกับการแยกตัวกันของทะเลทั้งสาม ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ในสมัยไพลสโตซีน (Pleistocene, 2.4 ล้านปี-10,000 ปี) น้ำทะเลมีระดับลดลง (120 m จากระดับน้ำทะเลในปัจจุบัน) จนเกิดแผ่นดินหรือสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ (geographical barrier) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการจำกัดการแพร่กระจายและการแลกเปลี่ยนยีนของประชกรม้าน้ำแคระระหว่างน่านน้ำญี่ปุ่น ชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนและอ่าวไทย จนทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชกรทั้งสาม

ระยะห่างทางพันธุกรรมและความเป็นไปได้ของชนิดซ่อนเร้น

ระยะห่างทางพันธุกรรมภายในประชกรของม้าน้ำแคระจากการศึกษานี้ (0.57%, 0.29% และ 0.14-5.90% อ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน ตามลำดับ, ตารางที่ 5) มีค่าอยู่ในช่วงเดียวกับระยะห่างทางพันธุกรรมภายในประชกรจากการศึกษาม้าน้ำ 7 ชนิดที่พบในประเทศไทย (0-1.2%, Panithanarak, 2015) และม้าน้ำ big-belly (*H. abdominalis*) ของประเทศนิวซีแลนด์ (0.5-0.7%, Nickel & Cursons, 2012) ยกเว้นระยะห่างทางพันธุกรรมภายใน

ประชากรทางตอนเหนือของจีนที่มีบางค่ามากกว่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่เคยมีการรายงานในประชากรเดียวกัน [ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในประชากรม้าน้ำส่วนใหญ่มีค่าไม่เกิน 1.1% (Casey *et al.*, 2004)] สำหรับระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรม้าน้ำแคระ ผลการวิเคราะห์โดยภาพรวมพบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรม้าน้ำแคระของอ่าวไทยกับประชากรอื่น มีค่าสูงและมากกว่าค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ในม้าน้ำชนิดอื่น ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างอ่าวไทยกับชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน และอ่าวไทยกับน่านน้ำญี่ปุ่นมีค่าสูง (13.54-14.46% และ 14.42-14.79% ตามลำดับ, ตารางที่ 5) และอยู่ในช่วงเดียวกับค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างม้าน้ำต่างชนิดกัน เช่น การศึกษาม้าน้ำ 7 ชนิดที่พบในน่านน้ำไทย ได้แก่ ม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*) ม้าน้ำแคระ (*H. mohnikei*) ม้าน้ำหางปล้อง (*H. comes*) ม้าน้ำหนามเข็ม (*H. histrix*) ม้าน้ำยักษ์ (*H. kelloggi*) ม้าน้ำดำ (*H. kuda*) และม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*) พบว่าค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างม้าน้ำ 7 ชนิดมีค่าระหว่าง 10.70-19.33% (Panithanarak, 2015) และการศึกษาม้าน้ำหลายชนิดที่พบในเขตอินโด-แปซิฟิกพบว่ามีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดมากกว่า 10% (Casey *et al.*, 2004) สำหรับระยะห่างระหว่างประชากรชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนกับน่านน้ำญี่ปุ่นมีค่าต่ำกว่า (4.42-5.19%) ซึ่งใกล้เคียงกับค่าระยะห่างระหว่างประชากรที่เคยมีการรายงานในม้าน้ำชนิดอื่น เช่น ม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*) ฟิลิปปินส์และเวียดนามมีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง 1.1-3.2% และม้าน้ำ lined (*H. erectus*) อเมริกาเหนือและบราซิลมีระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 5.9% (Casey *et al.*, 2004)

ผลการศึกษาระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร ระยะห่างทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างม้าน้ำแคระที่พบในอ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนมีความสอดคล้องกัน และชี้ให้เห็นว่าประชากรของอ่าวไทยมีพันธุกรรมที่แตกต่างอย่างชัดเจน (genetically distinct population) กับประชากรอื่น ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของอ่าวไทยกับประชากรอื่นมีค่าสูง และใกล้เคียงกับระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างม้าน้ำต่างชนิดกัน แสดงถึงความเป็นไปได้ของชนิดซ่อนเร้น (cryptic species) ในประชากรของอ่าวไทย ชนิดซ่อนเร้น หมายถึง ชนิดที่มีความแตกต่างของลักษณะสัณฐานน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับระดับความแตกต่างและระยะห่างทางพันธุกรรม และเมื่อเปรียบเทียบกับระดับความแตกต่างของสัณฐานในชนิดอื่น (Struck *et al.*, 2018) รายงานการศึกษาล่าสุดโดย Pollom (2017) และ Lourie *et al.* (2016) กล่าวถึงความเป็นไปได้ของชนิดซ่อนเร้นในประชากรม้าน้ำแคระ โดยพบว่าตัวอย่างม้าน้ำแคระที่พบในเขตอินโด-แปซิฟิกแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน เช่น ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างม้าน้ำแคระจากประเทศญี่ปุ่นและเวียดนามมีค่าประมาณ 2.25% จากการเปรียบเทียบลำดับทางพันธุกรรมในบริเวณยีน COI ขนาด 648 คู่เบส (BOLD, 2016) ความเป็นไปได้ของชนิดซ่อนเร้นพบในรายงานการศึกษาของม้าน้ำชนิดอื่นเช่นเดียวกัน เช่น การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมบริเวณยีน *cytb* ระหว่างตัวอย่างม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*) จากฟิลิปปินส์และเวียดนาม (ระยะห่างทางพันธุกรรม 1.1-3.2%) และการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมบริเวณยีน *cytb* ระหว่างตัวอย่างม้าน้ำ lined (*H. erectus*) จากอเมริกาเหนือและบราซิล (ระยะห่างทางพันธุกรรม 5.9%) (Casey *et al.*, 2004)

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรอ่าวไทยกับประชากรอื่นอาจมีสาเหตุมาจากระยะห่างระหว่างประชากร ความไม่ต่อเนื่องของแหล่งที่อยู่อาศัย การปรับตัวของประชากรให้เหมาะสมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน และสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ในสมัยไพลสโตซีนที่จำกัดการแพร่กระจายและแลกเปลี่ยนของยีนระหว่างประชากรของอ่าวไทยกับประชากรอื่น อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษา เช่น จำนวนตัวอย่างและ

เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ใช้ยังไม่เพียงพอต่อการยืนยันผลการศึกษา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมทางอนุพันธุศาสตร์โดยการเพิ่มทั้งจำนวนตัวอย่างและจำนวนเครื่องหมายทางพันธุกรรม ในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ประชากร ยังไม่มีหลักการที่แน่นอนว่าควรเลือกใช้จำนวนตัวอย่างหรือจำนวนเครื่องหมายทางพันธุกรรมเท่าใดจึงจะเหมาะสม ซึ่งโดยทั่วไปจะอ้างอิงตามการศึกษาที่มีมาก่อนหน้าหรือตามการศึกษาที่ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ บางการศึกษาใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมและตัวอย่างเป็นจำนวนมากเท่าที่จะเป็นไปได้ โดยคาดว่าจะทำให้กำลังทางสถิติ (statistical power) มีค่าสูง (Ryman & Palm, 2006) แต่ในบางงานวิจัยใช้หลักการง่าย ๆ โดยการศึกษาตัวอย่างมากกว่า 30 ตัวอย่างเพื่อการประเมินความแตกต่างระหว่างประชากร (Ward & Jasieniuk, 2009) กำลังในการตรวจสอบของเครื่องหมายทางพันธุกรรมแต่ละชนิดมีผลต่อการศึกษา ดังนั้น ควรมีการศึกษาความแตกต่างของลำดับทางพันธุกรรมบนยีนหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอมากกว่า 1 ตำแหน่ง โดยคัดเลือกเครื่องหมายทางพันธุกรรมทั้งจากในนิวเคลียสและในไมโทคอนเดรีย รวมถึงควรทำการศึกษาร่วมกับการศึกษาความแตกต่างทางสัณฐานเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนและยืนยันการจำแนกชนิดซ่อนเร้น Struck *et al.* (2018) ได้เสนอแนวคิดในการศึกษาชนิดซ่อนเร้นไว้ว่าควรเป็นการศึกษาแบบบูรณาการ โดยศึกษาข้อมูลให้ครอบคลุมถึงลักษณะทางพันธุกรรมในระดับจีโนมร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐาน โดยต้องมีการทดสอบทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างชนิดซ่อนเร้นกับชนิดที่ไม่ใช่ชนิดซ่อนเร้น

สรุปผลการวิจัย

การประเมินพันธุศาสตร์ประชากรของม้าน้ำแคระเบื่องต้น โดยการวิเคราะห์ลำดับทางพันธุกรรมบริเวณ cytochrome *b* ขนาด 702 คู่เบส ในประชากรอ่าวไทย น่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีน พบว่าประชากรอ่าวไทยแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมจากประชากรของน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนอย่างมีนัยสำคัญ พบความผันผวนทางพันธุกรรมสูงระหว่างประชากรอ่าวไทยกับกลุ่มของประชากรน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนอย่างมีนัยสำคัญ ระยะห่างทางพันธุกรรมของประชากรที่พบในอ่าวไทย เปรียบเทียบกับประชากรจากน่านน้ำญี่ปุ่นและชายฝั่งทางตอนเหนือของจีนมีค่าสูง เทียบเท่ากับระยะห่างทางพันธุกรรมที่พบในม้าน้ำต่างชนิดกัน ซึ่งให้เห็นว่าประชากรอ่าวไทยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจนจากประชากรอื่นและมีความเป็นไปได้ของชนิดซ่อนเร้นในขอบเขตการแพร่กระจายของม้าน้ำแคระ อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาวิเคราะห์เบื้องต้น การศึกษาเพิ่มเติมทางอนุพันธุศาสตร์ร่วมกับสัณฐานวิทยาจึงมีความสำคัญและจำเป็นในการจำแนกชนิดม้าน้ำแคระในประเทศไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Aylesworth, L., Lawson, J. M., Laksanawimol, P., Ferber, P. & Loh, T.-L. (2016). New records of the Japanese seahorse *Hippocampus mohnikei* in Southeast Asia to updates in range, habitat and threats. *Journal of Fish Biology*, 88(4), 1620-1630.
- BOLD. (2016). *Barcode of Life Data System*. Hippocampus specimens on BOLD (Barcode of Life Data System). Retrieved July 25, 2018, from <http://dx.doi.org/10.5883/DS-SH2016>

- Casey, S. P., Hall, H. J., Stanley, H. F. & Vincent, A. C. J. (2004). The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): a phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(2004), 261-272.
- Dulvy, N. K., Sadovy, Y. & Reynolds, J. D. (2003). Extinction vulnerability in marine populations. *Fish and Fisheries*, 4, 25-64.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Laksanawimol, P., Petpiroon, S. & Damrongphol, P. (2013). Trade of seahorses, *Hippocampus* spp. (Actinopterygii: Syngnathiformes: Syngnathidae), on the East Coast of the Gulf of Thailand. *Acta Ichthologica et Piscatoria*, 43, 229-235.
- Lim, K. (2013). New Singapore record of the seahorse, *Hippocampus mohnikei*. *Singapore Biodiversity Records*, 2013, 68-69.
- Lipton, A. P. & Thangaraj, M. (2013). Distribution pattern of seahorse species (Genus: *Hippocampus*) in Tamilnadu and Kerala coasts of India. *Notulae Scientia Biologicae*, 5, 20-24.
- Liu, J. X., Gao, T. X., Wu, S. F. & Zhang, Y. P. (2007). Pleistocene isolation in the Northwestern Pacific marginal seas and limited dispersal in a marine fish, *Chelon haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845). *Molecular Ecology*, 16, 275-288.
- Lourie, S. A., Foster, S. J., Cooper, E. W. T. & Vincent, A. C. J. (2004). *A Guide to the Identification of Seahorses. Project Seahorse and TRAFFIC North America*. Washington, D.C.: University of British Columbia and World Wildlife Fund.
- Lourie, S. A., Pollom, R. A. & Foster, S. J. (2016). A global revision of the Seahorses *Hippocampus* Rafinesque 1810 (Actinopterygii: Syngnathiformes): Taxonomy and biogeography with recommendations for further research. *Zootaxa*, 4146(1), 001-066.
- Lourie, S. A., Vincent, A. C. J. & Hall, H. J. (1999). *Seahorse: an identification guide to the world's species and their conservation*. London: Project Seahorse.
- Michalakis, Y., & Excoffier, L. (1996). A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, 142, 1061-1064.
- Nickel, J. & Cursons, R. (2012). Genetic diversity and population structure of the pot-belly seahorse *Hippocampus abdominalis* in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 46(2), 207-218.
- Panithanarak, T. (2015). Phylogeny of Thai seahorses inferred from mitochondrial DNA cytochrome b gene. In *Proceedings of the Burapha University International Conference 2015 (BUU2015)*. (pp. 1010-1023). Chonburi: Burapha University.

- Pollom, R. (2017). *Hippocampus mohnikei*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T41005A54907304*. Retrieved July 25, 2018, from <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T41005A54907304.en>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. & Sanchez-Gracia, A. (2017). DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolutions*, 34, 3299-3302.
- Ryman, N. & Palm, S. (2006). POWSIM: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Molecular Ecology*, 6, 600-602.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Struck, T. H., Feder, J. L., Bendiksbj, M., Birkeland, S., Cerca, J., Gusarov, V. I., Kistenich, S., Larsson, K.-H., Liow, L. H., Nowak, M. D., Stedje, B., Bachmann, L. & Dimitrov, D. (2018). Finding evolutionary processes hidden in cryptic species. *Trends in Ecology & Evolution*, 33(3), 153-163.
- Swofford, D. L. (2002). *PAUP*-phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4.0b10*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Thangaraj, M. & Lipton, A. P. (2007). Occurrence of the Japanese seahorse *Hippocampus mohnikei* Bleeker 1854 from the Palk Bay coast of southeastern India. *Journal of Fish Biology*, 70, 310-312.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24, 4876-4882.
- Wang, P. (1999). Response of Western Pacific marginal seas to glacial cycles: paleoceanographic and sedimentological features. *Marine Geology*, 156, 5-39.
- Ward, S. M. & Jasieniuk, M. (2009). Review: sampling weedy and invasive plant populations for genetic diversity analysis. *Weed Science*, 57, 593-602.
- Woodall, L. C., Otero-Ferrer, F., Correia, M., Curtis, J. M. R., Garrick-Maidment, N., Shaw, P. W. & Koldewey, H. J. (2018). A synthesis of European seahorse taxonomy, population structure, and habitat use as a basis for assessment, monitoring and conservation. *Marine Biology*, 165(1), 19. doi:10.1007/s00227-017-3274-y
- Yagi, Y., Kinoshita, I., Fujita, S. Aoyama, D. & Kawamura, Y. (2011). Importance of the upper estuary as a nursery ground for fishes in Ariake Bay, Japan. *Environmental Biology of Fishes*, 91, 337-352.
- Zhang, Y., Pham, N. K., Zhang, H., Lin, J. & Lin, Q. (2014). Genetic variations in two seahorse species (*Hippocampus mohnikei* and *Hippocampus trimaculatus*): evidence for middle Pleistocene population expansion. *PLoS ONE*, 9(8), e105494. doi:10.1371/journal.pone.0105494