

## บทความวิจัย (Research Article)

## ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดปลาในพื้นที่ปกป้องพันธุ์กรรมพืช มหาวิทยาลัยพะเยา DNA barcoding for the species identification of fish in plant genetic conservation area, University of Phayao

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์<sup>1\*,2</sup> และ ศิริภรณ์ อ่วมเจริญ<sup>1</sup>

Dutrudi Panprommin<sup>1\*,2</sup> and Siriporn Oumcharoen<sup>1</sup>

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดปลาที่รวบรวมได้จากแหล่งน้ำในพื้นที่ปกป้องพันธุ์กรรมพืช มหาวิทยาลัยพะเยาโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครมซีออกซิเดสหน่วยย่อยที่ 1 (ยีน COI) พบว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถจำแนกชนิดปลาจำนวน 11 ชนิดที่รวบรวมได้อย่างถูกต้อง โดยมีความยาวเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 625 คู่เบส อยู่ในช่วง 591-639 คู่เบส และปลาชนิดเดียวกันมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เพียง 1 รูปแบบเท่านั้น ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ทั้งหมดในปลาทั้ง 11 ชนิด พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มของปลาได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ตามระบบอนุกรมวิธาน คือ กลุ่มของปลาในอันดับเพอร์ซิฟอร์เมส ซิพรีนิฟอร์เมส และซิลูริฟอร์เมส ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้รวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาในพื้นที่ปกป้องพันธุ์กรรมพืช มหาวิทยาลัยพะเยาต่อไป

**คำสำคัญ:** ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ยีนไซโตโครมซีออกซิเดสหน่วยย่อยที่ 1, การจำแนกชนิด, ปลา, มหาวิทยาลัยพะเยา

### Abstract

The objective of this investigation was to identify the species of fish collected from water sources in plant genetic conservation area, University of Phayao by using DNA barcodes or the partial of COI nucleotide sequences. A total of 11 fish species were correctly identified through DNA barcoding. The average of COI sequence length was 625 bp, ranging from 591 to 639 bp. Fish of the same species revealed only one haplotype of COI sequence. Systematics and phylogenetics studies of nucleotide sequence in COI gene among 11 fish species indicated that the nodes of phylogenetic tree were typically divided fishes into 3 separated groups; Perciformes, Cypriniformes and Siluriformes. Collective data was conducted to store in database containing DNA barcodes for all fish in water sources in the plant genetic conservation area of the University of Phayao.

**Keywords:** DNA barcoding, cytochrome c oxidase I, species identification, fish, University of Phayao

<sup>1</sup> สาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

<sup>2</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

<sup>1</sup> Fisheries, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao

<sup>2</sup> Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900

\* Corresponding author, E-mail: dutrudeep@yahoo.com; Received: 27 June 2014; Accepted: 30 November 2014

## บทนำ

มหาวิทยาลัยพะเยาตั้งอยู่ที่ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา มีเนื้อที่ประมาณ 5,727 ไร่ ในปี พ.ศ. 2550 มหาวิทยาลัยพะเยาได้ร่วมสนองพระราชดำริในการดำเนินงานกับโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) โดยพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช มหาวิทยาลัยพะเยาครอบคลุมแหล่งน้ำมากมาย ทั้งแหล่งน้ำธรรมชาติ ได้แก่ ห้วยทับช้าง ห้วยนาปอย และห้วยหลวง เป็นต้น และที่มนุษย์สร้างขึ้น ได้แก่ อ่างเก็บน้ำต่างๆ โดยแหล่งน้ำเหล่านี้เป็นแหล่งน้ำใช้ภายในมหาวิทยาลัยพะเยา ซึ่งมีความหลากหลายของชนิดปลาค่อนข้างสูง ศิริลักษณ์ และสิทธิตักดิ์ [5] ได้ศึกษาความหลากหลายของชนิดปลาในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช มหาวิทยาลัยพะเยา ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนกันยายน 2555 พบปลาทั้งหมด 12 วงศ์ 26 สกุล 31 ชนิด โดยปลาในวงศ์ Cyprinidae พบมากที่สุดถึง 14 ชนิด

การจำแนกชนิดปลาจากลักษณะภายนอกบางครั้งอาจประสบกับปัญหาตัวอย่างปลาที่ได้มานั้นไม่สมบูรณ์ หรืออาจอยู่ในระยะพัฒนาการต่างๆ เช่น ไข่ ลูกปลาวัยอ่อน หรือวัยรุ่น เป็นต้น หรือเป็นปลาที่มีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากๆ โดยเฉพาะปลาในวงศ์ Cyprinidae ที่หลายชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก จำเป็นต้องอาศัยนักอนุกรมวิธานปลาโดยเฉพาะในการจำแนกชนิดปลา ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ร่วมด้วยในการจำแนกชนิดปลา ได้แก่ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ของยีนบางชนิดที่อยู่บนไมโทคอนเดรีย ได้แก่ ยีน cytochrome C oxidase I (COI) [7] ที่มีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยมีความแตกต่างภายในชนิดต่ำมาก สามารถใช้ในการจำแนกชนิดปลาได้ โดยดุจฤดี และศิริลักษณ์ [3] ศึกษาการจำแนกชนิดปลาโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในปลาจำนวน 10 ชนิด ที่รวบรวมได้จากอ่างหลวง และอ่างเก็บน้ำ 2 ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช มหาวิทยาลัยพะเยา พบว่า ดีเอ็นเอ

บาร์โค้ดสามารถจำแนกชนิดปลาทั้ง 10 ชนิดได้อย่างถูกต้อง และจัดแบ่งกลุ่มของปลาได้ตามหลักอนุกรมวิธาน นอกจากนี้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดยังสามารถจำแนกชนิดปลาอื่นๆ ได้อีกด้วย เช่น ปลาเสือตอ<sup>[1]</sup> ปลาซิว [2] ปลาการ์ตูน [12] เป็นต้น

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในการจำแนกชนิดปลาที่รวบรวมได้จากแหล่งน้ำ 2 แหล่ง ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช มหาวิทยาลัยพะเยา ได้แก่ อ่างน้ำหน้าโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยพะเยา และห้วยทับช้าง และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาที่รวบรวมได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะเก็บไว้เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชต่อไป โดยงานวิจัยนี้จัดทำขึ้นเพื่อสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

รวบรวมตัวอย่างปลาในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช มหาวิทยาลัยพะเยา จากแหล่งน้ำ 2 แหล่ง คือ อ่างน้ำหน้าโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยพะเยา และห้วยทับช้าง โดยใช้เครื่องมือประมงต่างๆ ได้แก่ อวน ข่าย แห และสวิง จากนั้นทำการจำแนกชนิดปลาจากลักษณะภายนอกด้วยคู่มือวิเคราะห์พันธุ์ปลาของ Nelson [9] และ Rainboth [10] แล้วตัดครีปลาทั้งหมดไปแช่ในขวดพลาสติกที่มีเอทานอลบริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform extraction [11] และตรวจสอบคุณภาพโดยวิธี 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยมีปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH<sub>2</sub>O ปริมาตร 18.75 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer ปริมาตร 2.25 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl<sub>2</sub> ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร, 0.01 mM COI primers ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 0.05 mM dNTPs ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 0.625 unit Taq DNA Polymerase และดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาตร 0.5-2

ไมโครลิตร [15] และมีสภาวะการควบคุมอุณหภูมิจำนวน 35 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จากการศึกษาของ Ward *et al.* [15] โดยใช้ในอัตราส่วนที่เท่ากัน ดังนี้

FishF1 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'

FishF2 5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3'

FishR1 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'

FishR2 5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'

จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan) และตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis นำผลผลิต PCR ที่บริสุทธิ์ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ทางด้านปลาย 5' โดยใช้ Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [6] และ BOLD (<http://www.boldsystems.org>) ศึกษาารูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาแต่ละชนิดด้วยโปรแกรม ClustalW [14] และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในช่วงบริเวณเดียวกันมาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.0 [13] วิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) โดยกำหนดค่า Bootstrap ที่ 1000 replicates

## ผลการศึกษา

จากการรวบรวมชนิดปลาจากแหล่งน้ำทั้งสองแหล่ง คือ อ่างน้ำหน้าโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยพะเยา พบปลาทั้งหมด 2 อันดับ 2 วงศ์ 3 ชนิด และห้วยทับช้าง พบปลาทั้งหมด 3 อันดับ 6 วงศ์ 8 ชนิด โดยพบปลาที่มีสถานภาพมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (vulnerable) 1 ชนิด คือ ปลาดุกด่าน (*Clarias batrachus*) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ชนิดปลาที่รวบรวมได้จากอ่างน้ำหน้าโรงเรียนสาริตมมหาวิทยาลัยพะเยา และห้วยทับช้าง ในพื้นที่ปกปักพันธุ์กรรมพืช มหาวิทยาลัยพะเยา

| อันดับ           | วงศ์          | ชื่อวิทยาศาสตร์                 | ชื่อไทย          | อ่างน้ำหน้าโรงเรียน<br>สาริตมมหาวิทยาลัย<br>พะเยา (ตัว) | ห้วยทับ<br>ช้าง (ตัว) |
|------------------|---------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1. Cypriniformes | Cyprinidae    | <i>Labeo rohita</i>             | ปลาน้ำจืดเทศ     | 2                                                       | -                     |
|                  |               | <i>Barbonymus altus</i>         | ปลาดุกเขื่อนทอง  | 1                                                       | -                     |
|                  |               | <i>Barbonymus gonionotus</i>    | ปลาดุกเขื่อนขาว  | -                                                       | 2                     |
| 2. Siluriformes  | Clariidae     | <i>Clarias batrachus</i>        | ปลาดุกบ้าน       | -                                                       | 2                     |
| 3. Perciformes   | Cichlidae     | <i>Oreochromis niloticus</i>    | ปลานิล           | 1                                                       | -                     |
|                  |               | <i>Oreochromis aureus</i>       | ปลาหมอเทศข้างลาย | -                                                       | 1                     |
|                  |               | <i>Oreochromis mossambicus</i>  | ปลาหมอเทศ        | -                                                       | 1                     |
|                  | Channidae     | <i>Channa gachua</i>            | ปลาก้าง          | -                                                       | 2                     |
|                  |               | <i>Channa striata</i>           | ปลาส่อน          | -                                                       | 2                     |
|                  | Osphronemidae | <i>Trichopodus trichopterus</i> | ปลากะดี่หม้อ     | -                                                       | 1                     |
|                  | Ambassidae    | <i>Parambassis</i> sp.          | ปลาแบนแก้ว       | -                                                       | 2                     |

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาที่รวบรวมได้จากพื้นที่ปกปักพันธุ์กรรมพืช มหาวิทยาลัยพะเยา บนฐานข้อมูล GenBank และ BOLD (ข้อมูล ณ เดือนมิถุนายน 2557)

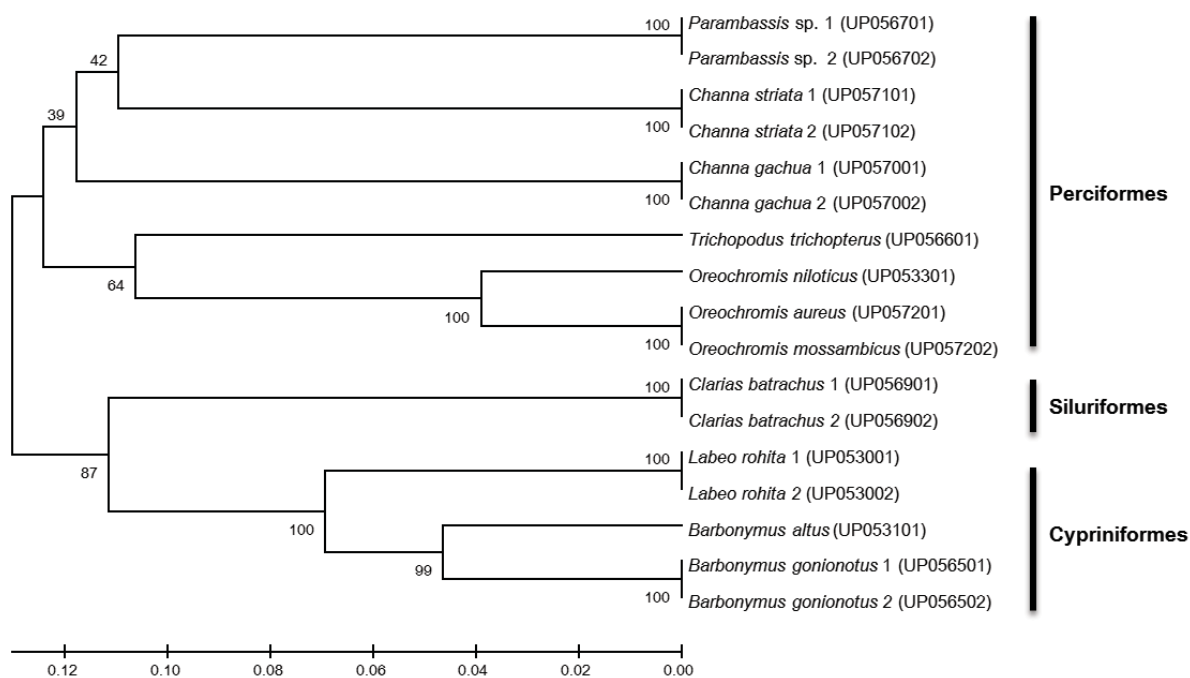
| หมายเลข<br>ตัวอย่าง                       | ชนิดปลา                         | ความยาวของลำดับ<br>นิวคลีโอไทด์ (คู่เบส) | การจำแนกชนิดบนฐานข้อมูล (% Similarity) |                               |
|-------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|
|                                           |                                 |                                          | GenBank                                | BOLD                          |
| อ่างน้ำหน้าโรงเรียนสาริตมมหาวิทยาลัยพะเยา |                                 |                                          |                                        |                               |
| UP053001                                  | <i>Labeo rohita</i>             | 627                                      | <i>L. rohita</i> (99%)                 | <i>L. rohita</i> (100%)       |
| UP053101                                  | <i>Barbonymus altus</i>         | 630                                      | <i>B. altus</i> (99%)                  | <i>B. altus</i> (100%)        |
| UP053301                                  | <i>Oreochromis niloticus</i>    | 630                                      | <i>O. niloticus</i> (100%)             | <i>O. niloticus</i> (100%)    |
| ห้วยทับช้าง                               |                                 |                                          |                                        |                               |
| UP056501                                  | <i>Barbonymus gonionotus</i>    | 630                                      | <i>B. gonionotus</i> (100%)            | <i>B. gonionotus</i> (100%)   |
| UP056901                                  | <i>Clarias batrachus</i>        | 627                                      | <i>C. batrachus</i> (100%)             | <i>C. batrachus</i> (100%)    |
| UP057201                                  | <i>Oreochromis aureus</i>       | 630                                      | <i>O. aureus</i> (99%)                 | <i>O. aureus</i> (100%)       |
| UP057202                                  | <i>Oreochromis mossambicus</i>  | 630                                      | <i>O. mossambicus</i> (100%)           | <i>O. mossambicus</i> (100%)  |
| UP057001                                  | <i>Channa gachua</i>            | 630                                      | <i>C. gachua</i> (95%)                 | <i>C. gachua</i> (100%)       |
| UP057101                                  | <i>Channa striata</i>           | 630                                      | <i>C. striata</i> (99%)                | <i>C. striata</i> (100%)      |
| UP056601                                  | <i>Trichopodus trichopterus</i> | 639                                      | <i>T. trichopterus</i> (100%)          | <i>T. trichopterus</i> (100%) |
| UP056701                                  | <i>Parambassis</i> sp.          | 591                                      | <i>Pseudambassis ranga</i> (93%)       | -                             |

จากการเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ในปลาทุกตัวอย่าง และเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ พบว่าปลาแต่ละชนิดมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ต่างๆ กัน (ตารางที่ 2) โดยมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 625 คู่เบส อยู่ในช่วง 591-639 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาชนิดเดียวกันจะไม่มี ความแตกต่างกัน หรือมีเพียง 1 haplotype เท่านั้น

จากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาทุกชนิดกับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล พบว่า ทั้งในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD ยังไม่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาเพียง 1 ชนิดเท่านั้น คือ ปลาแป้นแก้ว (*Parambassis* sp.) (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็นคนละชนิดกับที่รายงานโดยจุจตุติ และศิริลักษณ์ [3] ที่เป็นชนิด

*Parambassis siamensis* เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI แตกต่างกัน 76 คู่เบส คิดเป็น 12.9 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้สามารถเพิ่มข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในฐานข้อมูลทั้งสองนี้ได้

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในช่วงบริเวณเดียวกันของปลาทั้งหมดที่รวบรวมได้จากทั้งสองแหล่งนำมาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI สามารถแบ่งปลาทั้ง 11 ชนิดออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ กลุ่มของปลาในอันดับ Perciformes (ปลานิล ปลาหมอเทศ ปลาหมอเทศขางลาย ปลากะตือหม้อ ปลาแป้นแก้ว ปลาก้าง และปลาช่อน) Cypriniformes (ปลาดุกเพียนขาว ปลาดุกเพียนทอง และปลายี่สกเทศ) และ Siluriformes (ปลาดุกด้าน) ซึ่งสอดคล้องกับการจำแนกชนิดปลาตามระบบอนุกรมวิธานของ Nelson [9] (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI จากปลาจำนวน 11 ชนิดที่รวบรวมจากพื้นที่ปลูกผักพันธุ์กรรมพืช มหาวิทยาลัยพะเยา

## วิจารณ์และสรุปผล

จากการศึกษาความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาทั้ง 11 ชนิด พบว่า มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 625 คู่เบส ซึ่งมีความยาวใกล้เคียงกับการศึกษาในปลาเสือตอ [1] ปลาเศรษฐกิจ 5 ชนิดในแม่น้ำปิง[4] ที่ทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR เพียงทิศทางเดียวเท่านั้น คือ ทิศทางด้านปลาย 5' ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Ward *et al.* [15] ที่เป็นการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ทั้งด้านปลาย 5' และ 3' โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวมากกว่า 250 คู่เบส ก็เพียงพอแล้วที่จะประสบความสำเร็จในการจำแนกชนิดได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ [8]

นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาชนิดเดียวกันจะไม่มี ความแตกต่างกัน เนื่องจากดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยมีความแตกต่างภายในชนิดต่ำมาก Ward *et al.* [15] ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI หรือดีเอ็นเอบาร์โค้ดในปลาทะเลจำนวน 207 ชนิด พบว่า ปลาชนิดเดียวกันมีความแตกต่างภายในชนิดเพียง 0.39 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงบริเวณเดียวกันของยีน COI ที่มีความยาว 535 คู่เบสจากปลาทั้ง 11 ชนิดที่ได้จากการทำ Multiple Sequence Alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่า สามารถจัดแบ่งปลาออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ตามระบบอนุกรมวิธาน ซึ่งจากภาพที่ 1 จะเห็นได้ว่าปลาในอันดับ Cypriniformes มีความใกล้ชิดกับปลาในอันดับ Siluriformes มากกว่าปลาในอันดับ Perciformes เนื่องจากปลาในอันดับ Cypriniformes และ Siluriformes ถูกจัดให้อยู่ใน Supercohort Clupeocephala เหมือนกัน เนื่องจากมีลักษณะร่วมคือการมีข้อกระดูกสันหลังข้อแรกๆ เปลี่ยนเป็นอวัยวะช่วยในการฟังเสียง เรียกว่า weberian apparatus ในขณะที่ปลาในอันดับ Perciformes ถูกจัดอยู่ใน Supercohort Neoteleostei นั่นเอง [9]

นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ยังสามารถจำแนกกลุ่มของปลาได้ถึงระดับครอบครัวและสกุลได้อีกด้วย โดยปลานิล ปลาทอมเทศ และปลาทอมเทศข้างลายถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน เนื่องจากเป็นปลาที่อยู่ในครอบครัว Cichlidae และสกุล *Oreochromis* เดียวกัน

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI หรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกชนิดปลา และการจัดแบ่งกลุ่มของปลาได้อย่างถูกต้องตามหลักอนุกรมวิธาน ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะถูกรวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาในพื้นที่ปกปักพันธุ์กรรมพืชมหาวิทยาลัยพะเยาต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2557 มหาวิทยาลัยพะเยา และการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

## เอกสารอ้างอิง

1. ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์, นนทรี ปานพรหมมินทร์. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดปลาวงศ์เสือตอ. แก่นเกษตร 2557; 42 (ฉบับพิเศษ 1): 742-748.
2. ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์, บุษบง ศรีอ่อนคง, นนทรี ปานพรหมมินทร์. การจำแนกชนิดปลาซีววงศ์ย่อย Rasborinae 12 ชนิด โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด. แก่นเกษตร 2556; 41(ฉบับพิเศษ 1): 459-465.
3. ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์, ศิริลักษณ์ วลัยชัยเพียร. การจำแนกชนิดปลาในพื้นที่ปกปักพันธุ์กรรมพืชมหาวิทยาลัยพะเยา โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด. ใน: งานประชุมวิชาการชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ

- อพ.สธ. ครั้งที่ 6 เชื้อนครินทร์. กาญจนบุรี 21-23 ธันวาคม 2556. หน้า 362-367.
4. ประภาส ยมเกิด, ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาเศรษฐกิจ 5 ชนิด ในแม่น้ำปิง จังหวัดตาก. วารสารนเรศวรพะเยา 2556; 6(1): 64-70.
  5. ศิริลักษณ์ วลัยุฑ์เพียร, สิทธิศักดิ์ ปิ่นมงคลกุล. ความหลากหลายของชนิดปลาในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชมหาวิทยาลัยพะเยา. ใน: การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 5 มหาวิทยาลัยพะเยา. พะเยา 4-5 มีนาคม 2556. หน้า 313.
  6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990; 215: 403-410.
  7. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B 2003; 270: 313-321.
  8. Meusnier I, Singer GAC, Landry J-F, Hickey DA, Hebert PDN, Hajibabaei M. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. BMC Genomics 2008; 9: 214.
  9. Nelson JS. Fishes of the world. Fourth edition. New York: John Wiley & Sons; 2006.
  10. Rainboth WJ. Fish of the Cambodian Mekong. Wisconsin: University of Wisconsin Oshkosh; 1996.
  11. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning; A laboratory manual. Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
  12. Steinke D, Zemlak TS, Hebert PDN. Barcoding nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. PLoS ONE. 2009; 4(7): 1-5.
  13. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007; 24: 1596-1599.
  14. Thomson JD, Higgins DG, Gibson TJ. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 1994; 22: 4673-4680.
  15. Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. Phil Trans R Soc B 2005: 1-11.