

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในปลาและการประยุกต์ใช้

DNA barcoding of the fish and its application

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์^{1*, 2}

Dutrudi Panprommin^{1*, 2}

บทคัดย่อ

การจำแนกชนิดปลาจากลักษณะภายนอกบางครั้งอาจประสบกับปัญหาตัวอย่างไม่สมบูรณ์ หรืออยู่ในช่วงพัฒนาการต่างๆ หรือผ่านกระบวนการแปรรูปแล้ว ทำให้ต้องอาศัยวิธีการทางอนุชีววิทยาที่เรียกว่า "ดีเอ็นเอบาร์โค้ด" มาใช้ร่วมในการศึกษา ซึ่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของทางด้านปลาย 5' ของยีน cytochrome c oxidase I (COI) ที่มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส สามารถเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวด้วยไพรเมอร์ที่มีลักษณะเป็น universal primers จำเพาะต่อยีน COI ในปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) ทำให้ทราบชื่อของชนิดปลาได้โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อแล้ว เทคนิคนี้เหมาะสำหรับนักอนุกรมวิธานและนักวิทยาศาสตร์ที่ไม่มีความชำนาญทางด้านนี้โดยเฉพาะ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในปลานอกจากใช้ในการจำแนกชนิดแล้ว ยังสามารถประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ได้อีกด้วย ได้แก่ การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ การจัดการทรัพยากรประมงและการอนุรักษ์ การจำแนกชนิดลูกปลาวัยอ่อน การจำแนกปลาชนิดใหม่ และความปลอดภัยในอาหาร

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, การจำแนกชนิด, ยีน cytochrome c oxidase I

Abstract

Fish identification sometimes faced with incomplete and inaccurate samples, various stages of development, or fish processed make use of the so-called "DNA barcodes" to participate in the study. DNA barcode is partial nucleotide sequence of the 5' end of cytochrome c oxidase I (COI), which is approximately 650 bp. The fragment is amplified by using PCR (Polymerase Chain Reaction) technique with the universal

Key words: DNA barcode, species identification, cytochrome c oxidase I gene

¹สาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

^{1*} Fisheries, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao Province 56000

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

* Corresponding author E-mail: dutrudeep@yahoo.com

Received: 7 March 2013; Accepted: 30 November 2013

primers specific to the COI gene. This allows to know the species of fish by comparing the COI sequence of unknown fish with reported nucleotide sequence of organisms of known species in database. This technique is suitable for inexperienced fish taxonomist. In addition, DNA barcoding can be applied to identify biological specimens in various fields, such as fish biodiversity, fisheries management and conservation, identification of fish larvae, identification of new species, and to help confirm food safety.

Key words: DNA barcode, species identification, cytochrome c oxidase I gene

บทนำ

โดยทั่วไปการจำแนกชนิดปลา มักใช้ลักษณะภายนอก (Morphology) ที่เห็นได้ชัดเจน ได้แก่ ลักษณะลำตัว เกล็ด ปาก ฟัน หนวด และครีบปลา เป็นต้น ทำให้ปลาแต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกันไปตามอันดับ วงศ์ และสกุลของปลาในระบบอนุกรมวิธาน เช่น ปลาในอันดับ Siluriformes เป็นปลาหนัง หรือปลาที่ไม่มีเกล็ด มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนกับปลาในอันดับ Cypriniformes ที่เป็นปลามีเกล็ด นอกจากนี้ปลาที่อยู่ในอันดับเดียวกันแต่ต่างวงศ์ต่างสกุลก็มีความแตกต่างกันด้วยเช่นกัน

การจำแนกชนิดปลาจากลักษณะภายนอกดังกล่าว บางครั้งอาจประสบกับปัญหาตัวอย่างปลาอยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์ หรืออยู่ในระยะพัฒนาการต่างๆ เช่น ไข่ปลา ลูกปลารวยอ่อน ที่มีลักษณะไม่เหมือนปลาโตเต็มวัย หรืออยู่ในสภาพที่ผ่านขบวนการปรุงแต่งแล้ว ทำให้การใช้ลักษณะภายนอกมาจำแนกชนิดปลาไม่ได้ผล ปัจจุบันมีการนำความรู้ทางอณูชีววิทยามาใช้ร่วมในการจำแนกชนิดปลา โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอต่างๆ เช่น 12S ribosomal RNA [9, 34] 16S ribosomal RNA [34] cytochrome b [16] cytochrome c oxidase I [19, 36] เป็นต้น ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนไมโทคอนเดรียของเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะยีน cytochrome c oxidase I (COI) หรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า "ดีเอ็นเอบาร์โค้ด" ซึ่งคณะผู้วิจัยจากมหาวิทยาลัยกัลฟ์ นำโดยศาสตราจารย์ Paul DN Hebert เป็นผู้ริเริ่มใช้คำนี้ในการใช้ยีน COI เพื่อการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต จนได้รับสมญานามว่า บิดาแห่งดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยยีน COI เป็นยีนที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการจำแนกชนิดปลาด้วยเช่นกัน เนื่องจากมีบริเวณที่เรียกว่า ดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่มีความคล้ายคลึงกันมากในปลาชนิด

เดียวกัน แต่แตกต่างจากปลาต่างชนิดกัน และยังสามารถศึกษายีนดังกล่าวได้ในปลาหลายๆ ชนิดด้วยไพรเมอร์ที่มีลักษณะเป็น universal primers ทำให้ง่ายสะดวกและรวดเร็วต่อการตรวจสอบและติดตาม นอกจากการใช้ยีนที่อยู่บนไมโทคอนเดรียแล้วยังสามารถใช้ยีนที่อยู่บนนิวเคลียสได้ เช่น RAG1 (recombinase activating gene 1), rhodopsin [29] เป็นต้น

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ในปี ค.ศ. 2003 ศาสตราจารย์ Paul D.N. Hebert นักสัตววิทยา จากมหาวิทยาลัยกัลฟ์ ประเทศแคนาดา มีความคิดที่จะจำแนกสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั่วโลกที่มีจำนวนมากกว่า 1,800,000 ชนิด โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ของบางยีนที่มีความคงตัว และเป็นมาตรฐาน มาสร้างเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อใช้ในการจำแนก ตรวจสอบ และติดตามชนิดของสิ่งมีชีวิต และพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณปลายด้าน 5' ของยีน COI ที่มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส [19] มีความแตกต่างมากพอที่จะแยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้อย่างชัดเจน ในขณะที่สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีความแตกต่างกันน้อยมากหรือไม่มีเลย ทำให้มีความนิยมใช้ยีนนี้ในการจำแนกชนิดในสัตว์ แต่ในพืชพบว่ามีปัญหาในการใช้ยีน COI ในการจำแนกชนิด เนื่องจากมีความแตกต่างระหว่างชนิด ต่ำมาก จึงมีผู้นิยมใช้ยีนอื่นๆ ที่อยู่ในคลอโรพลาสต์แทน ได้แก่ ยีน maturaseK (matK) [14] tmH-psbA intergenic spacer [37] ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) [10] เป็นต้น ซึ่งจากแนวคิดดังกล่าวทำให้นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกประมาณ 50 ประเทศ 150 หน่วยงาน ร่วมมือกันก่อตั้งองค์กรระหว่างประเทศ Consortium for the Barcode of Life

(CBOL) ขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั่วโลก

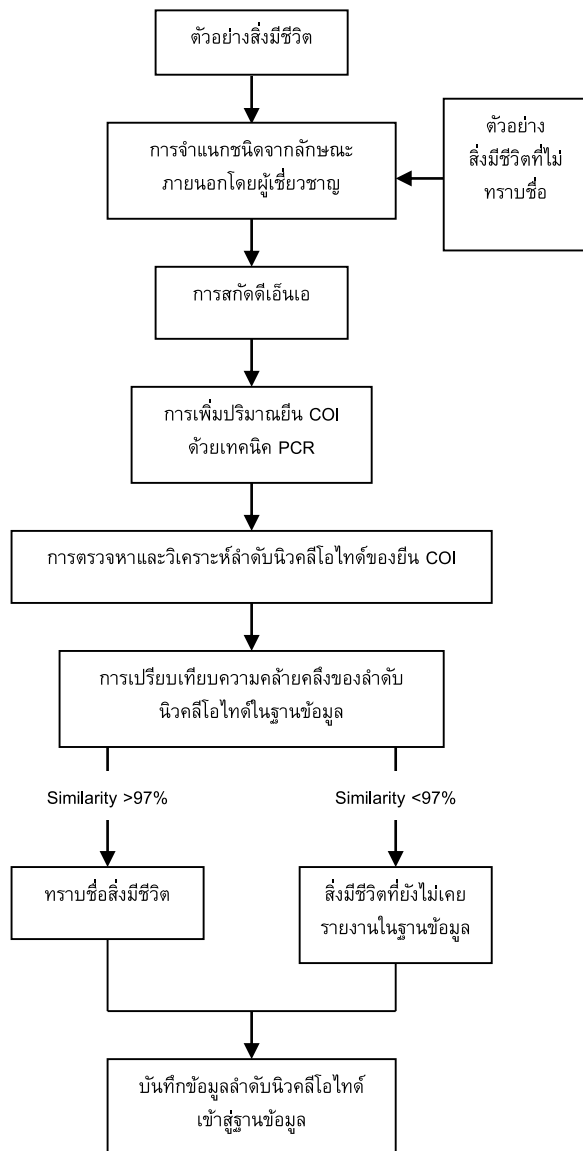
ดังนั้น ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ก็คือเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาระบบอนุกรมวิธานนั่นเอง เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่อยู่บนไมโทคอนเดรียของเซลล์ ซึ่งเป็นการถ่ายทอดลักษณะภายในชนิดจากแม่สู่รุ่นลูก ทำให้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีเอกลักษณ์เฉพาะของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ และแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ซึ่งการใช้ยีนบนไมโทคอนเดรียมีข้อดีกว่ายีนในนิวเคลียส กล่าวคือ ไมโทคอนเดรียมีอัตราการสะสมการกลายพันธุ์ของยีนสูงกว่า และไม่มีอินทรอน [19] นอกจากนี้ยีน COI ยังมีข้อดีเหนือกว่ายีนอื่นๆ บนไมโทคอนเดรียด้วยกัน (12S ribosomal RNA และ 16S ribosomal RNA) คือ ยีน COI ไม่มีการเกินหรือการขาดของคู่เบส ทำให้ไม่มีปัญหาในการทำ Sequence Alignment [13]

วิธีการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดคือ การนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของสิ่งมีชีวิตที่ไม่ทราบชื่อมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่รายงานแล้วในฐานข้อมูล จะทำให้ทราบชื่อของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นได้ โดยมีขั้นตอนดังภาพที่ 1 เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตที่ไม่ทราบชื่อหรือสิ่งมีชีวิตที่จำแนกชนิดแล้วโดยผู้เชี่ยวชาญหรือนักอนุกรมวิธาน (ในกรณีที่ต้องการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอบาร์โค้ด) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน COI ตรวจหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล จะทำให้สามารถ

ทราบชื่อของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ได้ แต่ถ้าไม่ตรงกับสิ่งมีชีวิตใดในฐานข้อมูลเลย หรือมีค่าความคล้ายคลึงน้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ [38] ให้สันนิษฐานว่ายังไม่มีผู้ใดศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นมาก่อน ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในฐานข้อมูล ส่วนอีกกรณีหนึ่ง สิ่งมีชีวิตนั้นอาจเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ (new species) ที่ยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อนก็ได้ ในกรณีนี้จำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สำหรับฐานข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI มี 2 ฐานข้อมูลด้วยกัน คือ ฐานข้อมูล GenBank ที่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยใช้โปรแกรม BLASTn (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) [8] และฐานข้อมูล BOLD (Barcode of Life Data System; <http://www.boldsystems.org>) ที่มีรายงานเฉพาะยีนดีเอ็นเอบาร์โค้ดในสิ่งมีชีวิตต่างๆ เท่านั้น ปัจจุบันฐานข้อมูลนี้รายงานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในสิ่งมีชีวิตจำนวนทั้งสิ้น 171,757 ชนิด (ข้อมูล ณ เดือนกุมภาพันธ์, 2556) คิดเป็นเพียงร้อยละ 9.5 ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมดทั่วโลก ยังเหลือสิ่งมีชีวิตอีกมากมายหลายชนิดที่ยังไม่ได้ศึกษา และเมื่อศึกษาได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากสิ่งมีชีวิตที่ได้ศึกษาแล้วก็นำเข้าสู่ฐานข้อมูลทั้งสองนี้

สำหรับการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank นั้น ข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูลดังกล่าวจะมีการเชื่อมโยงถึงฐานข้อมูล EMBL (European Molecular Biology Laboratory; <http://www.embl.org/>) และ DDBJ (DNA Data Bank of Japan; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) ด้วยเช่นกัน



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในสิ่งมีชีวิต

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในปลา

ในสัตว์นิยมใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิด เช่น นก [21] แมงมุม [12] ผีเสื้อ [20] ผีเสื้อและผีเสื้อกลางคืน [18] เป็นต้น โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละชนิดของสิ่งมีชีวิต ทำให้ได้ขนาดความยาวของยีน COI ต่างๆ กัน ซึ่งโดยมากจะเป็นบริเวณปลายด้าน 5' ของยีน เช่น ไพรเมอร์ BirdF1 กับ BirdR1 หรือ BirdF1 กับ BirdR2 ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณยีน COI ในนก โดยมีผลผลิตขนาด 749 และ 751 คู่เบส ตามลำดับ [21] หรือไพรเมอร์ chelicerate forward1 กับ chelicerate

reverse1 ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณยีน COI ในแมงมุม โดยมีผลผลิตขนาด 660 คู่เบส [12] เป็นต้น นอกจากนี้ ยีน COI ยังนิยมใช้ในการจำแนกชนิดในปลาด้วยเช่นกัน ได้แก่ ปลาการ์ตูน [1, 32] ปลากะพงขาว [26] ปลาเศรษฐกิจในแม่น้ำปิง [4] และปลาชิว [3] เป็นต้น ปัจจุบันมีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาจำนวนมาก ซึ่งในฐานข้อมูล BOLD มีฐานข้อมูลย่อยของปลาโดยเฉพาะ คือ FISH-BOL (Fish barcode of life; <http://www.fishbol.org/>) ที่มีรายงานเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาจำนวน 12,960 ชนิดเท่านั้น จากปลาทั่วโลกจำนวนทั้งสิ้นประมาณ 32,500 ชนิด (จาก Fishbase; <http://www.fishbase.org/>) (ข้อมูล ณ เดือนกุมภาพันธ์ 2556) คิดเป็นร้อยละ 39.9 ดังนั้นยังมีปลาอีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ฐานข้อมูล FISH-BOL ถูกจัดทำขึ้นในปี ค.ศ. 2005 มีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาทุกชนิดด้วยความร่วมมือของนักวิจัยจากทั่วโลก โดยข้อมูลที่ได้มีรายละเอียดเกี่ยวกับชื่อของตัวอย่าง ผู้รวบรวม ตำแหน่งในการเก็บตัวอย่าง ผู้จำแนกชนิด รวมถึงไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน COI ซึ่งข้อมูลดังกล่าวมีความละเอียดสูงมากที่จะนำมาใช้ในการอ้างอิง นอกจากการใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดปลาแล้ว ยังสามารถใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลากลุ่มต่างๆ [29] การตรวจสอบชนิดปลาในอาหาร [38] และอื่นๆ ได้อีกด้วยดังจะกล่าวต่อไป

ปลาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง ถูกจัดอยู่ในชั้น Actinopterygii มีทั้งหมด 62 อันดับ [30] โดยฐานข้อมูล FISH-BOL มีรายงานดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาทั้งหมด 157,412 บาร์โค้ด ในปลาจำนวน 12,960 ชนิด โดยปลาในอันดับ Perciformes มีรายงานดีเอ็นเอบาร์โค้ดมากที่สุด คือ 70,647 บาร์โค้ด ในปลาจำนวน 5,340 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 41.2 รองลงมาคือ Cypriniformes, Scorpaeniformes, Siluriformes และ Characiformes ตามลำดับ ดังภาพที่ 2

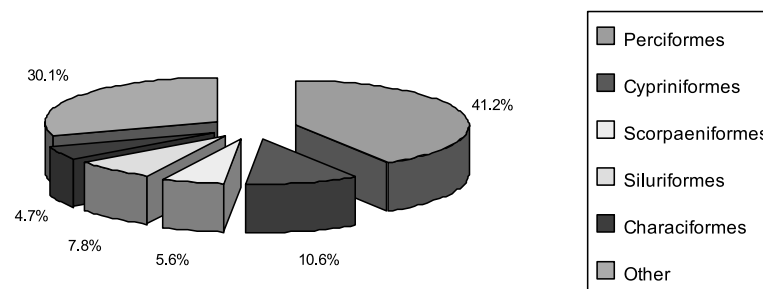
ซึ่งการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในปลาประสบความสำเร็จอย่างสูง เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR เป็น universal primers ที่มีความจำเพาะกับยีน

COI สูง สามารถใช้ได้กับปลาหลายชนิด โดย Ward et al. (2005) [36] ศึกษาการจำแนกชนิดปลาในประเทศออสเตรเลีย จำนวน 207 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ FishF1, FishF2, FishR1 และ FishR2 ผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณยีน COI ได้ในปลา 206 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 99.5 และพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวมีความเหมือนกันมากในปลาชนิดเดียวกัน แต่แตกต่างกันอย่างชัดเจนในปลาต่างชนิดกัน นอกจากนี้ Ivanova et al. (2007) [25] เสนอแนะว่าการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของ M13 เข้าที่ปลายด้าน 5' ของไพรเมอร์ดังกล่าว จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณยีน COI มากขึ้น นอกจากนี้ไพรเมอร์ดังกล่าวแล้ว ยังมีไพรเมอร์อื่นๆ อีกที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน COI ในปลา ได้แก่ ไพรเมอร์ VF1_t1, VF1d_t1, VFli_t1 กับ VR1d_t1, VRli_t1 [24] ไพรเมอร์ VF2_t1 กับ

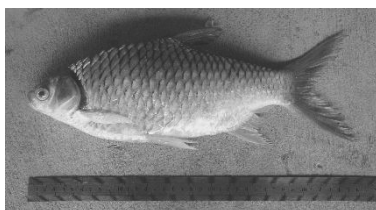
FR1d_t1 [25] โดยไพรเมอร์เหล่านี้ได้มาจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ภายในจีโนมของไมโทคอนเดรียของปลาจากฐานข้อมูล GenBank และสามารถเพิ่มปริมาณยีน COI ในบริเวณใกล้เคียงกันคือ บริเวณปลายด้าน 5' ของยีนนั้นเอง

เนื่องจากดีเอ็นเอประกอบด้วยเบส 4 ชนิด คือ A (อะดีนีน), T (ไทมีน), C (ไซโตซีน) และ G (กวานีน) ดังนั้นดีเอ็นเอบาร์โค้ดจึงมีลักษณะเป็นแถบสี 4 สี โดยแต่ละสีจะแทนแต่ละเบสของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยสีเขียวแทนเบส A, สีแดงแทนเบส T, สีน้ำเงินแทนเบส C และสีดำแทนเบส G ดังภาพที่ 3

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในปลา นอกจากเพื่อการจำแนกชนิดแล้ว ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ ได้อีกด้วย



ภาพที่ 2 ร้อยละของชนิดปลาที่มีรายงานในฐานข้อมูล FISH-BOL



```

T A A C C C C C T A A C C T C C T T A T T C A C T A C T T A C C A A C C C T A A T T T A T T
A T A T C A A A T T T A A T T T A T C T T A C T C C C A T C C T T A A T A A T C T T C T T T A T A
T A A T C C C A T C C T A T C A A A A T T C A A A C T A C T T C C T C T A A T A A T T A C C C
C C A G A T A C A T T C C C A C A A T A A A C A A C A T A A C T T C T A T T A C T A C C C C A T A A T T C
T C T A T T A T T A C C T C C T C T T T T T A A C C C C T C A C A C A T A A C A T A T A C C
C C C C T C T T C A A A C C T A C T A C C A A C A T C A T C A T A C C T A A C A A T T T T C A C
T C C A C T T A C A T T A T C C T C A A T T C T A T C A A T T A A T T T T A T C A C C A C A A T A T T A
A C A T A A A C C C C C C A C C A T C T C C C A A T A T C A A A C A C C A C T A T T C T T T A T C T A C T C
T A C C C C T A C T A C T C C T C T A T C A T A C C T T T T T A C C C C A A T T A C A A T A C T A C
T A A C A A T C A A A C C T T A A T A C T A C A T T C T T T A C C C A C A C A A A A C C C A A T T C
T T A C C A A C A C C T T T T T A T T C T T

```

ภาพที่ 3 ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาตะเพียนขาว

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ

นักวิทยาศาสตร์ประมาณกันว่ามีชีวิตทั้งหมดทั่วโลก ทั้งพืช สัตว์ เชื้อราและอื่นๆ มีประมาณ 1,800,000 ชนิด ในจำนวนนี้มีปลาประมาณ 32,500 ชนิด ซึ่งปลาเป็นสัตว์ที่มีความหลากหลายของชนิดพันธุ์สูง โดยแต่ละชนิดสามารถอาศัยอยู่ในระบบนิเวศ

ที่แตกต่างกัน อาจอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืด น้ำกร่อย หรือน้ำเค็ม นอกจากนี้ปลาชนิดเดียวกัน แต่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำต่างกัน ก็อาจทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมขึ้นได้ ซึ่งความหลากหลายของปลาเหล่านี้มีความสำคัญอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยง การปรับปรุงพันธุ์ และการจัดการทรัพยากรประมง

ปัจจุบันสามารถประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการศึกษาความหลากหลายเหล่านี้ได้ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในการศึกษาความหลากหลายของชนิดปลาและระบบนิเวศในปลาหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำต่างๆ เช่น ปลาทะเลในประเทศออสเตรเลีย [36] ปลาการ์ตูนที่อาศัยบริเวณแนวปะการัง 8 แห่ง ในประเทศแคนาดา [32] ปลาเศรษฐกิจในแม่น้ำอะเมซอน [9] เป็นต้น ซึ่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำสูง และเหมาะสำหรับบุคคลที่ไม่มีความรู้หรือเชี่ยวชาญด้านอนุกรมวิธานโดยเฉพาะ นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ยังนำเทคโนโลยีทางอณูชีววิทยา "DNA array" มาใช้ร่วมกับดีเอ็นเอบาร์โค้ด [17] ทำให้การจำแนกชนิดปลามีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ในปลาชนิดเดียวกันแต่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำต่างกัน อาจทำให้เกิดความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมขึ้นได้ โดยมีสาเหตุหลายประการ เช่น การขาดช่วงทางพันธุกรรม การคัดเลือกโดยธรรมชาติหรือมนุษย์ และการกลาย [6] มีการนำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาหลายชนิด เช่น ปลา Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) [40] ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) [26] ปลา humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) [33] เป็นต้น ซึ่งปลาเหล่านี้จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือไม่ ขึ้นอยู่กับการถ่ายเทของยีน (gene flow) ซึ่งถ้ามีการถ่ายเทของยีนมาก ประชากรก็จะแตกต่างกันน้อย และถ้ามีน้อยหรือไม่มีเลยก็จะแตกต่างกันมาก [6] ยกตัวอย่างเช่น ปลากะพงขาวที่อาศัยอยู่ในบริเวณใกล้ๆ กัน คือ บริเวณทะเลจีนใต้ ชายฝั่งประเทศสิงคโปร์และออสเตรเลีย จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน COI น้อย แต่แตกต่างจากปลากะพงขาวที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่ห่างไกลออกไป คือ บริเวณชายฝั่งประเทศพม่า อินเดีย และแทนซาเนีย [26] เนื่องจากปลาทั้งสองกลุ่มอยู่ไกลกันทางภูมิศาสตร์ จึงมีการถ่ายเทของยีนน้อยหรือมีโอกาสน้อยในการผสมพันธุ์กันนั่นเอง

นอกจากนี้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดยังถูกนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาอีกด้วย โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) จาก

ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือการดะมิโนของยีน COI ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่างๆ เช่น โปรแกรม MEGA, Genetyx, PHYLIP ด้วยวิธี Neighbour-joining (NJ), Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) หรือ Bayesian Analysis ซึ่งผลที่ได้สามารถจำแนกปลาออกเป็นกลุ่มๆ สอดคล้องกับระบบอนุกรมวิธาน ทั้งในระดับอันดับวงศ์ สกุล และชนิดของปลา Wong et al. (2011) [39] ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาในกลุ่ม catfish จำนวน 9 ชนิด ด้วยวิธี MP พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI สามารถแบ่งปลาออกเป็น 5 กลุ่มตามสกุลของปลา และสามารถแบ่งปลาเชิงวงศ์ย่อย Rasborinae จำนวน 12 ชนิดตามสกุลได้เช่นเดียวกันโดยใช้วิธี UPGMA [3]

การสร้างแผนภูมิต้นไม้แต่ละวิธีนี้มีหลักการแตกต่างกันไป โดยวิธี NJ และ UPGMA เป็นการใชตารางความแตกต่างโดยรวมระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ต่างๆ ที่ศึกษา หรือที่เรียกว่า ตารางเมตริกซ์ระยะห่าง (Distance matrix) แต่มีข้อเสียที่ผลจะมีความแปรปรวนตามข้อกำหนดของอัตราการเกิดวิวัฒนาการ สำหรับ MP เป็นวิธีที่อาศัยข้อกำหนดที่ว่าแผนภูมิต้นไม้ที่ถูกต้องนั้นจะต้องเป็นแผนภูมิที่มีระยะสั้นที่สุด คือมีจำนวนของการเปลี่ยนแปลงทางการกลายพันธุ์น้อยที่สุดนั่นเอง แต่มีข้อจำกัดที่วิธีการนี้เหมาะสำหรับข้อมูลที่มีจำนวนสิ่งมีชีวิตที่จะศึกษาสูงสุดเพียง 10 แท็กซ่า (taxa) เท่านั้น และใช้เวลานานในการคำนวณ ส่วน ML เป็นวิธีที่อาศัยการคำนวณหาความน่าจะเป็นที่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จะเกิดขึ้นจากแผนภูมิวิวัฒนาการที่เป็นไปได้ ถ้าแผนภูมิใดที่ให้ค่าความน่าจะเป็นสูงที่สุด แผนภูมินั้นจะเป็นแผนภูมิต้นไม้ที่เป็นไปได้มากที่สุด (maximum likelihood tree) [2]

การจัดการทรัพยากรประมงและการอนุรักษ์

ในการจัดการทรัพยากรประมงในแหล่งน้ำหนึ่งๆ สิ่งแรกที่ต้องทำการศึกษา คือ การศึกษาชนิดปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้นๆ แต่อย่างไรก็ตาม ปลาแต่ละชนิดมีชื่อท้องถิ่นเรียกแตกต่างกันไปตามภูมิภาค เช่น ปลาสร้อยขาว ภาคเหนือเรียก "ปลากะบอก"

13. Doyle JJ, Gaut BS. Evolution of genes and taxa: a primer. *Plant Mol Biol* 2000; 42: 1-6.
14. Dunning LT, Savolainen V. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. *Botanical Journal of the Linnean Society* 2010; 164(1): 1-9.
15. Gao T-X, Ji D-P, Xiao Y-S, Xue T-Q, Yanagimoto T, Setoguma T. Description and DNA barcoding of a new *Sillago* species, *Sillago sinica* (Perciformes: Sillaginidae), from coastal waters of China. *Zoological Studies* 2011; 50(2): 254-263.
16. Ghorashi SA, Fatemi SM, Amini F, Houshmand M, Salehi TR, Hazaie K. Phylogenetic analysis of anemone fishes of the Persian Gulf using mtDNA sequences. *African Journal of Biotechnology* 2008; 7(12): 2074-2080.
17. Hajibabaei M, Singer GAC, Clare EL, Hebert PDN. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology* 2007; 5(24) : [7 screens]. Available from: doi:10.1186/1741-7007-5-24 Accessed February 21, 2013.
18. Hausmann A, Haszprunar G, Segerer AH, Speidel W, Behounek G, Hebert PDN. Now DNA-barcoded: the butterflies and larger moths of Germany (Lepidoptera: Rhopalocera, Macroheterocera). *Spixiana* 2011; 34(1): 47-58.
19. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 2003; 270: 313-321.
20. Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2004; 101: 14812-14817.
21. Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2004; 2(10): 1657-1663.
22. Holmes BH, Steinke D, Ward RD. Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research* 2009; 95: 280-288.
23. Hubert N, Delrieu-Trottin E, Irisson J-O, Meyer C, Planes S. Identifying coral reef fish larvae through DNA barcoding: A test case with the families Acanthuridae and Holocentridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2010; 55: 1195-1203.
24. Ivanova NV, deWaard JR, Hebert PDN. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 2006; 6: 998-1002.
25. Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PDN. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 2007: [5 screens]. Available from: doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x. Accessed February 21, 2013.
26. John A, Prasannakuma C, Lyla PS, Khan SA, Jalal KCA. DNA barcoding of *Lates calcarifer* (Bloch, 1970). *Medwell Journales* 2010; 5(6): 414-419.
27. Mandal A, Mohindra V, Singh RK, Punia P, Singh AK, Lal KK. Mitochondrial DNA variation in natural populations of endangered Indian feather-back fish, *Chitala chitala*. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 1765-1775. Available from: DOI 10.1007/s11033-011-0917-9 Accessed February 21, 2013.
28. Matarese AC, Spies IB, Busby MS, Orr JW. Early larvae of *Zesticelus profundorum* (family Cottidae) identified using DNA barcoding. *Ichthyol Res* 2011; 58: 170-174.

29. Mayden RL, Tang KL, Conway KM, Freyhof J, Chamberlain S, Haskins M, Schneider L, Sudkamp M, Wood RM, Agnew M, Bufalino A, Sulaiman Z, Miya M, Saitoh K, He S. Phylogenetic relationships of *Danio* within the Order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)* 2007; 308b: 642-654.
30. Nelson JS. *Fishes of the world*. Fourth edition. New York: John Wiley & Sons; 2006. 601 p.
31. Sriwattanaarothai N, Steinke D, Ruenwongsa P, Hanner R, Panijpan B. Molecular and morphological evidence supports the species status of the Mahachai fighter *Betta* sp. Mahachai and reveals new species of *Betta* from Thailand. *J Fish Biol* 2010; 77(2): 414-24.
32. Steinke D, Tyler SZ, Hebert PDN. Barcoding nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. *Plos one* 2009; 4(7): 1-5.
33. Susanto AH, Nuryanto A, Soedibja PHT. Phylogeography and genetic diversity of humpback grouper *Cromileptes altivelis* based on cytochrome c oxidase I. *Jurnal Natur Indonesia* 2011; 14(1): 47-51.
34. Tang KL. Phylogenetic relationships among damselfishes (Teleostei: Pomacentridae) as determined by mitochondrial DNA Data. *Copeia* 2001; 3: 591-601.
35. Vilgalys R. Taxonomic misidentification in public DNA databases. *New Phytologist* 2003; 160: 1-19.
36. Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 2005: 1-11.
37. Whitlock BA, Hale AM, Groff PA. Intraspecific inversions pose a challenge for the trnH-psbA plant DNA barcode. *PLoS ONE* 2010; 5(7): [7 screens]. Available from: doi:10.1371/journal.pone.0011533 Accessed February 21, 2013.
38. Wong EH-K, Hanner RH. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International* 2008; 41: 828-837.
39. Wong LL, Peatman E, Lu J, Kucuktas H, He S, Zhou C, Uthairat N, Zhanjiang L. DNA barcoding of catfish: species authentication and phylogenetic assessment. *PLoS ONE* 2011; 6(3): [7 screens]. Available from: e17812. doi:10.1371/journal.pone.0017812 Accessed February 21, 2013.
40. Yu Z-N, Kong X-Y, Guo T-H, Jiang Y-Y, Zhuang Z-M, Jin X-S. Mitochondrial DNA sequence variation of Japanese anchovy *Engraulis japonicus* from the Yellow Sea and East China Sea. *Fisheries Science* 2005; 71: 299-307.