

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาเศรษฐกิจ 5 ชนิดในแม่น้ำปิง จังหวัดตาก

DNA barcoding of 5 fish economy from Ping River, Tak Province

ประภาส ยมเกิด¹ และ ดุจดฤดี ปานพรหมมินทร์^{1,2*}

Parpras Yomkerd¹ and Dutruodi Panprommin^{1,2*}

บทคัดย่อ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาเศรษฐกิจ 5 ชนิดในแม่น้ำปิง จังหวัดตาก ได้แก่ ปลารากกล้วย (*Acantopsis choirorhynchos*) ปลากระดี่หม้อ (*Trichogaster trichopterus*) ปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) ปลาหมอช้างลาย (*Syncrossus helodes*) และปลาดตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome c oxidase I (COI) ของปลาทั้ง 5 ชนิดมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 623 คู่เบส อยู่ในช่วง 580-636 คู่เบส เมื่อศึกษา Multiple sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโนของยีน COI ในปลาแต่ละชนิด พบว่า ปลากระดี่หม้อ ปลาหมอช้างลาย และปลาดตะเพียนขาวมีลำดับกรดอะมิโนภายในชนิดเท่ากับ 0.000 ในขณะที่ปลารากกล้วย และปลายี่สกเทศ มีความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนภายในชนิดเท่ากับ 0.005 ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน COI ทั้งหมดในปลาทั้ง 5 ชนิด พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มของปลาได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามระบบอนุกรมวิธาน คือ กลุ่มของปลาในอันดับ Cypriniformes ได้แก่ ปลารากกล้วย ปลายี่สกเทศ ปลาหมอช้างลาย และปลาดตะเพียนขาว และกลุ่มของปลาในอันดับ Perciformes ได้แก่ ปลากระดี่หม้อ

คำสำคัญ : ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ยีน Cytochrome c oxidase I, ปลา, แม่น้ำปิง

Abstract

The purpose of this study is to determine the COI sequences to gather DNA barcodes for fish 5 species of economic importance: horseface loach (*Acantopsis choirorhynchos*); three spot gourami (*Trichogaster trichopterus*); rohu (*Labeo rohita*); tiger loach (*Syncrossus helodes*); and silver barb (*Barbonymus gonionotus*) from Ping River, Tak province. The average of COI sequence length for 5 fish species was 623 bp ranging from 580 to 636 bp. The genetic divergences within species was 0.000 in three spot gourami, tiger loach and silver barb, whereas, horseface loach and rohu was 0.005. The phylogenetic tree tested on 5 fish species revealed that all included species could be classified into two groups belonging to Order Cypriniformes included horseface loach, rohu, tiger loach and silver barb and Order Perciformes which was including three spot gourami.

Keywords : DNA barcoding, cytochrome c oxidase I, fish, Ping River

¹ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10900

¹ 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

*Corresponding author e-mail : dutrudeep@yahoo.com, Received : 13 January 2012; Accepted: 1 April 2013

(บทความวิจัยเรื่องนี้ได้นำเสนอการประชุมวิชาการพะเยาวิจัย ครั้งที่ 1 ในวันที่ 12-13 มกราคม 2555 ณ มหาวิทยาลัยพะเยา)

บทนำ

แม่น้ำปิง เป็นแม่น้ำสายสำคัญทางภาคเหนือของประเทศไทย มีพื้นที่รับน้ำประมาณ 6,360 ตารางกิโลเมตร โดยมีต้นน้ำอยู่ที่ดอยเชียงดาว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ ไหลลงมาทางใต้ผ่านจังหวัดลำพูน แล้วรวมกับแม่น้ำวังที่อำเภอบ้านตาก จังหวัดตาก ไหลผ่านจังหวัดกำแพงเพชร แล้วไหลมาบรรจบกับแม่น้ำน่านที่อำเภอเมืองนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์ และจากจุดนี้ไปจะเป็นต้นกำเนิดของแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำปิงมีความยาวทั้งสิ้น 658 กิโลเมตร ทำให้แม่น้ำปิงมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยเฉพาะพันธุ์ปลาที่มีความหลากหลายชนิดมาก พบว่าในแม่น้ำปิงมีพันธุ์ปลาจำนวนทั้งสิ้น 25 ชนิด [1] ปลาที่พบ ได้แก่ ปลา กต ปลา กระสูบ ปลาหม้อ ปลาตะเพียน ปลานิล เป็นต้น ซึ่งปลาเหล่านี้บางชนิดมีลักษณะ ภายนอกใกล้เคียงกันมาก จึงมีความจำเป็นต้องจำแนกชนิดของปลาเพื่อประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น การจัดการทรัพยากรประมง การอนุรักษ์พันธุ์สัตว์น้ำ เป็นต้น

การจำแนกหรือการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตมักศึกษาจากลักษณะภายนอกที่ปรากฏ ซึ่งการจำแนกชนิดในปลาก็เช่นเดียวกันมักใช้ลักษณะรูปร่างของลำตัวและครีบ สี สัน ขนาด ลักษณะของเส้นข้างลำตัว จำนวนหนวด และอื่นๆ ในการจัดจำแนกชนิดของปลา [2] ซึ่งการจำแนกลักษณะดังกล่าวสามารถทำได้กับปลาที่มีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันมากๆ เท่านั้น แต่ถ้าเป็นปลาที่มีลักษณะใกล้เคียงหรือคล้ายคลึงกันมากๆ จะไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีการดังกล่าว หรืออาจต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ หรือนักอนุกรมวิธานมาช่วยในการจำแนก ซึ่งในปัจจุบันที่มีความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มีการนำความรู้ทางด้านอณูชีววิทยามาใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ วิธีการหนึ่งที่ยอมรับใช้ได้แก่ การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA Barcoding)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดคือ เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิต เพื่อจำแนกชนิดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ของยีนบนไมโทคอนเดรีย คือ ยีน Cytochrome c oxidase I (COI) [7] ปัจจุบันนี้มีผู้นิยมใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของปลามากมาย เช่น ปลาทะเลในประเทศออสเตรเลีย [15]

ปลาการ์ตูน [13] ปลากะพงขาว [9] เป็นต้น นอกจากการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของปลาแล้ว ยังมี การศึกษาการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อีกด้วย ได้แก่ ผีเสื้อ [5] แมลงปอ [12] แมงดาทะเล [10] และนก [8] เป็นต้น

ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าจึงเป็นการศึกษารูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI (DNA barcoding) เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของปลาเศรษฐกิจ 5 ชนิดในแม่น้ำปิง จังหวัดตาก ได้แก่ ปลารากกล้วย ปลากระดี่หม้อ ปลาเยี่ยงเทศ ปลาหมูข้างลาย และปลาตะเพียนขาว เพื่อรวบรวมเป็นฐานข้อมูลของดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาในประเทศไทยต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

ทำการรวบรวมตัวอย่างปลาเศรษฐกิจจากแม่น้ำปิง จังหวัดตาก จำนวน 5 ชนิด ชนิดละ 5 ตัว ได้แก่ ปลารากกล้วย (*Acantopsis choirorhynchos*) ปลากระดี่หม้อ (*Trichogaster trichopterus*) ปลาเยี่ยงเทศ (*Labeo rohita*) ปลาหมูข้างลาย (*Syncrossus helodes*) และปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) โดยซื้อตรงจากแม่ค้าในตลาดแม่น้ำปิง จังหวัดตาก จากนั้นนำไปแช่ในเอทานอลบริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอจากครีบปลาตัวอย่างด้วยวิธี Phenol-chloroform extraction และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี 1% Agarose gel electrophoresis และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยเทคนิค PCR โดยมีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O ปริมาตร 18.75 ไมโครลิตร, 10X Taq Buffer ปริมาตร 2.25 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร, 0.01 mM Primers ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร, 0.05 mM dNTPs ปริมาตร 0.125 ไมโครลิตร, 0.625 U Taq DNA polymerase และดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาตร 0.5-2 ไมโครลิตร และมีสภาวะการทำงานทั้งหมด 35 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้ได้จากการศึกษาของ Ward et al. (2005) [15] แสดงดังตารางที่ 1

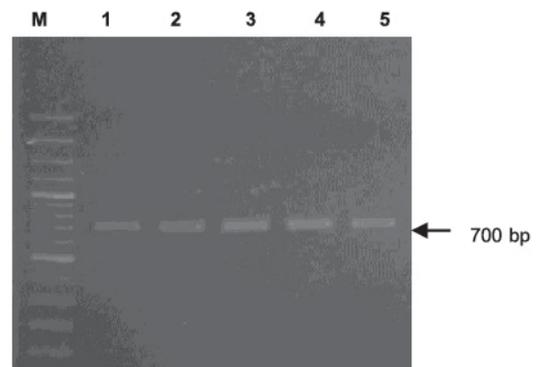
ตารางที่ 1 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ จาก 5' ไป 3'
FishF1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC
FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA
FishR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan) และตรวจสอบคุณภาพโดยวิธี 1% Agarose gel electrophoresis และนำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI โดยใช้ Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) เพื่อนำไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) [11] และฐานข้อมูล BOLD (Barcode of Life Data System; <http://www.boldsystems.org>) พร้อมทั้งเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน COI ในปลาแต่ละชนิดด้วยโปรแกรม ClustalW [14] และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Genetyx version 5 (Genetyx Corp., Japan) โดยกำหนดค่า Bootstrap ที่ 1000 replicates

ผลการศึกษา

จากการเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่าได้ผลผลิตขนาดประมาณ 700 คู่เบส ดังภาพที่ 1 และเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม Genetyx version 5 (Genetyx Corp., Japan) พบว่าปลาแต่ละชนิดมีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ต่างๆ กัน (ตารางที่ 2) โดยมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 623 คู่เบส อยู่ในช่วง 580-636 คู่เบส และทุกๆ ลำดับนิวคลีโอไทด์จะไม่พบตำแหน่งของ stop codon เลย เนื่องจากเป็นบริเวณ open reading frame (ORF) ของยีน COI ทำให้ยีนนี้สามารถทำงานได้ตามปกติ [15]



ภาพที่ 1 การตรวจสอบคุณภาพของผลผลิต PCR ด้วยวิธี 1% Agarose gel electrophoresis ในปลากระดี่หม้อ จำนวน 5 ตัว (Lane 1-5) และดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lane M)

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD (ตารางที่ 3) โดยเมื่อพิจารณาจากค่า % similarity พบว่า ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD ไม่มีข้อมูลของยีน COI ในปลาจำนวน 3 ชนิด (ร้อยละ 60) และ 2 ชนิด (ร้อยละ 40) ตามลำดับ เนื่องจากมีค่า similarity น้อยกว่า 97% [16] ซึ่งผลจากการศึกษาค้นคว้านี้ทำให้ฐานข้อมูลของยีน COI ในปลาเพิ่มจำนวนมากขึ้น

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI จากปลาเศรษฐกิจ จำนวน 5 ชนิด ที่รวบรวมได้จากแม่น้ำปิง จังหวัดตาก

ชนิดปลา	จำนวนปลา ตัวอย่าง	จำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน COI	ความยาวของยีน COI (bp)	Accession number
<i>A. choirorhynchos</i>	5	5	580	JN896630 - JN896634
<i>T. trichopterus</i>	5	5	636	JN896635 - JN896639
<i>L. rohita</i>	5	5	635	JN896640 - JN896644
<i>S. helodes</i>	5	4	632	JN896645 - JN896648
<i>B. gonionotus</i>	5	3	636	JN896649 - JN896651

จากการศึกษา Multiple sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโนของยีน COI ทั้งหมดในปลาแต่ละชนิด ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่า ปลากระดี่หม้อ (5 ตัวอย่าง) ปลาหมอข้างลาย (4 ตัวอย่าง) และปลาตะเพียน (3 ตัวอย่าง) ไม่มีความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนภายในชนิดเลย (ภาพที่ 2) ในขณะที่ปลารากกล้วย (5 ตัวอย่าง) และปลาอีสกเทศ (5 ตัวอย่าง) จะมีความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนภายในชนิดเท่ากับ 0.005 (ตารางที่ 4) และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนระหว่างปลาต่างชนิดกัน พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของปลาตะเพียนขาวมีความแตกต่างจากปลารากกล้วยมากที่สุด คือ 2.618 ทั้งนี้เนื่องจากเป็นปลาต่างครอบครัวกัน กล่าวคือ ปลาตะเพียนขาวจัดอยู่ในครอบครัว Cyprinidae และปลารากกล้วยจัดอยู่ในครอบครัว Cobitidae

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดของยีน COI ของปลาทั้ง 5 ชนิดมาสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA version 3.1 [11] พบว่า สามารถแบ่งปลาออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มของปลาที่อยู่ในอันดับ Cypriniformes ได้แก่ ปลารากกล้วย ปลาอีสกเทศ ปลาหมอข้างลาย และปลาตะเพียนขาว และอีกกลุ่มหนึ่งก็คือ ปลาในอันดับ Perciformes ได้แก่ ปลากระดี่หม้อ

วิจารณ์และสรุปผล

ในการเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่า ปลาทุกชนิดสามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ ยกเว้นปลาหมอข้างลาย จำนวน 1 ตัวอย่าง และปลาตะเพียนขาว จำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ไม่สามารถเพิ่ม

ปริมาณยีนได้ โดยอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากดีเอ็นเอถูกย่อยสลาย [16] ในขั้นตอนของการสกัดดีเอ็นเอ [6] ก็ได้

จากการศึกษาของ Ward *et al.* (2005) [15] พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยเทคนิค PCR จะได้ผลผลิตที่มีขนาดเท่ากับ 655 คู่เบส ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ที่ได้ความยาวเฉลี่ยประมาณ 623 คู่เบส โดยมีสาเหตุมาจากทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กระทำเพียงทิศทางเดียวเท่านั้น คือ ทิศทางด้านปลาย 5' ของผลผลิต ในขณะที่การศึกษาของ Ward *et al.* (2005) [15] เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้านของผลผลิต คือ ทิศทางทั้งด้านปลาย 5' และ 3' จึงทำให้การศึกษาค้นนี้ได้ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI สั้นกว่าการศึกษาอื่นๆ

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree จากลำดับกรดอะมิโนของยีน COI ของปลาทั้ง 5 ชนิด จะเห็นได้ว่ายีนนี้มีประสิทธิภาพในการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตและสอดคล้องกับระบบอนุกรมวิธานของปลา นอกจากนี้ยังสามารถแยกกลุ่มของปลาชนิดเดียวกันออกจากชนิดอื่นๆ ได้ 100 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมา เช่น ปลาการ์ตูน [13] ปลากะพงขาว [9] และปลาในลุ่มน้ำอะเมซอน [4] เป็นต้น

ดังนั้นดีเอ็นเอบาร์โค้ดจึงเป็นเครื่องมือทางอณูชีววิทยาที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถแยกความแตกต่างของปลาทั้ง 5 ชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาค้นนี้สามารถนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลของปลาในประเทศไทยต่อไป

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลา 5 ชนิดที่รวบรวมได้จากแม่น้ำปิง จังหวัดตาก บนฐานข้อมูล GenBank และ BOLD (ข้อมูล ณ เดือนมกราคม 2555)

Accession no.	ชนิดปลา	การจำแนกชนิดบนฐานข้อมูล	
		GenBank	BOLD
JN896630	<i>Acantopsis choirorhynchus</i>	<i>Tribolodon hakonensis</i> (85%)	-
JN896631	<i>Acantopsis choirorhynchus</i>	<i>Tribolodon hakonensis</i> (85%)	-
JN896632	<i>Acantopsis choirorhynchus</i>	<i>Tribolodon hakonensis</i> (85%)	-
JN896633	<i>Acantopsis choirorhynchus</i>	<i>Tribolodon hakonensis</i> (85%)	-
JN896634	<i>Acantopsis choirorhynchus</i>	<i>Tribolodon hakonensis</i> (85%)	-
JN896635	<i>Trichogaster trichopterus</i>	<i>Trichogaster</i> sp. (94%)	<i>Trichogaster trichopterus</i> (99.84%)
JN896636	<i>Trichogaster trichopterus</i>	<i>Trichogaster</i> sp. (95%)	<i>Trichogaster trichopterus</i> (100%)
JN896637	<i>Trichogaster trichopterus</i>	<i>Trichogaster</i> sp. (95%)	<i>Trichogaster trichopterus</i> (100%)
JN896638	<i>Trichogaster trichopterus</i>	<i>Trichogaster</i> sp. (95%)	<i>Trichogaster trichopterus</i> (100%)
JN896639	<i>Trichogaster trichopterus</i>	<i>Trichogaster</i> sp. (95%)	<i>Trichogaster trichopterus</i> (100%)
JN896640	<i>Labeo rohita</i>	<i>Labeo rohita</i> (99%)	<i>Labeo rohita</i> (100%)
JN896641	<i>Labeo rohita</i>	<i>Labeo rohita</i> (99%)	<i>Labeo rohita</i> (100%)
JN896642	<i>Labeo rohita</i>	<i>Labeo rohita</i> (99%)	<i>Labeo rohita</i> (100%)
JN896643	<i>Labeo rohita</i>	<i>Labeo rohita</i> (99%)	<i>Labeo rohita</i> (100%)
JN896644	<i>Labeo rohita</i>	<i>Labeo rohita</i> (99%)	<i>Labeo rohita</i> (99.84%)
JN896645	<i>Syncrossus helodes</i>	<i>Bangana tonkinensis</i> (83%)	-
JN896646	<i>Syncrossus helodes</i>	<i>Bangana tonkinensis</i> (83%)	-
JN896647	<i>Syncrossus helodes</i>	<i>Bangana tonkinensis</i> (83%)	-
JN896648	<i>Syncrossus helodes</i>	<i>Bangana tonkinensis</i> (83%)	-
JN896649	<i>Barbonymus gonionotus</i>	<i>Barbonymus gonionotus</i> (99%)	<i>Barbonymus gonionotus</i> (99.53%)
JN896650	<i>Barbonymus gonionotus</i>	<i>Barbonymus gonionotus</i> (99%)	<i>Barbonymus gonionotus</i> (99.53%)
JN896651	<i>Barbonymus gonionotus</i>	<i>Barbonymus gonionotus</i> (99%)	<i>Barbonymus gonionotus</i> (99.68%)

ตารางที่ 4 การศึกษาระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับกรดอะมิโนของยีน COI ระหว่างปลาแต่ละชนิด

	A. choirorhynchus	T. trichopterus	L. rohita	S. helodes	B. gonionotus
<i>A. choirorhynchus</i>	0.005				
<i>T. trichopterus</i>	2.424	0.000			
<i>L. rohita</i>	2.485	2.039	0.005		
<i>S. helodes</i>	2.485	2.079	0.032	0.000	
<i>B. gonionotus</i>	2.618	0.037	2.079	2.122	0.000

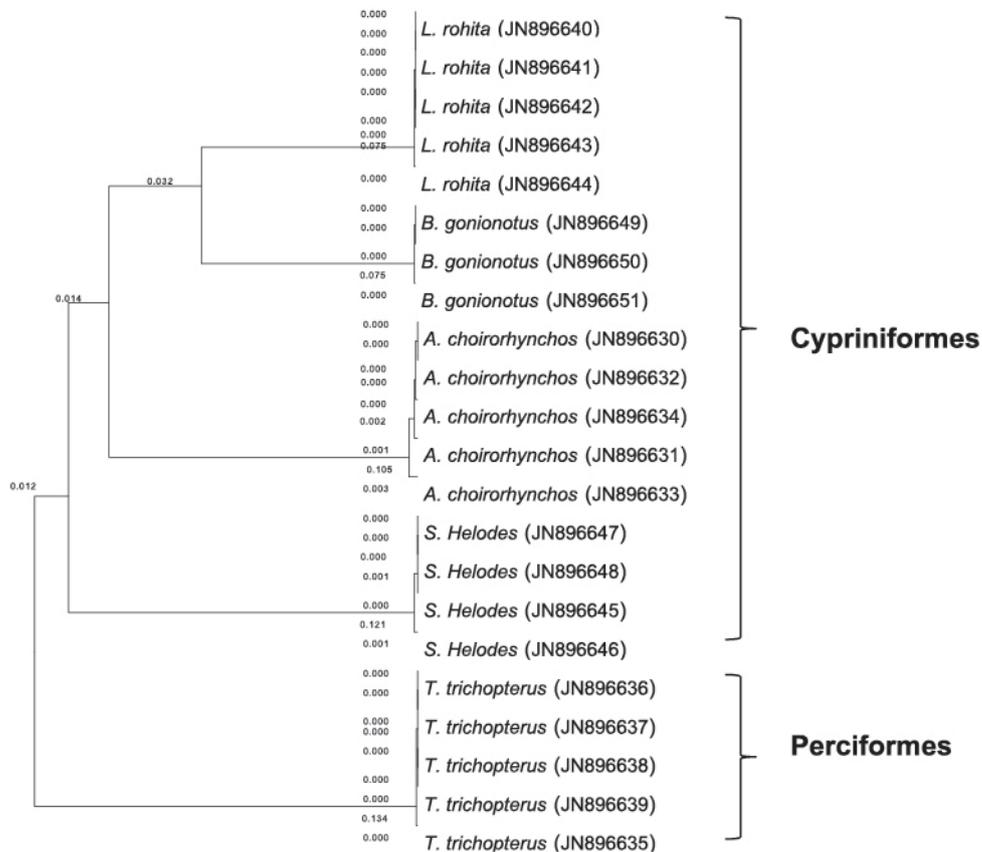
JN896635	GTALSLLIRAELSQPGALLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFNWLVLPMIGA	60
JN896636	GTALSLLIRAELSQPGALLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFNWLVLPMIGA	60
JN896637	GTALSLLIRAELSQPGALLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFNWLVLPMIGA	60
JN896638	GTALSLLIRAELSQPGALLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFNWLVLPMIGA	60
JN896639	GTALSLLIRAELSQPGALLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFNWLVLPMIGA	60

JN896635	PDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEAGAGTGWTVYPPLASNLAHAGASVDLTIFS	120
JN896636	PDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEAGAGTGWTVYPPLASNLAHAGASVDLTIFS	120
JN896637	PDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEAGAGTGWTVYPPLASNLAHAGASVDLTIFS	120
JN896638	PDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEAGAGTGWTVYPPLASNLAHAGASVDLTIFS	120
JN896639	PDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEAGAGTGWTVYPPLASNLAHAGASVDLTIFS	120

JN896635	LHLAGVSSILGAINFITTIINMKPPAISQYQTPLFVWAVMITAVLLLLSLPVLAAGITML	180
JN896636	LHLAGVSSILGAINFITTIINMKPPAISQYQTPLFVWAVMITAVLLLLSLPVLAAGITML	180
JN896637	LHLAGVSSILGAINFITTIINMKPPAISQYQTPLFVWAVMITAVLLLLSLPVLAAGITML	180
JN896638	LHLAGVSSILGAINFITTIINMKPPAISQYQTPLFVWAVMITAVLLLLSLPVLAAGITML	180
JN896639	LHLAGVSSILGAINFITTIINMKPPAISQYQTPLFVWAVMITAVLLLLSLPVLAAGITML	180

JN896635	LTDRNLNTTFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHP	212
JN896636	LTDRNLNTTFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHP	212
JN896637	LTDRNLNTTFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHP	212
JN896638	LTDRNLNTTFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHP	212
JN896639	LTDRNLNTTFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHP	212

ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนของยีน COI ในปลากระต่าย จำนวน 5 ตัว โดยลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันจะมีสัญลักษณ์ดอกจัน (*) และมี Accession numbers คือ JN896635 - JN896639



ภาพที่ 3 Phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของยีน COI จากปลาจำนวน 5 ชนิดที่รวบรวมได้จากแม่น้ำปิง จังหวัดตาก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และขอขอบคุณหัวหน้าห้องปฏิบัติการกลาง มหาวิทยาลัยพะเยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ชวลิต วิทยานนท์. คู่มือหาชื่อปลา. กรุงเทพฯ: บริษัท แปลน ฟรินดิง จำกัด; 2542.
2. สุภาพร สุกสีเหลือง. มินวิทยา. กรุงเทพฯ: บริษัท พิมพ์ดีจำกัด; 2542.
3. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215: 403-410.
4. Ardura A, Linde AR, Moreira JC, Garcia-Vazquez E. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation* 2010; 143: 1438-1443.
5. Dinca AV, Zakharov EV, Hebert PDN, Vila R. Complete DNA barcode reference library for a country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. *Proc. R. Soc. B.* 2011; 278: 347-355.
6. Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Hebert PDN. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* 2006; 6: 959-964.
7. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 2003; 270: 313-321.
8. Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology* 2004; 2(10): 1657-1663.
9. John A, Prasannakumar C, Lyla LS, Khan SA, Jalal KCA. DNA Barcoding of *Lates calcarifer* (Bloch, 1970). *Res. J. Biol. Sci.* 2010; 5(6): 414-419.
10. Kamaruzzaman BY, John BA, Zaleha K, Jalal KCA. Molecular Phylogeny of Horseshoe Crab. *Asian J. Biotechnol.* 2011: 302-309.
11. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 2004; 5: 150-163.
12. Rach J, DeSalle R, Sarkar IN, Schierwater B, Hadrys H. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proc. Biol. Sci.* 2008; 275(1632): 237-47.
13. Steinke D, Zemplak TS, Hebert PDN. Barcoding Nemo: DNA-Based Identifications for the Ornamental Fish Trade. *PLoS ONE.* 2009; 4(7): 1-5.
14. Thomson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: 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, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2005: 1-11.
16. Wong EHK, Hanner RH. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International* 2008; 41: 828-837.