

# ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาช่อนสกุล *Channa* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP

## Genetic diversity of snakehead fish genus *Channa* in northeastern Thailand using PCR-RFLP technique

มณีรัตน์ ศิริสวัสดิ์,<sup>1</sup> บังอร แถวโนนงิ้ว,<sup>2</sup> บังอร กองอิม<sup>2</sup>

Maneerat Sirisawat,<sup>1</sup> Bungorn Thaewnon-ngiw,<sup>2</sup> Bangon Kongim<sup>2</sup>

Received: 1 November 2014 ; Accepted: 4 January 2015

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาช่อนสกุล *Channa* 4 ชนิด คือ *Channa striata*, *C. micropeltes*, *C. gachua* และ *C. lucius* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP เก็บตัวอย่างปลาจำนวนทั้งหมด 112 ตัวจาก 14 จังหวัด สกัดดีเอ็นเอจากกล้ามเนื้อปลาแต่ละตัวด้วยวิธี CTAB-Phenol: Chloroform Proteinase K และคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ COI สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดี ซึ่งให้ผลผลิตพีซีอาร์ในปลาทั้ง 4 ชนิด มีขนาดเท่ากับ 710 bp เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด *Alu* I, *Hha* I, *Hinf* I และ *Taq* I พบว่าได้ single haplotypes ทั้งหมด 14, 9, 8 และ 7 รูปแบบ ตามลำดับ เมื่อนำ single haplotypes ที่ได้มาสร้างเป็น composite haplotypes ได้ทั้งหมด 55 รูปแบบ ซึ่งรูปแบบ AAAA, LGEF, KFBC และ MHHA พบมากที่สุด คือ 8.33, 38.46, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ใน *C. striata*, *C. micropeltes*, *C. gachua* และ *C. lucius* ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นพบว่า composite haplotypes ที่ได้ไม่มีการทับซ้อนกันเลย เมื่อนำรูปแบบการตัดมาสร้าง UPGMA dendrogram โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc version 2.10p พบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ *Oxyeleotris marmorata* ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบแยกออกจากปลาช่อนสกุล *Channa* อย่างชัดเจน กลุ่มที่ 2 คือ ปลาช่อนสกุล *Channa* ทั้งหมด ซึ่งแยกได้สองกลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย *C. striata*, *C. micropeltes* และ *C. lucius* กลุ่มย่อยที่ 2 เป็น *C. gachua* เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ซึ่งทั้งสองกลุ่มใหญ่และสองกลุ่มย่อยของกลุ่มที่ 2 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 59 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** ปลาช่อน ความหลากหลายทางพันธุกรรม COI *Channa* PCR-RFLP

### Abstract

The objective of this research was to investigate genetic diversity of four species of snakehead fish genus *Channa* as *Channa striata*, *C. micropeltes*, *C. gachua* and *C. lucius* in northeastern Thailand using PCR-RFLP technique. A total of 112 samples were collected from 14 provinces. Genomic DNA was extracted from the muscle of each individual of specimens with CTAB-Phenol: Chloroform Proteinase K method and screened appropriate primers for PCR. The PCR product of COI primers showed 710 bp in four species. These PCR products were digested with *Alu* I, *Hha* I, *Hinf* I and *Taq* I restriction enzymes and found patterns of single haplotypes as 14, 9, 8 and 7, respectively. The composite haplotypes were constructed from single haplotypes of four enzymes and showed all 55 patterns. The highest percentages of composite haplotypes patterns in *C. striata*, *C. micropeltes*, *C. gachua* and *C. lucius* were 8.33, 38.46, 50 and 100, respectively.

<sup>1</sup> นิสิตปริญญาโท, <sup>2</sup> ผู้ช่วยศาสตราจารย์, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150,

<sup>1</sup> Master degree student, <sup>2</sup> Assist. Prof., Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham Province 44150, Thailand.

\* Corresponding author; Bungorn Thaewnon-ngiw, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham Province 44150, Thailand. E-mail: ttbungorn@hotmail.com

50 and 100 percentages in AAAA, KFBC, LGEF and MHHA, respectively. Moreover, the composite haplotypes showed non overlapping in four species. The UPGMA dendrogram of *restriction haplotype* was constructed using NTSYSpc version 2.10p. The polymorphism of *Alu* I, *Hha* I, *Hinf* I and *Taq* I digested COI products were evaluated and found that the fishes were divided into 2 groups: group 1 was out group (*Oxyeleotris marmorata*) that separated clearly from the genus *Channa*, whereas group 2 consisted of all genus *Channa* which can be divided into 2 subgroups: subgroup 1 consisted of *C. striata*, *C. lucius* and *C. micropeltes* and subgroup 2 was only *C. gachua*. The similarity coefficient between 2 groups and subgroups of group 2 exhibited approximately 59 and 60 percentages, respectively.

**Keywords:** snakehead fish, genetic diversity, COI, *Channa*, PCR RFLP

## บทนำ

ปลาช่อนเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจนิยมบริโภคอย่างแพร่หลาย เพราะเป็นแหล่งโปรตีนที่มีราคาถูก มีรสชาติดี เนื้อแน่น นุ่มหวาน และสามารถประกอบอาหารได้หลากหลาย<sup>1</sup> ส่งผลให้ปลาช่อนเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น ปลาช่อนสดมีราคากิโลกรัมละ 120-190 บาท และปลาช่อนแดดเดียวหรือปลาช่อนตากแห้งราคากิโลกรัมละ 200 บาท<sup>2</sup> ปลาช่อนจัดอยู่ในวงศ์ Channidae มีรูปร่างเรียวยาวทรงกระบอก ส่วนหัวโตจะงอยปากยื่น ปากกว้าง ตาโต มีฟันเป็นซี่ยาวบนขากรรไกร หัวด้านบนราบลำตัวค่อนข้างกลม ครีบหลังและครีบก้นยาว ครีบท้องปลายมน ครีบอกใหญ่ ครีบท้องเล็ก เกือบมีขนาดใหญ่มีขอบเรียบ ปลาช่อนมีอวัยวะช่วยหายใจเป็นหลอดเนื้อสีแดงอยู่ในคอหอย เรียกว่า suprabranchia จึงสามารถอยู่ในแหล่งน้ำที่มีออกซิเจนต่ำได้ แพร่พันธุ์โดยการวางไข่โดยตัวผู้และตัวเมียช่วยกันปรับพื้นที่น้ำตื้นๆ ให้เป็นแปลงกลม แล้ววางไข่ลอยเป็นแพ และจะช่วยกันดูแลไข่จนไข่ฟักเป็นตัวแล้วเลี้ยงลูกปลาจนโตเรียกว่า “ลูกครอก” ซึ่งมีสีแดงหรือส้ม รูปร่างคล้ายพ่อแม่ จากนั้นจึงปล่อยให้หากินเอง พบในเขตร้อนของทวีปเอเชียและแอฟริกา ปัจจุบันพบทั้งสิ้น 40 ชนิดแบ่ง เป็น 2 สกุล คือ *Channa* พบจำนวน 36 ชนิดในทวีปเอเชีย และ *Parachanna* ซึ่งพบในทวีปแอฟริกาจำนวน 4 ชนิดสำหรับในประเทศไทย พบ 7 ชนิด คือ ปลาช่อน (*C. striata*) ปลาชะโด (*C. micropeltes*) ปลาก้าง (*C. gachua*) ปลากระสง (*C. lucius*) ปลาช่อนงูเห่า (*C. marulius*) ปลาช่อนข้าหลวง (*C. maruloides*) และปลาช่อนดำหรือพรุ (*C. melasoma*) ปลาขนาดเล็กสุดคือ ปลาก้าง ซึ่งมีขนาดโตเต็มที่ไม่เกิน 1 ฟุต และใหญ่ที่สุดคือ ปลาชะโด ที่ใหญ่ได้ถึง 1-1.5 เมตร<sup>3</sup> เนื่องจากอิทธิพลทางภูมิศาสตร์ทั้งลักษณะ ภูมิประเทศ ภูมิอากาศ ลมมรสุมปริมาณน้ำฝน และสภาพชลประทานของแหล่งน้ำ ทั้งสภาพน้ำเปรี้ยวหรือเป็นกรดสูง<sup>4</sup> เป็นอิทธิพลและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมมีผลต่อลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ของปลาช่อน<sup>5</sup> อีกทั้งปลาช่อนยังสามารถนำมาเป็นตัวบ่งชี้ความสมดุลทางธรรมชาติที่<sup>6</sup>

การเพาะเลี้ยงปลาช่อนได้รับความสนใจเป็นอย่างมากและอัตราการบริโภคยังมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ จากรายงานทางสถิติของกรมประมง ในปี พ.ศ. 2555 พบว่าปริมาณปลาช่อนที่จับจากแหล่งน้ำธรรมชาติมีปริมาณเท่ากับ 24.7 พันตัน แต่ข้อมูลปริมาณการจับจากธรรมชาติและการเพาะเลี้ยงในปีเดียวกันมีค่าเท่ากับ 28.8 พันตัน แสดงถึงจำนวนการเพาะเลี้ยงที่น้อย<sup>7</sup> ทำให้ผลผลิตส่วนใหญ่ไม่เพียงพอต่อท้องตลาดจึงมีความต้องการจากแหล่งน้ำธรรมชาติมากขึ้นตามไปด้วย เป็นผลให้ปลาช่อนในธรรมชาติมีจำนวนลดลง ประกอบกับการเสื่อมโทรมของถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติยังมีโอกาสที่ปลาช่อนจะตกอยู่ในสภาวะถูกคุกคามได้ จากข้อมูลทางสถิติปี 2555 มูลค่าเพิ่มของผลผลิตจากปลาช่อนที่จับได้ในแหล่งธรรมชาติและการเพาะเลี้ยงมีมูลค่าสูงถึง 2,316 ล้านบาท<sup>7</sup> การเพาะเลี้ยงปลาช่อนเพื่อเพิ่มผลผลิตและตอบสนองต่อความต้องการของการบริโภคอย่างเพียงพอ จะช่วยลดปริมาณการจับปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติได้เป็นอย่างดี ข้อมูลทางพันธุกรรมถือเป็นข้อมูลที่สำคัญอย่างหนึ่งที่จะช่วยในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาช่อนจึงมีความสำคัญในการวางแผนการอนุรักษ์ และการปรับปรุงพันธุ์เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงรวมทั้งสามารถพัฒนาในเชิงพาณิชย์

อนันต์ เคนท้าว<sup>8</sup> วิเคราะห์ลักษณะมอร์โฟเมตริกส์และความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของปลาสกุล *Channa* 3 ชนิด 8 กลุ่มประชากรได้แก่ ปลาช่อน ปลาก้าง และปลากระสง พบว่ามีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาทั้งภายในชนิดและระหว่างชนิดและ Rahim และคณะ<sup>5</sup> ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *C. striata* ในคาบสมุทรมลายูด้วยเทคนิค PCR-RFLP ของยีน mtDNA *cyt b* พบว่ามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมโดยมีอิทธิพลจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมและภูมิศาสตร์ ทั้งนี้ในรายงานการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปลาสกุล *Channa* มีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาสูง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยถือเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางภูมิศาสตร์อย่างมากจึงเหมาะ

สมที่จะทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลา  
ช่อนในสกุล *Channa* โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP เนื่องจาก  
สะดวก รวดเร็ว ไม่ใช้สารกัมมันตรังสี ใช้สกัดดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย  
และยังสามารถบอกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เป็น  
homozygotes และ heterozygotes ได้

## วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของ  
ปลาในสกุล *Channa* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย  
โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP

## วิธีการวิจัย

### 1. การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างปลาสกุล *Channa*  
จากแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น ห้วย หนอง คลอง บึง ในพื้นที่ภาค  
ตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 14 จังหวัด ได้แก่  
จังหวัดนครพนม มุกดาหาร บึงกาฬ สกลนคร กาฬสินธุ์  
มหาสารคาม อุดรธานี อุบลราชธานี หนองบัวลำภู หนองคาย  
อำนาจเจริญ บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ และชัยภูมิ (Figure 1) ศึกษา  
ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและจัดจำแนกชนิดของปลาใน  
สกุล *Channa* โดยศึกษาลักษณะแถบสีของลำตัว ความยาว  
ของลำตัว ลักษณะของหาง ลักษณะการเรียงตัวของเกล็ด  
บริเวณหัวและใต้หาง จำนวนเกล็ดบริเวณสันข้างลำตัว  
ลักษณะของเกล็ด และลักษณะบริเวณคอคอด ตามวิธีการของ  
Smith<sup>9</sup>; Courtenay and Williams<sup>3</sup>; Vishwanath and  
Geetakumari<sup>10</sup>; อนันต์ เคนท้าว<sup>8</sup>



**Figure 1** Map of northeastern Thailand showing  
sampling sites of genus *Channa*

สกัด genomic DNA จากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของ  
ปลา ด้วยวิธี CTAB Phenol Chloroform Proteinase  
K Method ตามวิธีการของ Thaewnon-ngiw และคณะ<sup>11</sup>  
โดยทำการตัดเนื้อเยื่อของปลาจากตัวอย่างปริมาตร 0.5 cm<sup>3</sup>  
ใส่ใน centrifuge tube บดให้ละเอียดแล้ว นำไปเติม CTAB  
buffer เติม Proteinase K (10 mg/ml) นำไป incubated  
ที่ 55-60 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติม Phenol:  
Chloroform: Isoamyl alcohol (25: 24: 1) กลับหลอดไปมา  
ให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว  
12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาของเหลวที่แยกชั้นอยู่  
ด้านบนใส่หลอด centrifuge tube หลอดใหม่ จากนั้นเติม  
Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1) กลับหลอดไปมาให้เข้า  
กันเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว  
12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาของเหลวที่แยกชั้นอยู่  
ด้านบนใส่ในหลอด centrifuge tube หลอดใหม่ เติม absolute  
ethanol ที่เย็นจัด 2 เท่าของปริมาตรรวม ผสมให้เข้ากันแล้ว  
ตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง หรือ overnight ที่อุณหภูมิ -20 องศา  
เซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่  
ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดหรือเทส่วนบน  
ทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม ethanol 70 เปอร์เซ็นต์  
แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว  
12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง ดูดส่วนบนทิ้ง  
คว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูประมาณ 30 นาที แล้วเปิดฝา  
หลอดขึ้นเพื่อให้เอทานอลระเหยออกให้หมด แล้วละลาย  
ดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCL pH 7.4 และ 1 mM  
EDTA) นำ DNA solution ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา  
เซลเซียส เพื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธี agarose  
gel electrophoresis ความเข้มข้น agarose 0.8 เปอร์เซ็นต์  
กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และตรวจสอบความ  
เข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยวิธี UV spectrophotometry  
ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร แล้วหา  
อัตราส่วนระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> nm

### 2. ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ genomic DNA ด้วย เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยใช้  
ไพรเมอร์ 7 ไพรเมอร์ (LSU2-3, LSU2-4, 16S rDNA, 18S  
rDNA, 28S rDNA, COI และ COI Fish<sup>12</sup>) โดยทำปฏิกิริยาใน  
ปริมาตร 25 µl ซึ่งประกอบด้วย dH<sub>2</sub>O, 0p buffer, 2 mM  
MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 1 U/µl Taq DNA polymerase, 0.4  
µM Primer [F] และ [R] และ DNA sample (50 ng/µl) ตาม  
วิธีการของ Thaewnon-ngiw และคณะ<sup>11</sup> แล้วทำการเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิ Initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที annealing ที่ 54 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1.10 นาที และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตามวิธีของ Lakra และคณะ<sup>13</sup> จากนั้นนำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR มาทำการตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น agarose 1 เปอร์เซ็นต์ กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำเอาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดีไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

### 3. การตัดโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

นำ PCR product มาคัดเลือกหาเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 14 ชนิด ได้แก่ *Alu I*, *Hinf I*, *Pvu II*, *Sau 3AI*, *Bgl I*, *Dde I*, *Hae III*, *Hha I*, *Ssp I*, *Taq I*, *Hind III*, *Eco RI*, *Pst I* และ *Sma I* โดยมีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาดังนี้ ใช้  $\text{dH}_2\text{O}$ , 10X buffer, 10X BSA, 40 mM spermidine, (10U/ $\mu\text{l}$ ) restriction enzyme ผสมให้เข้ากันแล้วเติม PCR product นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ยกเว้น *Taq I* บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ *Sma I* บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลการตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น agarose 2 เปอร์เซ็นต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromide (10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) นาน 10 นาที ล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกลั่น 5 นาที แล้วนำไปตรวจดูใต้แสง UV และบันทึกภาพ แล้วคัดเลือกเอ็นไซม์ที่เหมาะสมไปใช้ในการวิเคราะห์โดยเทคนิค PCR-RFLP ต่อไป

### 4. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำรูปแบบของโมเลกุลดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc Version 2.10p เพื่อสร้างเป็น dendrogram

## ผลการศึกษา

### 1. ผลการเก็บตัวอย่าง และการสกัดดีเอ็นเอของปลาสกุล *Channa*

เก็บตัวอย่างปลาสกุล *Channa* จากแหล่งน้ำธรรมชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบปลาสกุล *Channa* จำนวน 112 ตัวอย่างที่เก็บได้จาก 14 จังหวัด นำมาจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้ 4 ชนิดคือ *C. striata*, *C. micropeltes*, *C. gachua* และ *C. lucius* และได้ทำการเก็บตัวอย่างปลาบู่ทราย (*Oxyeleotris marmorata*) มาเป็นตัวแทนเปรียบเทียบ (out group) ในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันกับปลาในสกุล *Channa* มากที่สุด และจัดอยู่ในอันดับ Perciformes เหมือนกัน

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อปลาสกุล *Channa* ทั้ง 4 ชนิด และตัวอย่างเปรียบเทียบ มีการแตกหักอยู่มากและมีการปนเปื้อนของโปรตีนและอาร์เอ็นเออยู่มาก จึงต้องกำจัดพวกโปรตีนและอาร์เอ็นเออีกรอบ โดยนำหลอดที่มีการปนเปื้อนมาย่อยด้วย Proteinase K และ RNase แล้วทำการสกัดซ้ำอีกครั้ง เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพ พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนลดลง และเมื่อวัดค่าดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยวิธี UV Spectrophotometer ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้ในครั้งแรกมีค่าประมาณ 1.3-1.9 และเมื่อสกัดซ้ำอีกครั้งพบว่าดีเอ็นเอมีค่าประมาณ 1.6-1.7 ซึ่งแสดงถึงดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

### 2. ผลการเพิ่มปริมาณ genomic DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำ genomic DNA ที่ได้มาทำการคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จาก 7 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ COI Fish (Forward = 5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC 3' และ Reverse = 5' TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA 3')<sup>12</sup> สามารถเพิ่มปริมาณ genomic DNA ได้ดีที่สุด โดยพบแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดเท่ากับ 710 bp ซึ่งเท่ากันทุกตัวในปลาสกุล *Channa* (Figure 2) แต่ไพรเมอร์อื่นๆ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาในกลุ่ม *Channa* บางชนิดได้ อาจเกิดจากการจับกันอย่างไม่จำเพาะ non-specific ของดีเอ็นเอแม่แบบ กับ primer

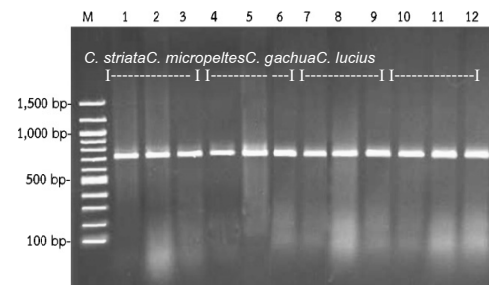
### 3. ผลการตัดโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

จากการนำโมเลกุลของดีเอ็นเอของปลาสกุล *Channa* ทั้ง 4 ชนิด และตัวอย่างเปรียบเทียบที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ COI Fish มาตัดเลือกหามาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม 14 ชนิด พบว่ามีเอนไซม์ตัดจำเพาะ 10 ชนิดคือ *Alu I*, *Bgl I*, *Dde I*, *Hae III*, *Hha I*, *Hind III*, *Hinf I*, *Pst I*, *Sau 3A I* และ *Taq I* สามารถตัดโมเลกุลดีเอ็นเอของปลาทั้ง 4 ชนิดและปลาตัวเปรียบเทียบได้ แต่ที่ตัดแล้วก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมพบ 4 ชนิด คือ *Alu I*, *Hha I*, *Hinf I* และ *Taq I* ผลการตัดพบว่าสามารถตัดโมเลกุลของ PCR product จากไพรเมอร์ดังกล่าวได้ single haplotypes 14(A-N), 9(A-I), 8(A-H) และ 7(A-G) รูปแบบตามลำดับ (Figure 3 และ Table 1-4) จากนั้นนำค่า single haplotypes ที่ได้มาสร้างเป็น composite haplotypes พบทั้งหมด 55 รูปแบบ โดยพบในปลา *C. striata* 43 รูปแบบ พบรูปแบบ AAAA มากที่สุด รองลงมาพบรูปแบบ ACAA, GCAA, DBDB และ DBDA มีค่าความถี่ของ composite haplotypes เท่ากับ 8.33 และ 5.56 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในปลา *C. micropeltes* พบ 7 รูปแบบโดยพบรูปแบบ KFBC มากที่สุด รองลงมาพบรูปแบบ JFAC มีค่าความถี่ของ composite haplotypes เท่ากับ 38.46 และ 23.08 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในปลา *C. gachua* ได้ 3 รูปแบบ พบรูปแบบ LGEF มากที่สุด และรองลงมาพบรูปแบบ LGEC มีค่าความถี่ของ composite haplotypes เท่ากับ 50 และ 42.86 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในปลา *C. lucius* ได้ composite haplotypes รูปแบบเดียวเท่านั้นคือ รูปแบบ MHHA มีค่าความถี่ของ composite

haplotypes เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และในตัวอย่างเปรียบเทียบพบรูปแบบ NIDA มีความถี่ของ composite haplotypes เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

### 4. ผลการวิเคราะห์รูปแบบโมเลกุลดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.10p

นำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาสกุล *Channa* พบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 คือ *O. marmorata* และ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยปลาสกุล *Channa* ทั้งหมดซึ่งสามารถแยกได้สองกลุ่มย่อย คือกลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย *C. striata*, *C. micropeltes* และ *C. lucius* กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย *C. gachua* ซึ่งทั้งสองกลุ่มใหญ่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 59 เปอร์เซ็นต์ และค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างกลุ่มย่อยทั้งสองกลุ่มของกลุ่มที่ 2 นั้นมีค่าเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4)



**Figure 2** The PCR products of four species of *Channa* using COI primers.

**Table 1** Restriction fragment patterns of COI in *Channa* and outgroup after *Alu* I digestion

[illegible]

**Table 2** Restriction fragment patterns of COI in *Channa* and outgroup after *Hha* I digestion

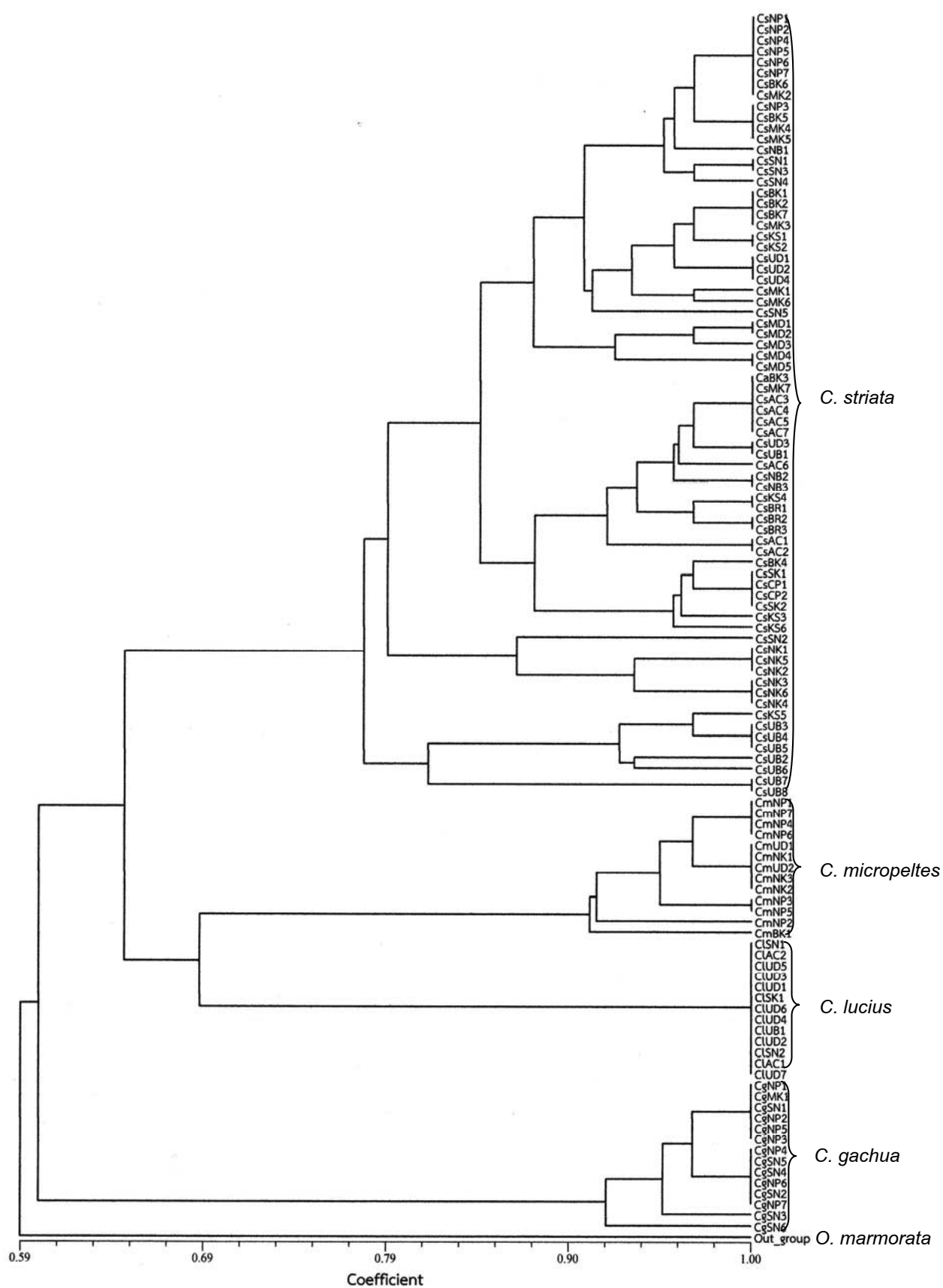
| Restriction patterns (Single haplotypes) |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| COI- <i>Hha</i> I (bp)                   |     |     |     |     |     |     |     |     |
| A                                        | B   | C   | D   | E   | F   | G   | H   | I   |
| -                                        | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 710 |
| 600                                      | 600 | 600 | 600 | 600 | -   | -   | 600 | -   |
| -                                        | -   | -   | -   | -   | 500 | 500 | -   | -   |
| -                                        | -   | -   | -   | -   | -   | 260 | -   | -   |
| 250                                      | -   | -   | 250 | -   | 250 | -   | 250 | -   |
| -                                        | -   | -   | -   | -   | -   | 200 | -   | -   |
| 130                                      | 130 | -   | 130 | 130 | -   | -   | -   | -   |
| -                                        | -   | -   | 70  | 70  | -   | -   | -   | -   |

**Table 3** Restriction fragment patterns of COI in *Channa* and outgroup after *Hinf* I digestion

| Restriction patterns (Single haplotypes) |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| COI- <i>Hinf</i> I (bp)                  |     |     |     |     |     |     |     |
| A                                        | B   | C   | D   | E   | F   | G   | H   |
| -                                        | -   | 710 | 710 | -   | -   | -   | 710 |
| -                                        | -   | -   | -   | -   | -   | 600 | -   |
| 500                                      | 500 | -   | -   | -   | -   | -   | 500 |
| -                                        | -   | -   | -   | -   | 450 | -   | -   |
| -                                        | -   | -   | -   | 370 | 370 | -   | -   |
| -                                        | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| -                                        | 250 | -   | -   | 250 | 250 | -   | -   |
| 220                                      | 220 | 220 | -   | 220 | 220 | 220 | 220 |
| -                                        | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 90  |
| -                                        | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 50  |

**Table 4** Restriction fragment patterns of COI in *Channa* and outgroup after *Taq* I digestion

| Restriction patterns (Single haplotypes) |     |     |     |     |     |     |
|------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| COI- <i>Taq</i> I (bp)                   |     |     |     |     |     |     |
| A                                        | B   | C   | D   | E   | F   | G   |
| -                                        | -   | 600 | 600 | 600 | 600 | -   |
| -                                        | -   | -   | -   | -   | -   | 550 |
| 310                                      | 310 | -   | 310 | -   | -   | -   |
| 230                                      | 230 | -   | 230 | -   | -   | -   |
| -                                        | 100 | -   | -   | -   | 100 | -   |
| -                                        | 70  | -   | -   | 70  | -   | -   |



**Figure 4** UPGMA dendrogram showing the genetic relationships of COI gene in *Channa striata*, *C. micropeltes*, *C. gachua*, *C. lucius* and *Oxyeleotris marmorata* after *Alu* I, *Hha* I, *Hinf* I and *Taq* I digestion analyzed by NTSYSpc version 2.10p.

## วิจารณ์และสรุปผล

เมื่อนำตัวอย่างที่ได้ไปจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกสามารถจำแนกได้ 4 ชนิด สอดคล้องกับการศึกษาของวีระยุทธ สุภวิทย์<sup>14</sup> ที่ศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ Channidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่พบ 4 ชนิดเช่นกัน และยังมีรายงานว่าพบชนิด *C. gachua* ในจังหวัดบึงกาฬ ภาพสินธุ์ และหนองบัวลำภู และ *C. lucius* ในจังหวัดบึงกาฬ<sup>8</sup> แต่การศึกษาครั้งนี้ในพื้นที่ดังกล่าวไม่พบทั้งสองชนิด ในประเทศไทยมีรายงานพบสกุล *Channa* ตามแหล่งน้ำธรรมชาติ 7 ชนิด และพบการแพร่กระจายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือทั้งหมด 5 ชนิด แต่ในการศึกษานี้พบเพียง 4 ชนิดซึ่งไม่พบการแพร่กระจายของ *C. marulius* ในพื้นที่ทำการสุ่มเก็บตัวอย่าง อาจมีสาเหตุจากหลายปัจจัยทั้งสภาพแวดล้อมและฤดูกาลในช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง

เมื่อนำ genomic DNA ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอ มาทำการคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จาก 7 ไพรเมอร์ และเพิ่มปริมาณ genomic DNA ด้วยเทคนิค PCR พบว่าที่ตำแหน่งยีน COI ไพรเมอร์ COI Fish<sup>12</sup> สามารถเพิ่มปริมาณ genomic DNA ได้ดีที่สุด เนื่องจากตำแหน่งยีน COI มีข้อดีกว่ายีนไมโทคอนเดรียบริเวณอื่นๆ คือมีขนาดไม่ยาวเกินไป สามารถเพิ่มปริมาณด้วย universal pirmer ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ครอบคลุมขอบเขตของความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในกลุ่มสัตว์ได้อย่างดี นอกจากนี้ลำดับดีเอ็นเอของยีน COI ยังให้ความแตกต่างในสัตว์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย<sup>14</sup> ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบในยีนตำแหน่ง COI ถึงสองยีนแต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ genomic DNA ทั้งนี้อาจมีส่วนจากความแตกต่างของเบสที่มีความจำเพาะของเบสต่อชนิดของปลา และเมื่อเพิ่มปริมาณของ genomic DNA ที่ได้มีขนาด PCR product เท่ากับ 710 bp มีขนาดเท่ากันทุกตัว ซึ่งเหมาะสำหรับที่จะนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแตกต่างจากรายงานการวิจัยของ Lakra และคณะ<sup>13</sup> ที่มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 561 bp ซึ่งมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์และอุณหภูมิเดียวกันทั้งนี้อาจเกิดจาก PCR condition ที่แตกต่างกัน เนื่องจากในการศึกษานี้ใช้ PCR condition ตามวิธีการของ Thaewnon-ngiw และคณะ<sup>11</sup> และรายงานการวิจัยก่อนหน้าของ Ward และคณะ<sup>12</sup> มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 655 bp มีขนาดใกล้เคียงกับการศึกษาครั้งนี้ และยังพบขนาดของ PCR product เท่ากับ 600 bp และ 582 bp ในรายงานการวิจัยของ Benziger และคณะ<sup>15</sup> และ Song และคณะ<sup>16</sup> ตามลำดับ ทั้งสามรายงานมีการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์เดียวกัน แต่มีความแตกต่างกันที่ PCR condition และอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอ นอกจากนี้ในรายงานของ Adamson และคณะ<sup>17</sup> ใช้ไพรเมอร์ Cyt b GLUDG-L (5'-TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG-3') และ CB3-H (5'-GGC AAA GAG AAA RTA TCA TTC-3')<sup>18</sup> มีขนาด PCR product เท่ากับ 809 bp และยังมีการศึกษาโดยใช้ตำแหน่งยีน COI ไพรเมอร์ L6154 (5'-AYC ARC AYY TRT TYT GRT TCT-3') และ H6556 (5'-TGR AAR TGI GCI ACW ACR TA-3') ของ Jamaluddin และคณะ<sup>19</sup> พบขนาด PCR product เท่ากับ 368 bp และ Rahim และคณะ<sup>5</sup> ศึกษาโดยใช้ไพรเมอร์ Forward: cyt b1 (5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3') และ Reverse: cyt b2 (5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3')<sup>20</sup> พบขนาดเท่ากับ 356 bp จะเห็นได้ว่าขนาดของ PCR product ในแต่ละรายงานการศึกษามีขนาดที่แตกต่างกัน ถึงแม้จะมีการเพิ่มปริมาณที่ตำแหน่งยีน COI เหมือนกันแต่มีลำดับเบสของไพรเมอร์ต่างกัน

เมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Alu I*, *Hha I*, *Hinf I* และ *Taq I* โดยพบว่าสามารถตัดได้ single haplotypes 14 9 8 และ 7 รูปแบบตามลำดับ ซึ่งมีทั้งรูปแบบที่มีความจำเพาะต่อชนิด และในบางชนิดพบ single haplotypes หลายรูปแบบ อาจเป็นเพราะว่ายีนที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ไม่เป็นบริเวณ conserve sequence ของปลา ทำให้ได้ restriction patterns ที่ไม่เหมือนกัน จะเห็นได้ว่าปลาชนิดเดียวกันที่อาศัยอยู่ในท้องถิ่นแตกต่างกัน หรือแม้แต่พวกที่อาศัยในบริเวณเดียวกัน อาจมีพันธุกรรมที่แตกต่างกันโดยไม่สามารถสังเกตได้จากลักษณะภายนอก<sup>21</sup> จากนั้นนำค่า single haplotypes ที่ได้มาสร้างเป็น composite haplotypes พบทั้งหมด 55 รูปแบบ โดยพบ 43 รูปแบบในปลา *C. striata* ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Rahim และคณะ<sup>5</sup> ที่ศึกษาด้วยเทคนิคเดียวกันแต่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดคือ *HpyCH4 IV*, *Mbo II*, *Mnl I*, *Nla IV* และ *Tsp509* พบ composite haplotypes ในปลา *C. striata* ทั้งหมด 29 รูปแบบ โดยแบบรูปแบบ BAAAB มากที่สุด 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีรูปแบบของ composite haplotypes ที่พบน้อยกว่าการศึกษาในครั้งนี้เนื่องจากขนาด PCR product อยู่ในช่วงสั้นกว่า มีขนาดเพียง 356 bp จึงทำให้ไม่สามารถตัดได้ single haplotypes ได้หลายรูปแบบ ในปลา *C. micropeltes* พบ 7 รูปแบบ ในปลา *C. gachua* ได้ 3 รูปแบบ ในปลา *C. lucius* พบ รูปแบบเดียวเท่านั้นคือ รูปแบบ MHHA และในตัวอย่างเปรียบเทียบพบรูปแบบ NIDA รูปแบบเดียว และยังพบว่า composite haplotypes ที่ได้ทั้งหมดไม่มีการทับซ้อนกันเลย ดังนั้นจึงสามารถใช้ composite haplotypes ในการจัดจำแนกปลาสกุล *Channa* ได้เป็นอย่างดี

จากการนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค PCR-RFLP มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc version 2.10p พบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ ตัวอย่างเปรียบเทียบและปลากลุ่ม *Channa* ทั้งหมด จาก dendrogram ของปลากลุ่ม *Channa* พบว่าปลา *C. gachua* แตกต่างจากปลา

กลุ่ม *Channa* ชนิดอื่นโดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาของ Adamson และคณะ<sup>17</sup> ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยสร้าง phylogram โดยพบว่าปลา *C. gachua* แตกต่างจากปลา *C. lucius*, *C. micropeltes* และ *C. striata* และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Lakra และคณะ<sup>13</sup> ที่สร้าง Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ Neighbor-Joining (NJ) และ Maximum Parsimony (MP) พบว่าปลา *C. gachua* แตกต่างจากปลา *C. striata* จากการศึกษาครั้งนี้ *C. striata* มีความแปรผันทางพันธุกรรมมากที่สุด และจะเห็นได้ว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของปลา *C. striata* ค่อนข้างสอดคล้องกับแหล่งที่เก็บ ตัวอย่างในประชากรเดียวกันจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่มีบางประชากรมีความแปรผันที่แตกต่างกันไปทำให้เกิดลักษณะที่ใกล้เคียงกับประชากรกลุ่มอื่นมากกว่า อาจเกิดจากกระบวนการอิสระจากการคัดเลือกความถี่ของยีนประชากรแบบสุ่ม การแปรผันทางพันธุกรรมเพื่อให้เกิดการอยู่รอด การกลายพันธุ์ของยีนหรือเกิดจากการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างประชากรก่อให้เกิดความแปรผันที่หลายหลากแตกต่างกันทางพันธุกรรมแม้เพียงเล็กน้อย ก็ก่อให้เกิดวิวัฒนาการ จนการเป็นความแตกต่างมากขึ้นเรื่อยๆ จนกลายเป็นลักษณะที่แตกต่างกัน รองลงมาคือประชากรปลา *C. micropeltes* และ *C. gachua* ตามลำดับ แต่ *C. lucius* ไม่พบความแปรผันทางพันธุกรรมแม้จะเป็นตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน

ดังนั้นควรที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในการจัดจำแนกปลากลุ่ม *C. striata* เพื่อที่จะพัฒนาเป็นเครื่องหมายจำเพาะสำหรับปลา *C. striata* เพื่อใช้ในการคัดเลือกหาพ่อแม่พันธุ์ในการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนจากทุนอุดหนุนสนับสนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีการศึกษา 2556 และทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนานิสิตระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาโท) งบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

## เอกสารอ้างอิง

1. สุจินต์ โธณพิทักษ์. ปลาช่อน. กรุงเทพฯ: เกษตรสยามบุ๊คส์แห่งชาติ; 2549.
2. บริษัท สำนักข่าว ไอ.เอ็น.เอ็น. จำกัด. ตลาดค้าส่งปลาน้ำจืดคึกคัก-ราคาพุ่งสูง. วันที่ 17 มกราคม พ.ศ. 2556. สืบค้นจาก: <http://www.innnews.co.th/shownews/show?newscode=428811>. วันที่สืบค้น วันที่ 16 พฤษภาคม พ.ศ. 2558.

3. Courtenay WR Jr, Williams JD. Snakeheads (Pisces, Channidae) a biological synopsis and risk assessment. Florida: Library of congress cataloging; 2004.p.1-120.
4. ศรารุท จะโສະ, อดัญญา ตำจุติ, สุชาติ จุลอดุง, กฤษณพันธ์ โกเมนไพรินทร์, เมตตา ทิพย์บรรพต, นพพร สิทธิเกษมกิจ. ปลาหมอไทยชีววิทยาและ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์. ศูนย์วิจัยและ ทดสอบพันธุ์สัตว์น้ำ ชุมพร; 2547. p. 1-33.
5. Rahim MHA, Ismail P, Alias R, Muhammad N. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA cytochrome b gene among Haruan (*C. striatus*) in Malaysia. Gene 2012;494:1-0.
6. ขวลิต วิทยานนท์, จรัสธาดา กรรณสูต, จารุจินต์ นภิตะภัก. หลากหลายชนิดของปลาน้ำจืดในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สำนักนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม; 2540. p. 102.
7. กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. สถิติหน่วยธุรกิจการประมง พ.ศ. 2553. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ: ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง; 2557.
8. อนันต์ เคนท้าว. การศึกษาความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของปลาสกุลปลาช่อนบางชนิดด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริกส์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2554.
9. Smith HM. The Freshwater Fish of Siam or Thailand. United States: Government Printing Office; 1945.
10. Vishwanath W, Geetakumari Kh. Diagnosis and interrelationships of fishes of the genus *Channa* Scopoli (Teleostei: Channidae) of northeastern India. J of Threatened Taxa 2009 Feb 26;1(2);97-105.
11. Thaewnon-ngiw B, Klinbunga S, Phanwichien K, Sangduen N, Lauhachinda N, Menasveta P. Genetic diversity and molecular markers in introduced and Thai native apple snails (*Pomacea* and *Pila*). J Biochem Mol Biol 2004; 37:493-502.
12. Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. Phil Trans R Soc B 2005 Oct 29;360(1462):1847-57.
13. Lakra WS, Goswami M, Gopalakrishnan A, Singh DP, Singh A, Nagpure NS. Genetic relatedness among fish species of genus *Channa* using mitochondrial DNA genes. Biochem Sys Ecol 2010;38:1212-19.
14. วีระยุทธ สุภังค์. พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาช่อน (Family Channidae) 4 ชนิด ในภาค ตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2553.
15. Benziger A, Philip S, Raghavan R, Anvar Ali PH, Sukumaran M, Tharian JC et al. Unraveling a 146 years old taxonomic Puzzle: validation of malabar snakehead, species-status and its relevance for Channid systematics and evolution. Plos one J Information 2011 Jun;6(6):1-12.
16. Song LM, Munian K, Rashid ZA, Bhassu S. Characterisation of Asian snakehead murrel *Channa striata* (Channidae) in Malaysia: An insight into molecular data and morphological approach. TheScientificWorld J 2013;1-6.
17. Adamson EAS, Hurwood DS, Mather PB. A reappraisal of the evolution of Asian snakehead fishes (Pisces, Channidae) using molecular data from multiple genes and fossil calibration. Mol Phylogenet Evol 2010 Mar 30;56:707-17.
18. Palumbi S, Martin A, Romano S, McMillan W, Stice L, Grabowski A. The simple fool's guide to PCR, version 2. Honolulu: University of Hawaii; 1991.