บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

วิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากเนื้อเยื่อตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้า

จากการศึกษาวิธีสกัดดีเอ็นเอจาก 4 วิธี คือ 1) ชุดสกัดสำเร็จรูป (GF-1 Tissue DNA Extraction Kit) 2) PCR- ready genomic DNA 3) Chloroform และ 4) Guanidine Thiocyanate พบว่า วิธี PCR- ready genomic DNA เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเนื้อเยื่อของปลาการ์ตูนอานม้าที่เก็บรักษาในเอทานอล 100% โดยได้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 5.309±0.135 µg/เนื้อเยื่อ 10 mg และใช้ระยะเวลาในการเตรียมสั้นเพียง 25 นาที (ตารางที่ 4-1) สอดคล้องกับรายงานของ Meeker et al. (2007) ที่ศึกษาวิธีสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปลาม้าลาย ซึ่งเป็นวิธีที่ได้ดีเอ็นเอคุณภาพดี และใช้ระยะเวลาสั้นในการสกัด ถึงแม้ว่าดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีนี้จะมีความบริสุทธิ์น้อยกว่าดีเอ็นเอที่ได้จากชุดสกัดสำเร็จรูป (GF-1 Tissue DNA Extraction Kit) ก็ตาม แต่สามารถนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน 16S rRNA, ND4-ND5 และ ITS-1 ได้ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ อีกทั้งมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีอื่น ๆ เนื่องจากใช้สารเคมีที่มีอยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ และไม่เป็นสารอันตราย เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารฟีนอล/ คลอโรฟอร์มในการเตรียมดีเอ็นเอด้วยวิธี Chloroform (Sonnenberg et al., 2007) และ Guanidine Thiocyanate ซึ่งมีวิธีการที่ยุ่งยาก ใช้ระยะเวลาในการเตรียมนาน รวมทั้งมีการใช้สารฟีนอล/ คลอโรฟอร์ม ซึ่งเป็นสารอันตราย มีกลิ่นฉุน อาจจะไปทำลายเยื่อเมือกต่าง ๆ และเมื่อผิวหนังสัมผัสโดยตรงอาจเกิดอาการปวดแสบปวดร้อนแล้วชาได้ (ระบบการจัดการความปลอดภัยสารเคมีและของเสียอันตราย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552) ดังนั้นการทดสอบในขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้ดีเอ็นเอจากวิธีสกัด PCR- ready genomic DNA โดยเฉพาะใช้กับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าที่ต้องใช้จำนวนตัวอย่างปริมาณมาก เพราะมีความสะดวก รวดเร็ว และเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย ซึ่งวิธีการสกัดด้วยวิธีนี้น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้สกัดดีเอ็นเอกับตัวอย่างชนิดอื่นที่มีขนาดเล็ก ใกล้สูญพันธุ์หรือมีปริมาณน้อย เนื่องจากใช้เนื้อเยื่อเพียงเล็กน้อย ก็สามารถทำการสกัดและได้ดีเอ็นเอในปริมาณมาก เพียงพอสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ สำหรับการเปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลาการ์ตูนอานม้า พบว่าการเก็บรักษาโดยแช่ในเอทานอล 100% เมื่อผ่านการสกัดดีเอ็นเอจากทั้ง 4 วิธี ที่ทำการศึกษาทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่มากกว่าวิธีการเก็บแบบแช่แข็ง ดังแสดงในตารางที่ 4-1 ให้ผลเช่นเดียวกับการเก็บรักษาตัวอย่างบางชนิดใน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เอทานอล 96% หรือ 70% ที่ให้ดีเอ็นเอคุณภาพดี (Seutin, White, & Boag, 1991; Reiss, Schwert, & Ashworth, 1995; Kumar, Singh, Nagpure, Kushwaha, Srivastava, & Lakra, 2007) ทั้งนี้ควรตัดชิ้นตัวอย่างให้มีขนาดเล็กลง โดยมีขนาดไม่เกิน 1 mm^3 (Dessauer, Cole, & Hafner, 1996) ซึ่งขั้นตอนนี้มีความสำคัญมาก เพราะเอทานอลจะเข้าไปดูดน้ำในเนื้อเยื่อออกอย่างรวดเร็ว จึงทำให้เก็บรักษาตัวอย่างไว้ได้นานและปริมาณสารพันธุกรรมยังคงสภาพอยู่ (Dawson, Raskoff, & Jacobs, 1998) ถึงแม้ว่าการเก็บรักษาแบบแช่แข็งทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่าการเก็บแบบแช่ในเอทานอล แต่ดีเอ็นเอที่ได้จากการเก็บรักษาจากทั้งสองวิธีก็สามารถทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้และให้ผลไม่แตกต่างกัน เนื่องจากดีเอ็นเอปริมาณ 25-100 ng/µl เพียงพอสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ (Kumar et al., 2007) ดังนั้นจึงสามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อได้ทั้งสองแบบโดยขึ้นอยู่กับความสะดวกในการปฏิบัติงานและคุณภาพดีเอ็นเอที่ต้องนำไปใช้ในลำดับต่อไป

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาการ์ตูนอานม้า

1. บริเวณยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

เนื่องจากยังไม่ปรากฏรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาการ์ตูนอานม้าแต่อย่างใด การศึกษาครั้งนี้จึงต้องทดสอบเลือกใช้ยีนหรือบริเวณที่เหมาะสมสำหรับการศึกษา โดยเริ่มต้นจากศึกษาความแตกต่างระดับสกุลเบื้องต้นก่อนที่จะศึกษาในระดับประชากร โดยทดสอบในปลาการ์ตูน 6 ชนิด คือ ปลาการ์ตูนส้มขาว ปลาการ์ตูนเพอคูล่า ปลาการ์ตูนอานม้า ปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลือง ปลาการ์ตูนแดงดำและปลาการ์ตูนแดง พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ 16S rRNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 16Sar_L/16Sbr_H ตามรายงานการศึกษาของ Palumbi et al. (1991) พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาก (650 คู่เบส แสดงดังภาพที่ 4-5) และเมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *MseI* (วิเคราะห์จากโปรแกรม webcutter 2.0) สามารถจำแนกปลาการ์ตูน 6 ชนิด ออกจากกันได้เพียง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1) ปลาการ์ตูนส้มขาว ปลาการ์ตูนเพอคูล่า ปลาการ์ตูนอานม้าและปลาการ์ตูนแดงดำ และกลุ่มที่ 2) ปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลืองและปลาการ์ตูนแดง (ภาพที่ 4-6) สอดคล้องกับรายงานของ Boonphakdee and Sawangwong (2008) ที่ใช้ไพรเมอร์คู่นี้ ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 620 คู่เบส ในปลาการ์ตูนทุกชนิดที่ศึกษาแต่ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างปลาการ์ตูน 7 ชนิดได้ ประกอบด้วย ปลาการ์ตูนแดง ปลาการ์ตูนอานม้า ปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้ม ปลาการ์ตูนอินเดียนแดง ปลาการ์ตูนส้มขาวและปลาการ์ตูนส้มดำ แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP สามารถจำแนกปลาการ์ตูนที่ทำการศึกษาทั้งหมด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7 ชนิดออกเป็น 3 กลุ่ม ทั้งนี้อาจเนื่องจากยีน 16S rRNA ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะปลาเป็นยีนอนุรักษ์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่แตกต่างกันมากนัก (Miya & Nishida, 1999; Klossa et al., 2002) ทำให้ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดออกจากกันได้ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามกลับพบว่าบริเวณยีน 16S rRNA ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อบ่งชี้ชนิดและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตอย่างแพร่หลายตั้งแต่แบคทีเรียจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ (Patarnello et al., 1994; Christian, Martin, Philipp, & Luthy, 2000; Wolf et al., 2000; Klossa et al., 2002; Boonphakdee & Sawangwong, 2008) โดยความจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณดังกล่าวมักพบว่าภายในชนิดเดียวกันมีความเหมือนกันในระดับสูง แต่มีความแตกต่างกันมากระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิต (Mallat & Sullivan, 1998) ดังนั้นการศึกษาภายในชนิดของกลุ่มปลาการ์ตูน 6 ชนิด จึงไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากกันได้ ดังนั้นบริเวณยีน 16S rRNA จึงไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากรของปลาการ์ตูนอานม้า

2. บริเวณยีน ND4-ND5 ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

บริเวณยีน ND4-ND5 มีความยาวประมาณ 3.4 kb ในกลุ่มของปลาทั่วไป มีรายงานการศึกษาว่าเป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Miya et al., 2006) เป็นยีนที่สังเคราะห์โปรตีน และมีความสำคัญต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การศึกษาในบริเวณยีน ND4-ND5 ในกลุ่มปลา มีรายงานดังเช่น Doosey, Bart, Saitoh, and Miya (2010) พบว่าปลาในกลุ่ม catostomid บริเวณยีน ND4-ND5 มีขนาดประมาณ 3 kb สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้เริ่มศึกษาจากปลาการ์ตูน 4 ชนิด คือ ปลาการ์ตูนอานม้า ปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้ม ปลาการ์ตูนเพอคูล่า และปลาการ์ตูนส้มขาว พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 895 คู่เบส (ภาพที่ 4-7) รวมทั้งปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ (NA) ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง จ.ภูเก็ต จ. พังงา และ จ. ชลบุรี (RY, PU, PA และ CN ตามลำดับ) ก็ได้ผลิตผลพีซีอาร์ในบริเวณ ND4-ND5 ขนาดประมาณ 895 คู่เบส เช่นกัน (ภาพที่ 4-9) เมื่อตัดผลิตผลพีซีอาร์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bfu*CI และ *Dde*I พบความแตกต่างในระดับชนิดระหว่างปลาการ์ตูนอานม้า ปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้ม ปลาการ์ตูนเพอคูล่า และปลาการ์ตูนส้มขาว แต่เมื่อศึกษาในระดับประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจาก 5 แหล่ง คือ จากธรรมชาติ (NA) ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง จ.ภูเก็ต จ. พังงา และ จ. ชลบุรี (RY, PU, PA และ CN ตามลำดับ) โดยตัดผลิตผลพีซีอาร์บริเวณยีน ND4-ND5 ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกัน (เพื่อเพิ่มตำแหน่งตัดให้มากขึ้น) คือ *Bfu*CI+*Hea*III และ *Dde*I+*Hea*III พบว่าทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบมีรูปแบบเหมือนกัน (ภาพที่ 4-10 และ 4-11) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะบริเวณยีน ND4-ND5 มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

มากนัก และไม่สามารถแสดงความแตกต่างในระดับประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจาก 5 แหล่งได้ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ทั้งนี้ถ้าทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 895 คู่เบส ในทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบ อาจตรวจพบความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับประชากรปลาการ์ตูนอานม้าได้ ดังเช่นรายงานการวิจัยของ Miya et al. (2006) ที่เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน ND4-ND5 ที่มีขนาด 3,408 คู่เบส (รวมบริเวณ tRNA ที่คั่นอยู่ระหว่างบริเวณ ND4-ND5) แล้วหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลาในครอบครัว Cypriniformes สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม และมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด และบ่งชี้แหล่งอาศัยที่จำเพาะของปลากลุ่มนี้ได้ แต่ทั้งนี้ปลาในครอบครัว Cypriniformes เป็นปลาที่อาศัยอยู่ในน้ำจืดซึ่งมีลักษณะการดำรงชีวิตและวิวัฒนาการที่แตกต่างจากกลุ่มปลาการ์ตูน (Saitoh, Sado, Mayden, Hanzawa, Nakawara, Nishida, & Miya, 2006) จึงทำให้ผลการวิเคราะห์ในปลาการ์ตูนอานม้ามีความแปรปรวนบริเวณยีน ND4-ND5 น้อยกว่าปลาในครอบครัว Cypriniformes

3. บริเวณ D-loop หรือ control region ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

บริเวณ D-loop เป็นบริเวณที่ไม่สามารถแปรรหัสได้และมีความแปรปรวนมากกว่าบริเวณอื่นในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Altukhov & Polyakoya, 2002) จึงถูกนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในระดับประชากร (Chow et al., 2009) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ D-loop ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ จ. ระยอง (NA) และจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) ได้ขนาดผลิตผลพีซีอาร์ที่มีความแปรปรวนใน 2 กลุ่มนี้ คือ มีขนาดอยู่ในช่วงประมาณ 1,100-1,400 คู่เบส (ภาพที่ 4-12) แต่สำหรับปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต จ. พังงา และ จ. ชลบุรี (PU, PA และ CN ตามลำดับ) พบว่าขนาดผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้ในประชากร 3 กลุ่มนี้มีขนาดใกล้เคียงกันมาก คือ ขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส (ภาพที่ 4-13) จะเห็นได้ว่าขนาดของบริเวณ D-loop ของปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติ (NA) มีความหลากหลายของขนาดมากกว่าประชากรปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง และคาดว่าจะมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงกว่าฟาร์มเพาะเลี้ยง และเมื่อศึกษาต่อด้วยเทคนิค PCR-RFLP เลือกใช้เอนไซม์ 5 ชนิด คือ *Mse*I, *Ssp*I, *Hpy*CH4V, *Ase*I และ *Hpa*II ตัดผลิตผลพีซีอาร์บริเวณ D-loop พบว่าได้รูปแบบภายหลังการตัดทั้งหมด 1, 3, 10, 8 และ 5 รูปแบบตามลำดับ (haplotype ได้ทำการพิจารณาชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาดมากกว่า 50 คู่เบสขึ้นไป เนื่องจากการทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนเจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 3% ไม่สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 50 คู่เบสได้ชัดเจน) และเมื่อทำการพิจารณา composite haplotype โดยการนำรูปแบบ haplotype ของแต่ละเอนไซม์มารวมกัน (ตารางที่ 4-6) พบ haplotype ACBB ร่วมกัน ใน 3 กลุ่มประชากร

(shared composite haplotype) คือ กลุ่มปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ จ. ระยอง (NA) กลุ่มปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) และกลุ่มปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี (CN) สำหรับกลุ่มปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต (PU) และ จ. พังงา (PA) ซึ่งอยู่ใกล้ฝั่งทะเลอันดามัน มีเอกลักษณ์เฉพาะ 2 กลุ่มนี้ คือ composite haplotype AIHC และ BIHC แต่ทั้งนี้ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ และสำหรับกลุ่มประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี (CN) จะเห็นได้ว่ามีจำนวนตัวอย่างมากกว่า 50% ที่มีความเหมือนกับตัวอย่างที่มาจากธรรมชาติ (NA) ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับ UPGMA ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Phylip (ภาพที่ 4-16) ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากแหล่งใกล้ฝั่งทะเลอ่าวไทย (ธรรมชาติ=NA, ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง=RY และฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี=CN) กับตัวอย่างที่มาจากใกล้ฝั่งทะเลอันดามัน (ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต=PU และฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. พังงา=PA) ออกจากกันได้อย่างชัดเจน สันนิษฐานได้ว่าตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) และ จ. ชลบุรี (CN) น่าจะมีแม่พันธุ์เป็นปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ (NA) แต่สำหรับประชากร PU และ PA สันนิษฐานว่าแม่พันธุ์จากธรรมชาติต่างแหล่งกับประชากรในฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก จ. ระยอง และ จ. ชลบุรี หากมีข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมจากปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติของฝั่งทะเลอันดามัน ก็จะทำให้สามารถยืนยันความชัดเจนของแหล่งที่มาของตัวอย่างจากทั้ง 2 แหล่งนี้ได้ถูกต้อง เมื่อพิจารณาค่า haplotype diversity (h) พบว่ามีค่า 0.40-0.75 (ค่าเฉลี่ย $h = 0.62$) แสดงว่ามีความแปรปรวนภายในประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากแต่ละแหล่ง ซึ่งสอดคล้องกับปลาหลายชนิด เช่น ปลาทอง *Carassius auratus gibelio* ($h = 0.00$-0.84, ค่าเฉลี่ย $h = 0.55$; Brykov, Polyakova, & Podlesnykh, 2003) ซึ่งค่าที่ได้สูงกว่าปลาที่มีการอพยพย้ายถิ่น เช่น ปลาเทราท์ *Salmo trutta* ($h = 0.00$-0.54, ค่าเฉลี่ย $h = 0.30$; Weiss, Schlotterer, Waidabacher, & Jungwirth, 2001) อีกทั้งค่า $F_{ST} = 0.5083$ จากตารางที่ 4-7 แสดงให้เห็นว่าประชากรปลาการ์ตูนมีโครงสร้างประชากรชัดเจน (F_{ST} มีค่าสูง) นั่นคือแต่ละประชากรของปลาการ์ตูนนี้ค่อนข้างอยู่กับที่ ซึ่งสอดคล้องกับพฤติกรรมของปลาการ์ตูนที่อาศัยอยู่ร่วมกับดอกไม้ทะเลชนิด *Heteractis erispa* และ *Stichodactyla haddoni* (Allen & Fautin, 1992) ซึ่งปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) เป็นปลาที่ไม่มีการอพยพย้ายถิ่นฐาน จึงทำให้ไม่มีการแลกเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างประชากร แต่หากว่าทำการศึกษาประชากรปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติแหล่งอื่น ๆ ซึ่งอาจอาศัยอยู่กับดอกไม้ทะเลต่างที่กัน ก็อาจพบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มากขึ้นกว่าเดิม ทั้งนี้จากข้อมูลความถี่ของ composite haplotype ในตารางที่ 4-6 จะเห็นได้ว่าปลาการ์ตูนอานม้าในธรรมชาติ ยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จึงมีแนวโน้มไม่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ อีกทั้งผลการวิเคราะห์ AMOVA ในบริเวณ D-loop พบความแตกต่างระหว่างประชากรเท่ากับ 50.83% และภายในประชากรเท่ากับ 49.17% จะเห็นว่าการศึกษาในบริเวณ D-loop พบความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงทั้งภายในและระหว่างประชากรจาก 5 แหล่งที่ทำการศึกษา จากข้อมูลดังกล่าวจึงควรอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่มประชากรไว้ ไม่ควรนำพ่อแม่พันธุ์จากฟาร์มเพาะเลี้ยงที่อยู่คนละฝั่งทะเลมาทำการผสมพันธุ์กัน เพราะอาจทำให้สูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีอยู่เดิมได้ อีกทั้งถ้ามีการนำปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงปล่อยสู่ธรรมชาติ ก็อาจเกิดปัญหาตามมาได้ ทำให้ genetic stock ในธรรมชาติลดลง ซึ่งอาจทำให้สูญเสียความสมดุล

4. บริเวณ ITS-1 ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

การศึกษาข้อมูลในส่วนของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอในบริเวณ ITS-1 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีรายงานถึงลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแปรปรวนสูง สามารถใช้เป็นเอกลักษณ์จำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Hilis & Dixon, 1991) และยังใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากร (Zhu, Amelio, Paggi, & Gasser, 2000; Zhu, Amelio, Hu, Paggi, & Gasser, 2001) โดยการศึกษาในครั้งนี้เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS-1 ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ 1 แหล่ง และฟาร์มเพาะเลี้ยง 4 แหล่ง ได้ขนาดผลิตผลพีซีอาร์ใกล้เคียงกันในทุกตัวอย่าง คือ 750 คู่เบส (ภาพที่ 4-17) เมื่อนำเอนไซม์ทั้งหมด 5 ชนิด คือ *Hae*III, *Hinf*I, *Hpa*II, *Mnl*I และ *Hha*I มาตัดผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้ แล้ววิเคราะห์รูปแบบ haplotype ของแต่ละเอนไซม์ พบว่าได้รูปแบบภายหลังการตัดทั้งหมด 6, 1, 3, 5 และ 6 รูปแบบ ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจาก composite haplotype (ตารางที่ 4-12) พบรูปแบบ AAAA เป็นรูปแบบที่พบในปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติ จ. ระยอง (NA) และจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) มีลักษณะการ shared haplotype สอดคล้องกับผลของ UPGMA เดนโดรแกรมและสอดคล้องกับการศึกษาในบริเวณ D-loop ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) มีแม่หรือพ่อพันธุ์เป็นปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ (NA) หรือมีการพัฒนาสายพันธุ์มาจากบรรพบุรุษต้นกำเนิดจากธรรมชาติ ทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก ส่วนปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต (PU) มี composite haplotype ที่เป็นเอกลักษณ์ คือ AAAC และเช่นกันกับรูปแบบ AADD ที่เป็นเอกลักษณ์ของปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. พังงา (PA) แต่ทั้งนี้มีเพียงบางตัวอย่างที่มีลักษณะพันธุกรรมแตกต่างจากกลุ่มที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ซึ่งอาจเกิดขึ้นในช่วงการรวมตัวของดีเอ็นเอ (DNA recombination) การซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) หรือการจำลอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ดีเอ็นเอ (DNA replication) (Worheide, Nichols, & Goldberg, 2004) ซึ่งเป็นผลดีต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้น ทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของแต่ละแหล่งประชากรมีลักษณะเอกลักษณ์เฉพาะและสามารถดำรงเผ่าพันธุ์ต่อไปได้ รวมทั้งระบบการจัดการในแต่ละฟาร์ม โดยมีการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์จากหลายแหล่ง รวมทั้งมีการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์จากต่างประเทศ หรืออาจมีการใช้พ่อแม่พันธุ์หลายคู่ จึงทำให้ปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สำหรับเดนโดรแกรม UPGMA บริเวณ ITS-1 สนับสนุนผลที่ได้จากการศึกษาในบริเวณ D-loop คือ สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากทะเลฝั่งอ่าวไทย (NA, RY และ CN) และทะเลฝั่งอันดามัน (PU และ PA) ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และประชากรจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) และ จ. ชลบุรี น่าจะมีพ่อแม่พันธุ์มาจากธรรมชาติ (NA) ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าในแต่ละแหล่ง โดยพิจารณาจากค่า haplotype diversity (h) พบว่ามีค่า 0.59-0.91 (ค่าเฉลี่ย $h = 0.75$) ซึ่งมีค่าสูง ผลการวิเคราะห์ AMOVA ภายในประชากรเท่ากับ 84.60% แสดงว่าเกิดความแปรปรวนภายในประชากร แต่เนื่องจากบริเวณ D-loop ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ มีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากฝ่ายแม่เพียงฝ่ายเดียว ทำให้เมื่อเกิดการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ (crossbreeding หรือ natural reproduction) ลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อเข้ามามีส่วนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Apostolidis, Loukovitis, & Tsigenopoulos, 2008) ข้อมูลทางพันธุกรรมของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอช่วยยืนยันและบ่งชี้แหล่งที่มาของบรรพบุรุษหรือแหล่งที่มาของตัวอย่างได้

ดังนั้นการศึกษาในบริเวณ ITS-1 เหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบแหล่งที่มาของตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าต่อไป แต่บริเวณ D-loop เหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากร การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าระหว่างประชากรมีความแตกต่างที่ชัดเจน ซึ่งควรมีมาตรการจัดการเฉพาะในแต่ละประชากร ทั้งนี้ประชากรที่มีความแตกต่างของพันธุกรรมอาจมีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่แตกต่างกัน (Kumagai, Barinova, Nakajima, & Taniguchi, 2004) ดังนั้นจึงควรศึกษาข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมรวมกับข้อมูลทางเศรษฐกิจ เพื่อสามารถนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ การเพาะเลี้ยง การปรับปรุงพันธุ์และวางแผนเพื่อการอนุรักษ์ต่อไป (Carvalho & Hauser, 1994) นอกจากนี้ยังสามารถนำ composite haplotype ที่เป็นเอกลักษณ์ในแต่ละประชากรมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อติดตามผลที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงตามธรรมชาติ และพฤติกรรมมนุษย์ที่มีต่อธรรมชาติ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการติดตามการเคลื่อนย้ายของประชากรปลาการ์ตูนอานม้า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สรุปผลการทดลอง

1. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR-ready genomic DNA เป็นวิธีที่เหมาะสมมากกว่าวิธีอื่น เพราะมีขั้นตอนสั้น ง่าย ใช้เนื้อเยื่อน้อย ไม่ใช้สารเคมีอันตราย และดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในบริเวณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR-RFLP สามารถจำแนกปลาการ์ตูน 6 ชนิด ออกจากกันได้เพียง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1) ปลาการ์ตูนส้มขาว ปลาการ์ตูนเพอคูล่า ปลาการ์ตูนอานม้าและปลาการ์ตูนแดงดำ และกลุ่มที่ 2) ปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลืองและปลาการ์ตูนแดง และการศึกษาในบริเวณ ND4-ND5 พบความแตกต่างในระดับชนิด ระหว่างปลาการ์ตูนอานม้า ปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้ม ปลาการ์ตูนเพอคูล่า และปลาการ์ตูนส้มขาว แต่เมื่อศึกษาในระดับประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจาก 5 แหล่ง ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมแต่อย่างใด ในส่วนของยีน 16S rRNA และ ND4-ND5 จึงไม่เหมาะสมสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากร

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในบริเวณ D-loop โดยใช้เอนไซม์ 5 ชนิด คือ *Mse*I, *Ssp*I, *Hpy*CH4V, *Ase*I และ *Hpa*II พบ composite haplotype ทั้งหมด 23 haplotypes และข้อมูลจาก UPGMA เดนโดรแกรมสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากแหล่งใกล้ฝั่งทะเลอ่าวไทย (NA, RY และ CN) กับตัวอย่างที่มาจากใกล้ฝั่งทะเลอันดามัน (PU และ PA) ออกจากกันได้อย่างชัดเจน

4. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าด้วยเทคนิค PCR-RFLPในบริเวณ ITS-1 ด้วยเอนไซม์ 5 ชนิด คือ *Hae*III, *Hinf*I, *Hpa*II, *Mnl*I และ *Hha*I พบ composite haplotype ทั้งหมด 31 haplotypes สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากแหล่งใกล้ฝั่งทะเลอ่าวไทยกับตัวอย่างที่มาจากใกล้ฝั่งทะเลอันดามันออกจากกันได้อย่างชัดเจนเช่นกัน อีกทั้งข้อมูลจาก UPGMA เดนโดรแกรมบริเวณ ITS-1 ยังสนับสนุนข้อสันนิษฐานจากการศึกษาในบริเวณ D-loop คือ ปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) มีแม่หรือพ่อพันธุ์เป็นปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ (NA) หรือมีการพัฒนาสายพันธุ์มาจากบรรพบุรุษต้นกำเนิดจากธรรมชาติ (NA)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มแหล่งเก็บตัวอย่างจากธรรมชาติให้มากขึ้นโดยเฉพาะจากฝั่งทะเลอันดามัน ซึ่งจะทำให้สามารถวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างหรือภายในประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าที่มีการแพร่กระจายอยู่จริงในธรรมชาติได้ผลชัดเจนยิ่งขึ้น

2. อาจปรับเปลี่ยนการทำอิเล็กโทรโฟริซิสจากการใช้เจลอะกาโรสเป็นเจลโพลีอะคริลาไมด์ ซึ่งจะทำให้สามารถวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดน้อยกว่า 50 คู่เบส ได้ชัดเจนขึ้น เมื่อศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLP ผลการศึกษาจะสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University