ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาการ์ตูนอานม้า (*Amphiprion polymnus*) จากธรรมชาติและฟาร์มเพาะเลี้ยง

อรทัย มังคลาด

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤษภาคม 2553
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ อรทัย มังคลาค ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูตา บุญภักดี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภา หงษ์ตระกูล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูตา บุญภักดี)

.....กรรมการ
(ดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญรัตน์ ประทุมชาติ)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุษาวดี ตันติวรานุรักษ์)
วันที่ 31 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2553

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร. ชูตา บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ ดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณเงินทุนสนับสนุนบางส่วนจากเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) มา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ พี่นฤดม พิสิษฐเกษม ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาการ์ตูนบางส่วนเพื่อใช้ในการศึกษาทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกท่านที่เอาใจใส่ ให้กำลังใจและสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา

สุดท้ายขอขอบคุณ Syarif Hidayat ที่ให้คำแนะนำในการใช้โปรแกรมและช่วยวิเคราะห์ข้อมูลในบางส่วนของงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการทุกคนที่คอยให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

อรทัย มังคลาด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

50911467: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
คำสำคัญ: PCR-RFLP/ 16S rRNA/ ND4-ND5/ D-loop/ ITS-1/ *Amphiprion polymnus*/ anemonefish

อรทัย มังคลาด: ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาการ์ตูนอานม้า (*Amphiprion polymnus*) จากธรรมชาติและฟาร์มเพาะเลี้ยง (GENETIC DIVERSITY OF THE SADDLEBLACK ANEMONEFISH (*Amphiprion polymnus*) POPULATIONS FROM NATURE AND FARMS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชูตา บุญภักดี, Ph.D., ถนอมศักดิ์ บุญภักดี, D.Agr.Sc. 123 หน้า. ปี พ.ศ. 2553.

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาการ์ตูนอานม้า (*Amphiprion polymnus*) และหาวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อไป โดยเก็บตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งธรรมชาติ 1 แหล่ง คือ จ. ระยอง (NA) และจากฟาร์มเพาะเลี้ยง 4 แหล่ง คือจาก จ. ระยอง (RY) จ. ภูเก็ต (PU) จ. พังงา (PA) และ จ. ชลบุรี (CN) จำนวน 45, 10, 29, 52 และ 20 ตัวอย่าง ตามลำดับ การหาวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมใช้ครีบหางของปลาการ์ตูนอานม้าที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งและแช่ในเอทานอล 100% เปรียบเทียบวิธีสกัด 4 วิธี คือ 1) ชุดสกัด GF-1 tissue DNA extraction kit 2) PCR-ready genomic DNA 3) Chloroform 4) Guanidine Thiocyanate พบว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR-ready genomic DNA เป็นวิธีที่เหมาะสมมากกว่าวิธีอื่น คือ มีขั้นตอนสั้น ง่าย ใช้เนื้อเยื่อน้อย ไม่ใช้สารเคมีอันตราย และดีเอ็นเอที่สกัดได้สามารถนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จึงเหมาะสมสำหรับการศึกษาที่จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างจำนวนมาก

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากรของปลาการ์ตูนอานม้า ทำการศึกษาในส่วนของยีน 16S rRNA, ND4-ND5 และ D-loop หรือ control region ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรียและบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS-1) ที่อยู่ในนิวเคลียส ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ผลการศึกษาพบว่าในส่วนของยีน 16S rRNA และ ND4-ND5 ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากร ในขณะที่บริเวณ D-loop ผลิตผลพีซีอาร์ของทุกตัวอย่างขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Mse*I, *Ssp*I, *Hpy*CH4V, *Ase*I และ *Hpa*II รวมรูปแบบแถบดีเอ็นเอ (composite haplotype) ได้ทั้งสิ้นจำนวน 23 haplotypes สามารถแยกความแตกต่างระหว่างประชากรที่มาจากแหล่ง NA, RY และ CN ออกจากตัวอย่างที่มาจาก PU และ PA ได้อย่างชัดเจน การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรด้วยวิธี AMOVA ในบริเวณ D-loop พบความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างประชากรแต่ละแหล่ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(F_{ST}: 0.5083, $p<0.05$) และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรสูง (percentage of variation = 49.17) แต่ละแหล่งมีค่า haplotype diversity (h±SE) เท่ากับ 0.75±0.06, 0.53±0.09, 0.73±0.5, 0.40±0.07 และ 0.67±0.08 ตามลำดับ และมีค่า nucleotide diversity (π) เท่ากับ 0.007, 0.007, 0.010, 0.006 และ 0.008 ตามลำดับ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในบริเวณ ITS-1 ซึ่งมีขนาดประมาณ 750 คู่เบส เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III, *Hpa*II, *Mnl*I, *Hha*I และ *Hinf*I พบจำนวน composite haplotype ทั้งหมด 31 haplotypes สามารถแยกความแตกต่างระหว่างประชากรที่มาจากแต่ละแหล่งได้อย่างชัดเจน การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรด้วยวิธี AMOVA ในบริเวณ ITS-1 พบความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างประชากรแต่ละแหล่ง (F_{ST}: 0.1539, $p<0.05$) และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรสูงมาก (percentage of variation = 84.60) แต่ละแหล่งมีค่า haplotype diversity (h±SE) เท่ากับ 0.59±0.07, 0.71±0.11, 0.71±0.04, 0.91±0.01 และ 0.82±0.05 ตามลำดับ และค่า nucleotide diversity (π) เท่ากับ 0, 0, 0.004, 0.001 และ 0.001 ตามลำดับ จากการศึกษาสรุปได้ว่ากลุ่มประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) น่าจะมีแหล่งที่มาหรือมีสายบรรพบุรุษทางแม่เช่นเดียวกันกับปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งธรรมชาติ จ. ระยอง (NA) ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับนำไปพัฒนาประยุกต์ใช้เพื่อการจัดการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

50911467: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M.Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: PCR-RFLP/ 16S rRNA/ ND4-ND5/ D-loop/ ITS-1/ *Amphiprion polymnus*/ anemonefish

ORATAI MANGKALAD: GENETIC DIVERSITY OF THE SADDLEBLACK ANEMONEFISH (*Amphiprion polymnus*) POPULATIONS FROM NATURE AND FARMS. ADVISORY COMMITTEE: CHUTA BOONPHAKDEE, Ph.D., THANOMSAK BOONPHAKDEE, D.Agr.Sc. 123 P. 2010.

The purposes of this study were to analyze genetic diversity of the saddleblack anemonefish (*Amphiprion polymnus*) and evaluate different DNA extraction methods that suitable for PCR-based assays. For analysis of genetic variation of the saddleblack anemonefish, experimental samples were collected from 1 natural location (Rayong-NA) and 4 local fish farms [Rayong (RY), Phuket (PU), Phungnga (PA) and Chonburi (CN)] (n=45, 10, 29, 52 and 20, respectively). Both frozen and 100% ethanol-preserved fin clips of the anemonefish were used for DNA preparation. Four different DNA isolation methods; 1) GF-1 tissue DNA extraction kit 2) PCR-ready genomic DNA 3) Chloroform and 4) Guanidine Thiocyanate, were then compared. The results indicated that the PCR-ready genomic DNA method was more suitable than others. This procedure is applicable to a large-scale study with a short protocol, technically easy, using small size of tissue and requires no potentially hazardous chemicals. In addition, the obtained DNA samples can be processed directly for PCR amplification.

To analyze genetic diversity within and among populations of the saddleback anemonefish, 3 mitochondrial DNA regions (16S rRNA, ND4-ND5 and D-loop or control region) and the nuclear Internal Transcribed Spacer (ITS-1) region were examined by PCR-RFLP. The results showed that 16S rRNA and ND4-ND5 regions were obviously not suitable for population diversity analysis. However, restriction analysis of the D-loop fragment (approximately 1,100 bp) obtained from all tested samples with *Mse*I, *Ssp*I, *Hpy*CH4V, *Ase*I and *Hpa*II gave 23 haplotypes in total. All composite haplotype were clearly differentiated populations between NA, RY and CN from PU and PA. Analysis of molecular variance measured by AMOVA showed highly significant genetic differentiation among populations (F_{ST}: 0.5083, $p<0.05$) and showed high

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

percentage of variation within population (49.17). Analysis of genetic structure within population (NA, RY, PU, PA and CN) showed generally high haplotype diversity (h±SE = 0.75±0.06, 0.53±0.09, 0.73±0.5, 0.40±0.07 and 0.67±0.08, respectively) and nucleotide diversity (π = 0.007, 0.007, 0.010, 0.006 and 0.008, respectively).

Restriction analysis of the ITS-1 amplified PCR fragment (approximately 750 bp) with *Hae*III, *Hpa*II, *Mnl*I, *Hha*I and *Hinf*I gave 31 composite haplotypes, which clearly distinguish between different populations. The AMOVA analysis inferred significant genetic differentiation among populations (F_{ST}: 0.1539, $p<0.05$) and revealed high percentage of variation within population (84.60). Analysis of genetic structure in each population (NA, RY, PU, PA and CN) showed high levels of haplotype diversity (h±SE = 0.59±0.07, 0.71±0.11, 0.71±0.04, 0.91±0.01 and 0.82±0.05, respectively) and nucleotide diversity (π = 0, 0, 0.004, 0.001 and 0.001, respectively). These results indicated that RY local fish farm population likely to be the same population of the Rayong natural population (RY) or they may come from the same maternal line. These results could be a basis for the development of suitable management strategies for conservation purposes.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... จ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ช

สารบัญ..... ซ

สารตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฐ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

สมมติฐานของการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

ชีววิทยาและการแพร่กระจายของปลาการ์ตูน..... 5

อนุกรมวิธานและชีววิทยาของปลาการ์ตูนอานม้า..... 6

ลักษณะทั่วไปของปลาการ์ตูนอานม้า..... 6

ดีเอ็นเอแหล่งที่มาของข้อมูลพันธุกรรม..... 7

- ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA)..... 7

- นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (Nuclear DNA)..... 9

การสกัดดีเอ็นเอ..... 10

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพ ปริมาณของดีเอ็นเอ..... 12

- การดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ..... 12

- วิธีการวัดการเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์..... 12

เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 13

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
2 (ต่อ)	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุล	14
	- เครื่องหมายโปรตีน (Protein marker)	14
	- เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)	14
	เทคนิคการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธีอาร์เอฟแอลพี	15
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
3	วิธีการดำเนินการวิจัย	20
	วัสดุและอุปกรณ์	20
	สารเคมี	20
	เอนไซม์	21
	ดีเอ็นเอมาตรฐาน	21
	ตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่ใช้ในการทดลอง	22
	ตอนที่ 1: ศึกษาวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากเนื้อเยื่อตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้า	
	- การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป	23
	- การสกัดด้วยวิธี PCR- ready genomic DNA	24
	- การสกัดด้วย Chloroform	24
	- การสกัดด้วย Guanidine Thiocyanate	24
	ตอนที่ 2: การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาการ์ตูนอานม้า	
	- ศึกษาในบริเวณยีน 16S rRNA, ND4-ND5 และบริเวณ D-loop ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ	25
	- ศึกษาในบริเวณยีน ITS-1 ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ	29
	การทำผลิตผลพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์	30
	การโคลนชิ้นผลิตผลพีซีอาร์เข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์	31
	การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ	32
	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	33
	การคัดเลือกเรสทริกชันเอนไซม์เพื่อตัดผลิตผลพีซีอาร์	33
	การวิเคราะห์ข้อมูล	35

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย	36
ตอนที่ 1 วิธีการเตรียมจีโนมิกดีเอ็นเอที่เหมาะสม	36
- การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปลาการ์ตูนอานม้า	36
- การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนหรือบริเวณต่างๆ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์	37
ตอนที่ 2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาการ์ตูนอานม้า	41
- บริเวณยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ	41
- บริเวณยีน ND4-ND5 ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ	41
- บริเวณ D-loop หรือ control region ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ	46
- บริเวณ ITS-1 ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ	56
5 อภิปรายและสรุปผล	66
อภิปรายผลการทดลอง	66
สรุปผลการทดลอง	73
ข้อเสนอแนะ	74
บรรณานุกรม	75
ภาคผนวก	84
ก ข้อมูล composite haplotype บริเวณ D-loop และ ITS-1 ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจาก 5 แหล่ง	85
ข วิธีการเตรียมสารเคมี	94
ค ผลงานเผยแพร่วิชาการจากงานวิจัย	97
ประวัติย่อของผู้วิจัย	123

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3-1 แหล่งตัวอย่าง จำนวนและสัญลักษณ์ที่ใช้ในการวิจัย..... 23

3-2 ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน 16S rRNA, ND4-ND5 และ D-loop..... 26

3-3 ส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณยีน 16S rRNA และ ND4-ND5..... 27

3-4 ส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณ D-loop..... 27

3-5 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณยีน 16S rRNA..... 28

3-6 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณยีน ND4-ND5..... 28

3-7 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณ D-loop..... 28

3-8 ส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของบริเวณ ITS-1..... 29

3-9 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณ ITS-1..... 30

3-10 ขั้นตอนทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม..... 32

3-11 ตำแหน่งตัดของเรสทริกชันเอนไซม์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้..... 34

4-1 เปรียบเทียบปริมาณ คุณภาพของดีเอ็นเอ และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ..... 39

4-2 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D-loop ของปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) จากการศึกษากับข้อมูล GenBank..... 47

4-3 ชนิดเอนไซม์ จำนวนชิ้นดีเอ็นเอและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ที่คาดการณ์เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Mse*I, *Ssp*I, *Hpy*CH4V, *Ase*I และ *Hpa*II ในปลาการ์ตูนอานม้า (รหัส RY10)..... 48

4-4 รูปแบบ haplotype และขนาดชิ้นดีเอ็นเอของบริเวณ D-loop ที่ได้จากการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์..... 49

4-5 ความถี่ของรูปแบบ haplotype ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์บริเวณ D-loop ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งต่างๆ..... 52

4-6 ความถี่ของ composite haplotype, haplotype diversity และ nucleotide diversity บริเวณ D-loop ภายในประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งต่างๆ..... 53

4-7 ผลการวิเคราะห์ AMOVA ในบริเวณ D-loop ของปลาการ์ตูนอานม้าจากประชากร 5 แหล่ง..... 54

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4-8 เปรียบเทียบค่า F_{ST} โดยวิเคราะห์จากบริเวณ D-loop ระหว่างกลุ่มประชากรของปลาการ์ตูนอานม้า (ครึ่งเมทริกซ์ล่าง) และ *P*-value (ครึ่งเมทริกซ์บน) * แสดงระดับค่านัยสำคัญที่ $p<0.05$ 54

4-9 ชนิดเอนไซม์ จำนวนชิ้นดีเอ็นเอและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์โดยใช้โปรแกรม webcutter 2.0 ของลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวแทนปลาการ์ตูนอานม้า (รหัส NA31) ในบริเวณ ITS-1 59

4-10 รูปแบบ haplotype และขนาดชิ้นดีเอ็นเอของบริเวณ ITS-1 ที่ได้จากการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 60

4-11 ความถี่ของรูปแบบ haplotype ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์บริเวณ ITS-1 ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งต่างๆ 61

4-12 ความถี่ของ composite haplotype, haplotype diversity และ nucleotide diversity บริเวณ ITS-1 ภายในประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งต่างๆ 62

4-13 ผลการวิเคราะห์ AMOVA ในบริเวณ ITS-1 ของปลาการ์ตูนอานม้า จากประชากร 5 แหล่ง 63

4-14 เปรียบเทียบค่า F_{ST} โดยวิเคราะห์จากบริเวณ ITS-1 ระหว่างกลุ่มประชากรของปลาการ์ตูนอานม้า (ครึ่งเมทริกซ์ล่าง) และ *P*-value (ครึ่งเมทริกซ์บน) * แสดงระดับค่านัยสำคัญที่ $p<0.05$ 63

ผ-1 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ D-loop ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งธรรมชาติ (NA) 86

ผ-2 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ D-loop ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) และ จ. ภูเก็ต (PU) 87

ผ-3 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ D-loop ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งเพาะเลี้ยง จ. พังงา (PA) 88

ผ-4 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ D-loop ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี (CN) 89

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ผ-5 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ ITS-1 ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งธรรมชาติ (NA)..... 89

ผ-6 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ ITS-1 ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) และ จ. ภูเก็ต (PU)..... 90

ผ-7 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ ITS-1 ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งเพาะเลี้ยง จ. พังงา (PA)..... 91

ผ-8 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ ITS-1 ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี (CN)..... 92

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะสัณฐานวิทยาตัวเต็มวัยของปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) จากประเทศฟิลิปปินส์	7
2-2	องค์ประกอบภายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของปลา *Larimichthys crocea*	8
2-3	โครงสร้างของยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอแสดงบริเวณ ITS-1 และ ITS-2	10
2-4	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	14
3-1	แผนผังแสดงตำแหน่งเก็บตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) จากบริเวณหน้าหาดพลา อ.บ้านฉาง จ.ระยอง	22
4-1	แถบดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อปลาการ์ตูนอานม้าที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งและแช่ในเอทานอลแล้วสกัดได้จาก 4 วิธี	37
4-2	แถบดีเอ็นเอของผลิตผลพีซีอาร์ของปลาการ์ตูนอานม้าในบริเวณยีน ND4-ND5, 16S rRNA และ ITS-1 โดยสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (a), PCR- ready genomic DNA (b), Chloroform (c) และ Guanidine Thiocyanate (d)..	38
4-3	ค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีต่างกัน 4 วิธีจากตัวอย่างแช่แข็งและแช่ในเอทานอล 100%	40
4-4	ค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างแช่แข็งและแช่ในเอทานอล 100% จากวิธีสกัดทั้ง 4 วิธี	40
4-5	ผลิตผลพีซีอาร์ในบริเวณยีน 16S rRNA ขนาดประมาณ 650 คู่เบสของปลาการ์ตูน 6 ชนิด	42
4-6	รูปแบบ PCR-RFLP ในบริเวณ 16S rRNA ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *Mse*I	43
4-7	แถบดีเอ็นเอของผลิตผลพีซีอาร์ในบริเวณ ND4-ND5 ขนาดประมาณ 895 คู่เบสของปลาการ์ตูน 4 ชนิด	43
4-8	รูปแบบ PCR-RFLP ในบริเวณ ND4-ND5 ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *Bfu*CI (A) และ *Dde*I (B) ของปลาการ์ตูน 4 ชนิด	44
4-9	แถบดีเอ็นเอของผลิตผลพีซีอาร์ในบริเวณ ND4-ND5 ขนาดประมาณ 895 คู่เบสของปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งต่างๆ	44
4-10	รูปแบบ PCR-RFLP ในบริเวณ ND4-ND5 ของปลาการ์ตูนอานม้าในแต่ละแหล่งภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *Bfu*CI+*Hea*III	45

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4-11 รูปแบบ PCR-RFLP ในบริเวณ ND4-ND5 ของปลาการ์ตูนอานม้าในแต่ละแหล่ง ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *Dde*I+*Hea*III..... 45

4-12 แถบดีเอ็นเอของผลิตผลพีซีอาร์ในบริเวณ D-loop ขนาดประมาณ 1,100-1,400 คู่เบส ของปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติและจากแหล่งเพาะเลี้ยงใน จ. ระยอง 46

4-13 แถบดีเอ็นเอของผลิตผลพีซีอาร์ในบริเวณ D-loop ขนาดประมาณ 1,100 คู่เบสของ ปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งเพาะเลี้ยงใน จ. ภูเก็ต จ. พังงา และ จ. ชลบุรี..... 46

4-14 ไดอะแกรมลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D-loop ขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส ตัดด้วย เอนไซม์ *Mse*I, *Ssp*I, *Hpy*CH4V, *Ase*I และ *Hpa*II..... 48

4-15 UPGMA dendrogram บริเวณ D-loop ของแต่ละประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจาก แหล่งต่างๆ สร้างจากโปรแกรม Gene Directory..... 55

4-16 UPGMA dendrogram บริเวณ D-loop ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจาก 5 แหล่ง คำนวณจาก Nei's genetic distance และ bootstrap=1,000 ครั้ง..... 56

4-17 แถบดีเอ็นเอของผลิตผลพีซีอาร์ในบริเวณ ITS-1 ขนาดประมาณ 750 คู่เบสของ ปลาการ์ตูนอานม้าจาก 5 แหล่ง..... 58

4-18 ไดอะแกรมลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-1 ของตัวแทนปลาการ์ตูนอานม้าจาก ธรรมชาติ ขนาดประมาณ 750 คู่เบส ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III, *Hpa*II, *Mnl*I, *Hha*I และ *Hin*fI โดยใช้โปรแกรม NEBcutter 2.0..... 59

4-19 UPGMA dendrogram บริเวณ ITS-1 ของแต่ละประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่ง ต่างๆ สร้างจากโปรแกรม Gene Directory..... 64

4-20 UPGMA dendrogram บริเวณ ITS-1 ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจาก 5 แหล่ง คำนวณจาก Nei's genetic distance และ bootstrap=1,000 ครั้ง..... 65

ผ-1 แผนที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T easy Vector..... 96

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University