บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลาการ์ตูน (anemonefish, clownfish) จัดอยู่ในครอบครัวปลาสลิดหิน (Pomacentridae) เป็นปลาทะเลสวยงามกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีส่วนแบ่งตลาดเกือบร้อยละ 50 ของปลาทะเลสวยงามทั่วโลก โดยมีมูลค่าตลาดภายในประเทศประมาณ 150 ล้านบาท ปัจจุบันไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ ในแต่ละปีมีการนำเข้าจากต่างประเทศคิดเป็นมูลค่าประมาณ 2-3 ล้านบาท (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2548) ทำให้มีการลักลอบจับปลาการ์ตูนจากธรรมชาติ จึงส่งผลให้ประชากรของปลาการ์ตูนในธรรมชาติลดลงอย่างมากจนเกือบเข้าภาวะวิกฤติ (สุขใจ รัตนยุวกร, กรรณิกา ชัชวาลพานิช, พิสุทธิ์ มังกรกาญจน์ และอมรา ทองปาน, 2548) ในปัจจุบันแม้จะมีการเพาะเลี้ยงปลาการ์ตูน แต่ยังต้องอาศัยพ่อแม่พันธุ์ที่จับมาจากธรรมชาติ ซึ่งเป็นประเด็นหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อการลดจำนวนประชากรปลาการ์ตูนที่มีในธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาการ์ตูนอานม้า (*Amphiprion polymnus*) ซึ่งเป็น 1 ใน 2 ชนิดที่มีรายงานการพบในทะเลฝั่งอ่าวไทย มีการแพร่กระจายในบริเวณจำกัด เนื่องจากความจำเพาะของแหล่งอาศัยที่ต้องอาศัยดอกไม้ทะเล (Allen & Fautin, 1994) อีกทั้งยังมีปัญหาในด้านการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์เพราะปลาการ์ตูนชนิดนี้อ่อนแอต่อสภาพแหล่งอาศัยใหม่ในฟาร์มเพาะเลี้ยง มีอัตราการเจริญเติบโตช้า อัตราการวางไข่ต่ำ (นฤดม พิสิฐเกษม, สัมภาษณ์, 26 พฤศจิกายน 2551) ดังนั้นจึงควรศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของปลาการ์ตูนอานม้าในธรรมชาติและที่ได้จากฟาร์มเพาะเลี้ยง เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการประยุกต์ใช้จัดการทรัพยากรปลาการ์ตูนอานม้า เพื่อนำไปสู่การวางแผนการอนุรักษ์และส่งเสริมการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ต่อไป

ในปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากรด้วยเทคนิค PCR-RFLP (RFLP; restriction fragment length polymorphism) เป็นจำนวนมาก (Hilsdorf, Azeredo, & Krieger, 2002) เนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่สามารถตรวจสอบลักษณะที่มีการข่มแบบโคโดมิแนนท์ได้ สามารถทำได้รวดเร็ว ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นด้วยเทคนิคพีซีอาร์แล้วให้รูปแบบของดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับชนิดหรือแสดงความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างที่ศึกษาเมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน (Wolf, Burgener, Hubner, & Luthy, 2000; Klossa, Papasotiropolos, Kilias, & Alahiotis, 2002; Moyses & Almeida, 2002; Miya, Saitoh, Wood, Nishida, & Mayden, 2006)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ซึ่งเหมาะสมกับการศึกษาในระดับประชากรที่ต้องใช้ตัวอย่างเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้วิธีการเตรียมดีเอ็นเอมีความสำคัญเช่นกัน ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของการศึกษา เทคนิคการเตรียมจึงต้องเหมาะสมกับชนิดของเนื้อเยื่อ จำนวนตัวอย่างที่รวบรวมได้ และควรใช้เนื้อเยื่อในปริมาณน้อย สามารถปล่อยตัวอย่างที่มีชีวิตกลับคืนสู่ธรรมชาติเดิมได้ มีขั้นตอนในการเตรียมน้อย ใช้ระยะเวลาสั้น มีความสะดวกและได้สารพันธุกรรมตั้งต้นที่มีคุณภาพเพื่อนำไปใช้ศึกษาด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในขั้นตอนต่อไปได้

ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั่วไปโดยเฉพาะสัตว์มีที่มาจาก 2 แหล่ง คือ 1) ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรียมีรายงานการศึกษาไว้อย่างมากมาย ถึงความแปรผันของข้อมูลพันธุกรรมในระดับประชากร (Miya et al., 2005; Cameron & Whiting, 2007; Jonniaux & Kumazawa, 2007) เช่น ในส่วนของยีน 16S rRNA (Patarnello, Bargelloni, Caldara, & Colombo, 1994; Klossa et al., 2002) ND4, ND5 และบริเวณ D-loop เป็นต้น และ 2) นิวเคลียร์ดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียส โดยเฉพาะในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ทั้ง 2 บริเวณ (ITS-1 และ ITS-2) ของยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) ซึ่งเป็นบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีการแปรผันและแตกต่างกันในระดับประชากรเช่นกัน (Vogler & Desalle, 1994; Stothard, Hughes, & Rollinson, 1996)

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติและฟาร์มเพาะเลี้ยงโดยศึกษาในบริเวณยีน 16S rRNA, ND4-ND5 และ D-loop หรือ control region ซึ่งอยู่ในบริเวณไมโทคอนเดรียและบริเวณ ITS-1 ที่อยู่ในนิวเคลียส ด้วยเทคนิค PCR-RFLP เพื่อนำข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ได้มาใช้ประโยชน์ในการประเมินสถานการณ์ประชากรปลาการ์ตูนอานม้าในธรรมชาติและนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น การอนุรักษ์ทรัพยากรสิ่งแวดล้อม การเพาะเลี้ยง การตรวจสอบแหล่งอาศัย ความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะถิ่นหรือแหล่งที่มาของปลาการ์ตูนได้อย่างถูกต้องและแม่นยำต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติและฟาร์มเพาะเลี้ยง

2. เพื่อศึกษาหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปลาการ์ตูนอานม้าที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งและแช่ในเอทานอล 100% ที่มีคุณภาพสามารถเพิ่มผลผลิตได้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์และสามารถนำมาใช้ศึกษาต่อด้วยวิธี PCR-RFLP ได้

สมมติฐานของการวิจัย

1. ประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง เมื่อศึกษาจากยีน 16S rRNA, ND4-ND5 และบริเวณ D-loop ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ และบริเวณ ITS-1 ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอซึ่งสามารถตรวจสอบผลได้ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

2. วิธีการสกัดดีเอ็นเอทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอและคุณภาพที่แตกต่างกันออกไป และวิธีที่เหมาะสมสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. สามารถนำข้อมูลความหลากหลาย หรือความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดระหว่างและ/ หรือภายในประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าในธรรมชาติและฟาร์มเพาะเลี้ยงที่ทำการศึกษาครั้งนี้มาใช้ประเมินสถานการณ์ประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าในธรรมชาติได้

2. สามารถนำวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมทั้งคุณภาพ ปริมาณ ใช้ศึกษากับตัวอย่างจำนวนมากและไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างชนิดอื่น ๆ ได้

3. สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น การอนุรักษ์ทรัพยากรสิ่งแวดล้อม การเพาะเลี้ยง การตรวจสอบความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะถิ่นหรือแหล่งที่มาของปลาการ์ตูนได้อย่างถูกต้องและแม่นยำต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งธรรมชาติ ในบริเวณหาดพลา อ.บ้านฉาง จ.ระยองจำนวน 45 ตัวอย่าง และจากฟาร์มเพาะเลี้ยง 4 แหล่งจากในจังหวัดระยอง ภูเก็ต พังงา และชลบุรี แหล่งละ 10, 29, 52 และ 20 ตัวอย่าง ตามลำดับ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าจากแต่ละแหล่งในส่วนของยีน 16S rRNA, ND4-ND5, D-loop และบริเวณ ITS-1 ด้วยเทคนิค PCR-RFLP เฉพาะในส่วนของยีน 16S rRNA ทำการศึกษาภายในระดับสกุลกับปลาการ์ตูน 6 ชนิด คือ ปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ปลาการ์ตูนเพอคูล่า (*A. percula*) ปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) ปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลือง (*A. sebae*) ปลาการ์ตูนแดงดำ (*A. ephippium*) และปลาการ์ตูนแดง (*Premnas biaculeatus*) จากฟาร์มเพาะเลี้ยง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University