บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชีววิทยาและการแพร่กระจายของปลาการ์ตูน

ปลาการ์ตูนเป็นปลาที่จัดอยู่ในครอบครัวปลาสลิดหิน (damselfish, family Pomacentridae) ในปัจจุบันทั่วโลกมีทั้งหมด 28 ชนิด โดยจำแนกออกเป็น 2 สกุล (genus) คือ *Amphiprion* มีจำนวน 27 ชนิด และ สกุล *Premnas* จำนวน 1 ชนิด ปลาการ์ตูนแต่ละชนิดมีลวดลายและสีสันที่เป็นเอกลักษณ์ ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกปลาการ์ตูน 2 สกุลนี้ คือ หนามที่แก้ม จำนวนของเกล็ดในแต่ละแถว สีและรูปแบบของสี (Nelson, 1994) ทั้งนี้สกุล *Premnas* จะมีลักษณะที่แตกต่างออกไปคือ มีหนามขนาดใหญ่ (enlarged spine) บริเวณใต้ตา (Allen, 1997) ในประเทศไทยมีรายงานชนิดของปลาการ์ตูนทั้งหมด 7 ชนิด ซึ่งอยู่ในสกุล *Amphiprion* ทั้งหมด โดยบางชนิดสามารถพบได้เฉพาะบริเวณน่านน้ำฝั่งทะเลอันดามันหรืออ่าวไทยเท่านั้น แต่บางชนิดสามารถพบได้ทั้ง 2 ฝั่งทะเลของประเทศไทย ปลาการ์ตูนจะอาศัยอยู่ในแนวปะการังร่วมกับดอกไม้ทะเลเพื่อใช้เป็นแหล่งหลบภัย และป้องกันอันตรายจากปลาขนาดใหญ่หรือผู้ล่าได้ ในธรรมชาติพบว่าปลาการ์ตูนแต่ละชนิดมีความเจาะจงกับดอกไม้ทะเล (sea anemone) ที่อาศัย แต่ก็มีปลาการ์ตูนอีกหลายชนิดที่สามารถอยู่ร่วมกับดอกไม้ทะเลหลายชนิด (Allen & Fautin, 1994) ดอกไม้ทะเลเป็นสัตว์ทะเลที่มีเข็มพิษอยู่บริเวณหนวด จึงทำให้สัตว์น้ำที่ถูกเข็มพิษเกิดอาการชาหรืออาจถึงตายได้ แต่เข็มพิษนั้นไม่เป็นอันตรายต่อปลาการ์ตูนแต่อย่างใด เนื่องจากปลาการ์ตูนมีเมือกหุ้มตัวที่มีสารเคมีพิเศษสามารถป้องกันตัวเองจากเข็มพิษของดอกไม้ทะเลได้ (Allen & Fautin, 1992) ดังนั้นในธรรมชาติจะสามารถพบปลาการ์ตูนได้ต่อเมื่อพบดอกไม้ทะเลเท่านั้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. อนุกรมวิธานและชีววิทยาของปลาการ์ตูนอานม้า

A. polymnus มีชื่อสามัญคือ ปลาการ์ตูนอานม้า (Saddleback anemonefish) เนื่องจากมีแถบบริเวณหลังพาดลงมาประมาณกลางลำตัว มีลักษณะคล้ายอานม้า (ภาพที่ 2-1) ซึ่ง Nelson (1994) จัดลำดับอนุกรมวิธานของปลาการ์ตูนอานม้าไว้ดังนี้

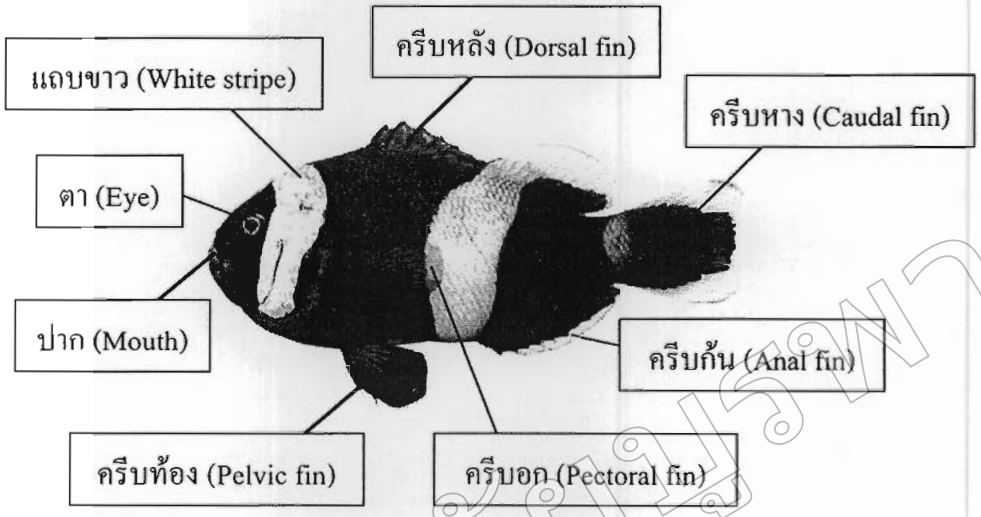
Kingdom Animalia
Phylum Chordata
Class Actinopterygii
Division Telostei
Order Perciformes
Family Pomacentridae
Genus *Amphiprion*
Species *polymnus*

ปลาการ์ตูนอานม้ามักอาศัยอยู่กับดอกไม้ทะเลที่ฝังตัวอยู่ตามพื้นทรายคือดอกไม้ทะเล *Heteractis crispa* มีสีม่วงหรือสีน้ำตาล หนวดยาวมาก และดอกไม้ทะเล *Stichodactyla haddon* มีสีน้ำตาล หนวดสั้น อาศัยในระดับความลึก 2-30 เมตร นอกจากนี้ยังพบว่าปลาการ์ตูนชนิดนี้ยังสามารถอาศัยอยู่เหนือพื้นโคลนหรือพื้นทราย ในแอ่งน้ำใต้ทะเล ตามซอกแนวปะการัง หรือบริเวณที่สามารถหลบซ่อนตัวได้ (สุขใจ รัตนยุวกร, 2546) ปลาการ์ตูนอานม้ามีการแพร่กระจายบริเวณมหาสมุทรแปซิฟิกฝั่งตะวันตก ตั้งแต่ประเทศจีน เวียดนาม ไต้หวัน อินโดนีเซียและออสเตรเลีย และอ่าวไทย (Allen, 1997)

2. ลักษณะทั่วไปของปลาการ์ตูนอานม้า

ปลาการ์ตูนอานม้า ลำตัวมีสีน้ำตาลอมดำ มีแถบขาว 2 แถบ แถบแรกอยู่หลังตา อีกแถบเริ่มบริเวณกลางลำตัวเป็นแถบโค้งพาดเฉียงขึ้นไปที่ครีบหลัง พบในที่ลึก ตั้งแต่ 2-30 เมตร ขนาดโตเต็มที่มีความยาวประมาณ 12 เซนติเมตร (สุขใจ รัตนยุวกร, 2546) ปลาการ์ตูนอานม้ามีความแปรปรวนของสีลำตัวค่อนข้างมากและแปรปรวนไปตามแหล่งอาศัย ลักษณะทั่วไปของปลาการ์ตูนอานม้าที่พบในประเทศไทยลำตัวมักมีสีน้ำตาลอมดำ ส่วนหัว อกและครีบอกมีสีส้มอมเหลือง (Allen & Fautin, 1992)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-1 ลักษณะสัณฐานวิทยาตัวเต็มวัยของปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) จากประเทศฟิลิปปินส์ (ดัดแปลงจาก Allen & Fautin, 1992)

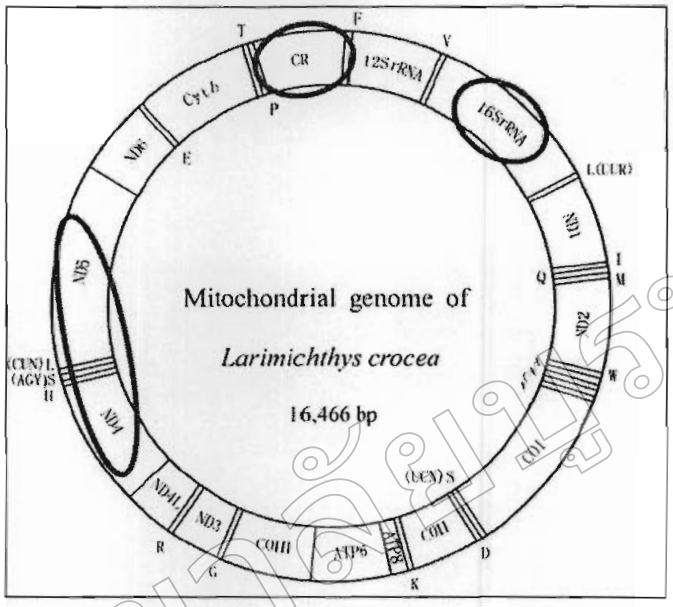
ดีเอ็นเอแหล่งที่มาของข้อมูลพันธุกรรม

แหล่งที่มาของข้อมูลพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต ได้มาจาก 2 แหล่งใหญ่คือ 1) ออร์แกเนลล์ คือ ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) สำหรับในสัตว์ และคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast) สำหรับในพืช 2) นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (nuclear DNA หรือ chromosomal DNA) ที่อยู่ในนิวเคลียสของสิ่งมีชีวิตทั่วไป

1. ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA)

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่อยู่ในไซโทพลาสซึม เป็นแหล่งผลิตพลังงาน ATP โดยปฏิกิริยา oxidation phosphorylation ในแต่ละเซลล์มีไมโทคอนเดรียลจำนวนมาก แต่ละไมโทคอนเดรียจะไม่พบองค์ประกอบของโปรตีนหรือมีจำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ ในพืชนั้นจีโนมของไมโทคอนเดรียมีขนาด 570 กิโลเบส แต่ในสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปมีขนาดประมาณ 16-20 กิโลเบส ในคนมีขนาดเท่ากับ 16.6 กิโลเบส ส่วนในปลามีขนาดประมาณ 16-17 กิโลเบส (Mitsugu, Masaki & Nihida, 2003) ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอประกอบด้วยยีนที่สามารถเปลี่ยนเป็นรหัสของโปรตีนจำนวน 13 ชนิด เช่น ยีน ND4, ND5, Cytochrome *b* และ COI เป็นต้น รวมทั้งมีส่วนของบริเวณ D-loop หรือ control region (CR; ภาพที่ 2-2) ซึ่งไม่สามารถแปลรหัสได้ แต่เป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนสูงกว่าบริเวณอื่น ๆ ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Wolf, Rentsch, & Hubner, 1999) นอกจากนี้ยังประกอบด้วย tRNA จำนวน 22 ชนิด และ rRNA จำนวน 2 ชนิด คือ 12S rRNA และ 16S rRNA (Mitsugu et al., 2003) ดังแสดงในภาพที่ 2-2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-2 องค์ประกอบภายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของปลา *Larimichthys crocea* (Cui, Liu, Li, You, & Chu, 2009)

หมายเหตุ บริเวณที่วงกลม คือ ตำแหน่งยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ทำการศึกษาครั้งนี้

ND4 (NADH dehydrogenase 4) และ ND5 (NADH dehydrogenase 5) เป็นยีนที่สังเคราะห์โปรตีน อยู่ในส่วนหนึ่งของเอนไซม์คอมเพลกซ์ขนาดใหญ่หรือที่เรียกว่า คอมเพลกซ์ 1 ซึ่งเป็นส่วนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ยีน ND4-ND5 มีขนาด 3,245 คู่เบส ซึ่งคิดเป็น 19.49% ของยีนทั้งหมด [ข้อมูลจากปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ที่มีการรายงานลำดับเบสที่สมบูรณ์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอไว้ในฐานข้อมูล GenBank หมายเลขรหัส AP006017] โดยใช้ออกซิเจนและน้ำตาลเป็นตัวสร้าง adenosine triphospate (ATP) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักของเซลล์ คอมเพลกซ์ 1 มีความจำเป็นต่อการเกิด oxidative phosphorylation ในแต่ละคอมเพลกซ์จะถูกฝังตัวอยู่ด้านในและมีการพับตัว เรียกว่า เยื่อชั้นใน (inner mitochondrial membrane) ระหว่างที่มีการเกิด oxidative phosphorylation จะมีการปลดปล่อยปฏิกิริยาเคมีทำให้เกิด ATP นอกจากนั้นการเกิดความต่างกันของประจุไฟฟ้าระหว่างด้านในและด้านนอกของเยื่อชั้นในจะทำให้เกิดการส่งถ่ายประจุลบที่เรียกว่า อิเล็กตรอน ความแตกต่างระหว่างประจุที่เกิดขึ้นจะนำไปสู่การสร้างพลังงาน ATP โดยคอมเพลกซ์ 1 เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดขั้นแรกในการกระบวนการส่งถ่ายอิเล็กตรอน โดยส่งถ่ายจาก NADH ไปยังโมเลกุลอื่นๆ ที่เรียกว่า ubiquinone และอิเล็กตรอนก็สามารถส่งผ่านจาก ubiquinone ไปยังคอมเพลกซ์อื่น ๆ อีก ทำให้เกิดกระบวนการสร้างพลังงาน ATP (Devor, 1996)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

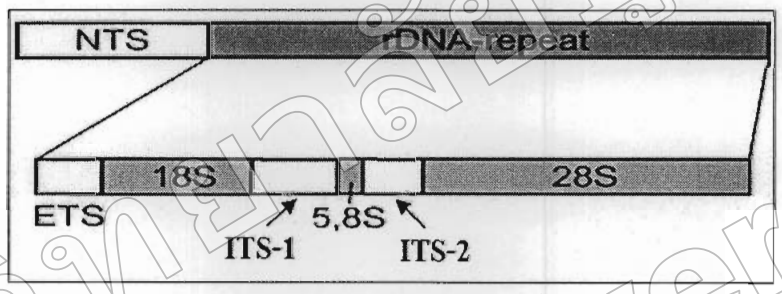
สำหรับ 16S rRNA เป็นยีนหนึ่งที่อยู่ในไรโบโซม สับยูนิต (sub unit) 30S เป็นสับยูนิตขนาดเล็ก ในโปรคาริโอต (prokaryotic) มีความยาว 1,542 นิวคลีโอไทด์ ทำหน้าที่หลายประการดังนี้ 1) เชื่อมติดกับสับยูนิต 23S ทำให้สองสับยูนิตของไรโบโซมอลเชื่อมติดกันได้ (50S+30S) 2) ทำให้การเข้าจับกันของโคดอน-แอนติโคดอนที่ตำแหน่ง A site มีความคงตัวและถูกต้องมากขึ้น 3) ด้านปลาย 3' ของ 16S rRNA จะเข้าจับกับปลาย 5' ของ mRNA ซึ่งเรียกว่า Shine-Dalgarno sequence ทำให้โคดอนเริ่มต้น (AUG) สามารถเริ่มอ่านต่อไปได้ ยีนเหล่านี้เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากสารเคมีหรือเกิดความผิดพลาดของการถอดรหัสจะไม่มีการซ่อมแซมเกิดขึ้นเนื่องจากไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอไม่มีขบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอซึ่งแตกต่างจากนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ ดังนั้นไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจึงมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการสูงกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ การใช้ชนิดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมและยีนที่มีอัตราวิวัฒนาการสูงจะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้สูงขึ้น นอกจากนั้นการถ่ายทอดพันธุกรรมจากดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียเป็นการถ่ายทอดผ่านทางแม่เท่านั้น (maternally inheritance) ซึ่งต่างจากนิวเคลียร์ดีเอ็นเอที่ได้รับผ่านทางนิวเคลียสที่ได้มาจากทั้งเซลล์อสุจิและเซลล์ไข่ (สมพร ประเสริฐส่งสกุล, 2547) ดังนั้นจึงง่ายต่อการติดตามศึกษา นอกจากนี้การศึกษาในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอยังมีข้อสำคัญ คือ 1) มีจำนวนยีนที่ใช้พิจารณาในปริมาณมาก (Carrera, Garcia, Cespedes, Gonzalez, Fernandez, Hernandez, & Martin, 1999; Barriga-Sosa, Perez-Ramirez, Soto-Aguirre, Castillo-Rivera, & Arredondo-Figueroa, 2005; Ishizaki, Yokoyama, Oshiro, Teruya, Nagashima, Shiomi, & Watabe, 2005) 2) สามารถวิเคราะห์ในบริเวณที่แปลรหัสและบริเวณที่ไม่สามารถแปลรหัสได้ และ 3) ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอยังสามารถพบได้ในเซลล์ที่มีการสลายตัวไปบ้างหรือพบได้ในเนื้อเยื่อที่เน่าเปื่อยแล้ว (Asntini & Polacco, 2006)

2. นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (Nuclear DNA)

นิวเคลียร์ดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียสประกอบด้วยไรโบโซมอลดีเอ็นเอ จะถูกถอดรหัสเป็นไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA; rRNA) โดยเป็นองค์ประกอบของไรโบโซม อาร์เอ็นเอรวมกับโปรตีนกลายเป็นหน่วยของไรโบโซม ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งที่เกิดการอ่านรหัสจากยีนในนิวเคลียส ซึ่งถูกส่งออกจากนิวเคลียสในรูป mRNA มาสร้างเป็นโปรตีน ไรโบโซมของโปรคาริโอตจะประกอบด้วย rRNA 3 ชนิด คือ 5S rRNA, 16S rRNA และ 23S rRNA ส่วนไรโบโซมของยูคาริโอตจะประกอบด้วย rRNA 4 ชนิด คือ 18S rRNA, 5.8S rRNA, 28S rRNA และ 5S rRNA (Aghajani, Jones, Chapman, & Brunk, 1994) โครงสร้างของยีนในนิวเคลียสนี้จะมีลำดับเบสที่ซ้ำกันเป็นจำนวนหลายร้อยซ้ำของชุดยีนแต่ละชุด โดยมีส่วนคั่นกลางระหว่างยีนคือ บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับเบสประมาณ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

500-1200 bp ประกอบด้วย บริเวณ ITS-1 ซึ่งเป็นบริเวณที่คั่นระหว่างยีน 18S-5.8S rRNA และบริเวณ ITS-2 เป็นบริเวณที่คั่นระหว่างยีน 5.8S-28S rRNA แสดงในภาพที่ 2-3 (Hilis & Dixon, 1991) ITS เป็นบริเวณอินทรอนที่ถูกตัดออก ไม่มีการถอดรหัสออกมาเป็นไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ เป็นบริเวณที่ลำดับเบสมีความแปรปรวนสูง (Kuriiwa, Hanzawa, Yoshino, Kimura, & Nishida, 2007) จึงนิยมศึกษาความแตกต่างภายในประชากรและระหว่างประชากรภายในชนิดเดียวกันของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Martinez, Bescos, Sara, & Valera, 2000; Worheide, Nichols, & Goldberg, 2004)



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอแสดงบริเวณ ITS-1 และ ITS-2
(ดัดแปลงจาก Hillis & Dixon, 1991)

การสกัดดีเอ็นเอ

การได้มาซึ่งดีเอ็นเอที่เป็นข้อมูลพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นจะต้องผ่านกระบวนการสกัดออกมาจากเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จากพืชหรือสัตว์มีหลักการพื้นฐาน ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การทำให้เซลล์แตก โดยทำให้ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกออก เพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมา ดังนั้นการทำให้เซลล์แตกได้โดยใช้สารพวก detergent หรือสารซักฟอก ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการละลายไขมัน เช่น สบู่ สารโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) ซึ่งจัดเป็นสาร detergent สังเคราะห์ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติในการละลายไขมันและเป็นสารทำให้เกิดฟอง ในงานวิจัยทั่วไปนิยมใช้สาร SDS ในการทำให้เซลล์แตก

ขั้นตอนที่ 2 การแยกโปรตีนออกจากดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอที่พันขดกันแน่นอยู่กับโปรตีน ดังนั้นหลังจากที่ดีเอ็นเอถูกปลดปล่อยออกมาแล้ว โปรตีนสามารถถูกแยกออกมาโดยใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส ในงานวิจัยจะใช้เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ หลังจากโปรตีนถูกย่อยแล้วดีเอ็นเอจะถูกปล่อยให้เป็นอิสระละลายอยู่ในสารละลาย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ขั้นตอนที่ 3 การตกตะกอนดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอสามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์ ดังนั้นเมื่อค่อย ๆ เติมลงไปจะทำให้ลอยอยู่ด้านบน ดีเอ็นเอจะตกตะกอนในชั้นเอทานอล โดยพบว่าเป็นตะกอนขาวลอยอยู่ในชั้นเอทานอลเหนือผิวของส่วนน้ำ ส่วนประกอบของเซลล์อื่น ๆ จะยังคงอยู่ในชั้นของน้ำ

ปัจจุบันการสกัดดีเอ็นเอมีวิธีการและขั้นตอนที่หลากหลาย ซึ่งมีการนำเทคโนโลยีต่าง ๆ ที่ทันสมัยเข้ามาใช้ ทำให้การสกัดดีเอ็นเอมีความสะดวก อีกทั้งประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายอีกด้วย เช่น การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี 1) ชุดสกัดสำเร็จซึ่งเป็นการทำให้ดีเอ็นเอถูกยึดติดกับเรซินที่เคลือบบนผิวเมมเบรนของคอลัมน์ เป็นวิธีที่มีความสะดวก ใช้เวลาไม่นานและได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ แต่มีข้อเสีย คือ ชุดสกัดดีเอ็นเอมีราคาแพง 2) วิธี PCR-ready genomic DNA เป็นวิธีที่นำเนื้อเยื่อต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วเติม Tris HCl (pH 8.0) เพื่อปรับสภาพให้เป็นกลาง ซึ่งเป็นการสกัดที่ใช้เวลาค่อนข้างเร็ว ใช้สารเคมีที่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป วิธีไม่ยุ่งยาก แต่ก็มีข้อเสีย คือ ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณน้อย (Meeker, Hutchinson, Ho, &Tredes, 2007) 3) การใช้สารละลาย Chloroform (Sonnenberg, Nolte, & Taulz, 2007) เป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลานานในการสกัด โดยเติมสารละลาย HOM buffer (0.5% SDS, 100 mM Tris-HCl, 80 mM EDTA; pH 8.0) เพื่อย่อยเนื้อเยื่อให้มีขนาดเล็กลงและ Proteinase K เพื่อย่อยโปรตีน และเติม NaCl กับ chroloform ทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอน วิธีนี้ได้ดีเอ็นเอในปริมาณมากและมีคุณภาพ และ 4) การใช้สารละลาย Guanidine Thiocyanate เป็นวิธีที่นิยมในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากสารเคมีที่ใช้สามารถหาได้จากห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย สารละลาย Cell Lysis Solution (100 mM NaCl, 100 mM Tris-Cl; pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS) กับ Proteinase K เพื่อย่อยเนื้อเยื่อและโปรตีน ตามลำดับ แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย Guanidine Thiocyanate จากนั้นเติม 100% isopropanol ทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอน ซึ่งเป็นวิธีที่ได้ดีเอ็นเอปริมาณมากและคุณภาพค่อนข้างดี แต่ข้อเสีย คือ ใช้เวลาในการสกัดค่อนข้างมาก เช่นเดียวกับวิธีที่สกัดด้วย Chloroform (Sonnenberg et al., 2007)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพ ปริมาณของดีเอ็นเอ

การวัดคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้สามารถทำได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตรหรือวัดการเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์ สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง

1. การดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ

โดยที่เบสพิวรีนและไพริมิดีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอนั้น สามารถดูดแสงอัลตราไวโอเลตได้ โดยจุดสูงสุดอยู่ที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร ค่าการดูดแสงนี้เรียกว่า absorbance (A) หรือ optical density (OD) ค่าการดูดแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร หรือ OD_{260} นี้ นำมาใช้ประโยชน์ในการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ เนื่องจากสารละลายดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ หรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ซึ่งเป็นสายของนิวคลีโอไทด์สั้น ๆ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีค่า OD_{260} เป็น 20, 25 และ 30 ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อนำสารละลายของดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ หรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่เจือจางมาวัดค่า OD_{260} ค่าที่ได้สามารถคำนวณกลับหาความเข้มข้นของสารตั้งต้นและถ้าทราบปริมาตรของสารตั้งต้นก็สามารถคำนวณปริมาณเนื้อสารทั้งหมดได้ (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล, 2548)

2. วิธีวัดการเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์

โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์มีโครงสร้างเป็นอะโรมาติกแคตไอออนสามารถเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง (สมพร ประเสริฐส่งสกุล, 2547) โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้วจะสามารถบอกปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่างได้ โดยปริมาณที่ตรวจสอบวัดได้เป็นระดับนาโนกรัม ดังนั้นกรณีที่ปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างมีน้อยไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้จะใช้วิธีนี้ นอกจากนี้การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสยังสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอได้ว่ามีการปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเอ ซึ่งจะเห็นเป็นปื้นเคลื่อนที่เร็วกว่าดีเอ็นเอหรือไม่ (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล, 2545)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

ในกรณีที่ตัวอย่างศึกษามีปริมาณน้อย พีซีอาร์เป็นเทคนิคการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่พัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มจำนวนโมเลกุลของดีเอ็นเอในปริมาณมาก โดยทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ (ภาพที่ 2-4) ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยสารตั้งต้นที่สำคัญ ดังนี้

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้มาจากเซลล์ที่มีนิวเคลียสของมนุษย์ สัตว์ พืช หรือสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ และเป็นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับเบสแล้วบางส่วนโดยเฉพาะบริเวณที่ให้ไพรเมอร์เข้าจับที่มีลำดับเบสเข้าคู่กัน

2. ดีเอ็นเอสายเริ่มต้นขนาดสั้น ๆ เรียกว่า ไพรเมอร์ มีความยาวประมาณ 18-25 เบส จำนวน 2 สาย ใช้เป็นจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ เป็นตัวกำหนดขนาดดีเอ็นเอที่ทำการสังเคราะห์

3. นิวคลีโอไทด์หรือเบส มี 4 ชนิดคือ อะดีนีน (A) กัวนีน (G) ไซโตซีน (C) และไทมีน (T) ซึ่งเป็นส่วนองค์ประกอบสำคัญของโครงสร้างดีเอ็นเอ

4. เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีมอเรส (DNA polymerase) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็นสารเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA polymerase

6. บัฟเฟอร์ (buffer) เป็นสารที่ทำให้สภาพของสารในหลอดทดลองมีสภาวะความเป็นกรด – ด่างที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์มีข้อดี คือ การใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ใช้ระยะเวลาสั้น ค่าใช้จ่ายต่ำ และแปลผลได้ง่าย (อุไรวรรณ วิจารณกุล, 2545)

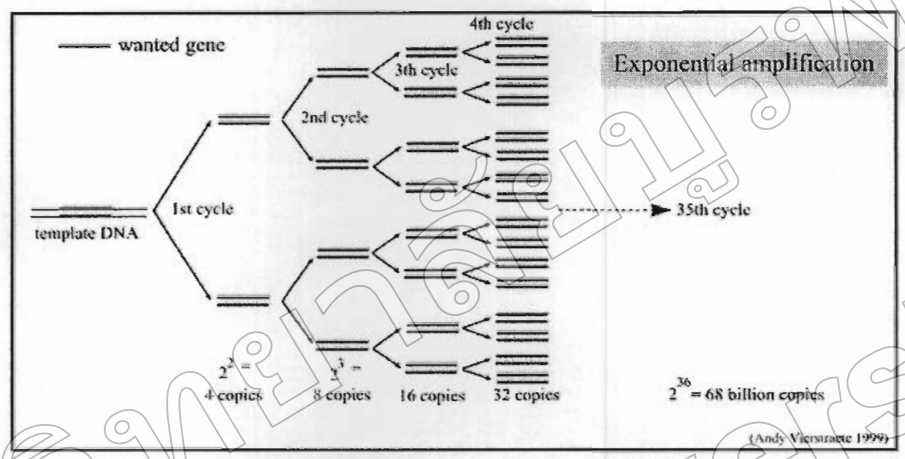
หลักการทำพีซีอาร์

1. การแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (Denaturation) โดยใช้อุณหภูมิสูง 94-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวคู่ออกจากกันเป็นสายเดี่ยว และทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

2. การจับของสายไพรเมอร์ (Annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 50-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบในบริเวณที่ลำดับเบสเข้าคู่กัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการต่อสายไพรเมอร์ (Extension) โดยใช้อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-120 วินาที ขึ้นอยู่กับความยาวของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ขั้นตอนนี้เอนไซม์ DNA polymerase จะทำหน้าที่นำเบส (A, T, C, G) ที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบมาต่อเข้าที่ปลายของสายไพรเมอร์ทั้งสองเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่



ภาพที่ 2-4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (ScienceBiotech, 2008)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุล

เครื่องหมายทางชีวโมเลกุล (Molecular Markers) มี 2 ระดับ คือ

1. เครื่องหมายโปรตีน (Protein marker) คือ การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีนใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส แล้วจึงย้อมดูแถบโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม เช่น การตรวจรูปแบบของโปรตีนในเลือด การตรวจรูปแบบของเอนไซม์บางชนิดหรือไอโซไซม์ต่าง ๆ เป็นต้น ข้อดีของการตรวจสอบ คือ สามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก เป็นต้น ส่วนข้อจำกัดของการตรวจสอบโปรตีน คือ ผลที่ได้ขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อ ระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เนื้อเยื่อ สภาพโปรตีนและไอโซไซม์เสียสภาพได้ง่าย เป็นต้น (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

2. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว สายพันธุ์ ชนิด หรือในระดับต่างชนิด เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(สุรินทร์ ปียะโชคณากุล, 2545) รวมทั้งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนามาจากเทคนิคพีซีอาร์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ 1) ประเภทที่มีไพรเมอร์ชนิดจำเพาะเจาะจง เครื่องหมายชนิดนี้ได้แก่ Sequence-Tagged Site (STS) และ SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) หรือ microsatellite และ 2) ประเภทที่มีไพรเมอร์ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง ได้แก่ RAPDs (Random Amplifiled Polymorphic DNAs) และ AFLP (Amplifiled Fragment Length Polymorphism) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค PCR-RFLP เป็นเครื่องหมายในการจำแนกความจำเพาะของแต่ละชนิด (species) ทั้งภายในกลุ่มประชากรและระหว่างกลุ่มประชากร (Chiang, Hsu, Wu, Chang, & Yang, 2008)

เทคนิคการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธีอาร์เอฟแอลพี (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism)

อาร์เอฟแอลพี (RFLP) หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอทั้งหมดทั้งจีโนมหรือเฉพาะบริเวณส่วนหนึ่งของยีนหรือดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือเรสทริกชันเอนไซม์ เพื่อให้เกิดเป็นแบบแผนที่จำเพาะและมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มหรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ทำโดยการนำสายดีเอ็นเอในบริเวณที่สนใจมาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะเข้าตัดสายดีเอ็นเอที่บริเวณลำดับของเบสที่จำเพาะเท่านั้น ดังนั้นถ้านำดีเอ็นเอจากแหล่งอื่นซึ่งมีลำดับเบสที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ต่างกันเพียง 1 เบส หรือตำแหน่งเดียว เรสทริกชันเอนไซม์ก็จะไม่ตัดที่ตำแหน่งนั้น ชิ้นส่วนที่ได้จากแต่ละแหล่งก็จะแตกต่างกันออกไป เมื่อนำไปแยกด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟริซิส แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏก็จะแตกต่างกัน (ชูตา บุญภักดี, 2544)

วิธีการศึกษา RFLP สามารถศึกษาได้อย่างจำเพาะมากขึ้น โดยทำภายหลังจากแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์นั้นด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟริซิส ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม เนื่องจากกรดนิวคลีอิคมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต (PO_4) ทำให้มีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก ดังนั้นก็จะสามารถตรวจสอบหาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีขนาดแตกต่างกันหรือดูแบบแผนของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะได้ (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสสวท., 2548) การศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLP ค่อนข้างได้รับความนิยมเพราะมีข้อดี คือ ใช้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อยโดยเพิ่มปริมาณให้มากขึ้น สามารถทำได้รวดเร็ว และมีการข่มแบบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โคโดมิแนนท์จึงเหมาะสำหรับการศึกษาระดับประชากรที่มีจำนวนตัวอย่างในปริมาณมาก แต่ก็มีข้อเสีย คือ สามารถวิเคราะห์ได้เพียง 1 ตำแหน่งหรือเอนไซม์ตัดจำเพาะอาจเกิดการตัดที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลได้หรือวิเคราะห์ข้อมูลผิดพลาดได้

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเตรียมดีเอ็นเอเป็นขั้นตอนแรกที่มีความสำคัญต่อการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุล ซึ่งขั้นตอนหรือวิธีที่แตกต่างกันมักจะให้ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่แตกต่างกันออกไป รวมถึงความเหมาะสมของการนำไปใช้งาน เพราะผลลัพธ์ที่ได้จากแต่ละวิธีอาจได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวหรือสายคู่ จึงทำให้มีงานวิจัยที่ศึกษาหาวิธีการเตรียมดีเอ็นเอเพื่อให้เหมาะสมกับตัวอย่างหรือเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษา เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและปริมาณมากเหมาะสมกับการนำไปใช้ ดังเช่นการเปรียบเทียบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอจากเมือกและเหงือกของปลามังกรหรือปลาอะโรวาร่า (*Scleropages formosus*, Osteoglosidae) ด้วยวิธีฟีนอล/ คลอโรฟอร์ม แล้วตรวจวัดคุณภาพและปริมาณโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.64 และ 1.83 สำหรับเหงือกและเมือก ตามลำดับ จะเห็นว่าอยู่ในเกณฑ์ดีและยังสามารถนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้กับเนื้อเยื่อในบริเวณอื่น ๆ ได้อีกด้วย (นันทริกา ชันซื่อ, กฤติมา อเนกธนกุล, สุเจตนา โสตถิพันธุ์ และกฤษฎา ริบรวบทรัพย์, 2548) หรือจะเป็นการเปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี จากตัวอย่างปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) ซึ่งมีขนาดใหญ่ และปลาม้าลาย (*Danio rerio*) ที่มีขนาดเล็ก เพื่อทำการพัฒนาวิธีสกัดให้ดีขึ้น (Yue & Orban, 2001) โดยตัวอย่างปลาที่ใช้เป็นตัวอย่างแห้งที่เก็บไว้ในเอทานอล ที่อุณหภูมิห้อง และเก็บไว้ในฟอร์มาดีไฮด์ สำหรับวิธีสกัดดีเอ็นเอประกอบด้วย 1) ต้มแล้วย่อยด้วย proteinase K และเติมซิลิกา (siliga) 2) ต้มแล้วเติมซิลิกา และ 3) ต้มแล้วย่อยด้วย proteinase K ผลที่ได้พบว่าทุกวิธีให้ผลที่ดีเพราะสามารถนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ ถึงแม้ว่าดีเอ็นเอที่ได้จะมีปริมาณน้อยเนื่องจากผ่านกระบวนการต้ม สามารถนำวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธีไปใช้ประโยชน์ต่อได้โดยเฉพาะวิเคราะห์กับตัวอย่างที่มีขนาดเล็กและใกล้สูญพันธุ์หรือมีปริมาณน้อย แต่ในบางกรณีการตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูงอาจทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากดีเอ็นเอมีการย่อยสลายทำให้มีในปริมาณน้อยจึงทำให้ต้องหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและปริมาณมาก ดังเช่น Chapela, Sotelo, Martin, Pardo, Villareal, Gilardi, and Riese (2007) ศึกษาเนื้อปลาทูน่ากระป๋องที่อยู่ในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Wizard, Nucleospin, GenomicPrep และ CTAB precipitation ซึ่งพบว่าวิธี Wizard ให้ผลดีที่สุดในอาหารเหลวแต่ละชนิด สามารถเพิ่มชิ้นส่วนของยีน cytochrome *b* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ ทั้งนี้แต่ละวิธีที่

ใช้สกัดดีเอ็นเอมักจะใช้เวลาค่อนข้างนาน หรือมีราคาแพง จึงมีการคิดค้นและศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่มีความสะดวก รวดเร็ว และมีราคาถูก นั่นคือวิธี PCR-ready genomic DNA (Meeker et al., 2007) ที่ใช้เวลาในการเตรียมประมาณ 10-20 นาที และนำมาดัดแปลงเพื่อศึกษาวิจัยในครั้งนี้ด้วย

จากที่กล่าวข้างต้นเป็นการสกัดดีเอ็นเอเพียงขั้นตอนแรกที่นำมาใช้ในการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลซึ่งวิธีหรือขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอนั้นค่อนข้างมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เพื่อนำไปสู่การอนุรักษ์และจัดการทรัพยากรในอนาคต จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ดังนั้นจึงต้องหาวิธีสกัดดีเอ็นเอที่มีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อในบริเวณต่าง ๆ ใช้เนื้อเยื่อปริมาณน้อยและมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในแต่ละงาน รวมทั้งประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาศึกษาความแตกต่างภายในประชากรและระหว่างประชากร ความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของสัตว์หลาย ๆ ชนิด หรือใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ จำแนกชนิดสัตว์ให้มีความชัดเจนเพิ่มมากขึ้นเพราะลักษณะภายนอกหรือสัณฐานวิทยาภายนอกของสัตว์ที่อยู่ภายในสกุลเดียวกัน (genus) อาจมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก จนทำให้ไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าเป็นสัตว์ชนิดใดหรือสปีชีส์ (species) ใด ทำให้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามามีบทบาทเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้ได้มีการศึกษาทั้งในส่วนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอและนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ โดยมีการนำวิธี PCR-RFLP มาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิดมากขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีที่มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และสามารถตรวจสอบการข่มแบบโคโดมิแนนท์ (codominant) ได้ โดยอาศัยหลักการที่ลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นมีความจำเพาะในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งอาจมีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไป (ขาดหาย เกิดการแทนที่หรือมีเพิ่มขึ้น) ดังนั้นตำแหน่งของลำดับเบสที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ก็จะเปลี่ยนไปและแตกต่างกันด้วย เมื่อตัดสายดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันนี้ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ก็จะได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอย่อย ๆ ปรากฏรูปแบบที่มีความจำเพาะ และสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสบนเจลอะกาโรส (Burton, 1996) ดังเช่น การจำแนกชนิดปลาการ์ตูน 7 ชนิดด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยศึกษาบริเวณยีน 16S rRNA และ cytochrome *b* ในส่วนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ พบว่าเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Bfu*CI และ *Rsa*I ในบริเวณยีน 16S rRNA สามารถแยกปลาการ์ตูน 7 ชนิดออกเป็น 2 กลุ่ม แต่เมื่อตัดชิ้นส่วนยีน cytochrome *b* ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hin*FI และ*Rsa*I สามารถแยกปลาการ์ตูนทั้ง 7 ชนิดออกจากกันได้ชัดเจน (Boonphakdee & Sawangwong, 2008) ทั้งนี้การศึกษาในบริเวณยีน 16S rRNA และ cytochrome *b* สามารถบ่งชี้ความแตกต่างในระดับชนิดหรือหรือสปีชีส์ (species) ได้เท่านั้น แต่ยังไม่สามารถอธิบายถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากรได้แต่อย่างใด อีกทั้งในปัจจุบันเทคนิค PCR-RFLP ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายสำหรับนำมาใช้จำแนกชนิด ของ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิด เช่น ปลาแซลมอล (Wolf et al., 2000) ปลาในกลุ่ม *Astyanax* (Moyses & Almeida, 2002) ไข่ปลา Messolongi (Klossa et al., 2002) ม้าน้ำสกุล *Hippocampus* sp. (พิทักษ์ สูตรอนันต์ และเสาวภา สวัสดิ์พีระ, 2549) เป็นต้น

การศึกษาในบริเวณ D-loop มักนิยมนำมาใช้ศึกษาในระดับประชากร เนื่องจากมีความแปรปรวนสูงกว่าบริเวณอื่นในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Wolf et al., 1999) มีตัวอย่างรายงานการศึกษาในกลุ่มประชากรของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ลิงบาบูน (*Theropithecus gelada*) (Belay & Mori, 2006), แกะ (*Ovis aries*) (Wang, Ma, & Guan, 2007) และปลาซันมะ (*Cololabis saira*) (Chow, Suzuki, Brodeur, & Ueno, 2009) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Bremer, Mejuto, Greig, and Ely (1996) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในบริเวณ D-loop ของปลากระโทงแทงดาบ (*Xiphias gladius*) จากมหาสมุทรแปซิฟิค มหาสมุทรแอตแลนติกเหนือและใต้ รวมทั้งทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถบอกถึงแหล่งที่มาของปลากระโทงแทงดาบได้อย่างถูกต้อง และงานวิจัยของ Chiang et al. (2008) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาทูน่า (*Thunnus obesus*) ที่อาศัยในมหาสมุทรอินเดีย โดยสามารถอธิบายความแตกต่างทางพันธุกรรม และการแพร่กระจายของปลาทูน่าในบริเวณนั้นได้เป็นอย่างดี ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปสู่การจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำในบริเวณนั้นต่อไป รวมทั้งมีการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในปลาการ์ตูน 23 ชนิด โดยวิเคราะห์ในบริเวณยีน cytochrome *b*, 16S rRNA และในส่วนของ D-loop (Santini & Polacco, 2006) บอกลักษณะจำเพาะของปลาการ์ตูนแต่ละชนิดและแบ่งกลุ่มปลาการ์ตูนจากความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มปลาการ์ตูนที่มาจากมหาสมุทรอินเดียและมหาสมุทรแปซิฟิคออกจากกันได้ชัดเจน สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับเบสในบริเวณยีน cytochrome *b* และบริเวณ D-loop พบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของบริเวณยีน cytochrome *b* เท่ากับ 4-7% และบริเวณ D-loop เท่ากับ 17-19% (Timm, Figiel, & Kochzius, 2008) จะเห็นได้ว่าประชากรของปลาการ์ตูนสกุล *Amphiprion* ที่อาศัยในธรรมชาติมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก และจากรายงานการวิจัยนี้ยังพบอีกว่าในบริเวณ D-loop มีความแปรปรวนมากกว่าบริเวณยีนอื่นที่ศึกษาในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ คือ บริเวณยีน cytochrome *b* และ 16S rRNA

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อนำมาใช้ในงานเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ดังเช่นตัวอย่างรายงานของ Miya et al. (2005) ศึกษาปลาในครอบครัว Cypriniformes โดยศึกษาในบริเวณยีน ND4-ND5 พบว่าสามารถบอกความแตกต่างภายในประชากรของปลาที่อาศัยในน้ำจืดที่มาจากแหล่งอาศัยต่างกันได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ส่วนการศึกษาในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอโดยใช้วิธี PCR-RFLP ก็ได้รับความนิยมเช่นกัน โดยเฉพาะศึกษาในบริเวณ ITS ซึ่งค่อนข้างมีความแปรปรวนมากในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ปรสิต *Bothriocephalus acheilognathi* (Lao, Nie, Zhang, Wang, & Yao, 2001) และ *Cryptocaryon irritans* จากปลาทะเลที่อาศัยในน่านน้ำประเทศจีน (Sun, Zhu, Xie, Lin, & Song, 2006) หอย (Stothard, Hughes, & Rollinson, 1996) ฟองน้ำ (Worheide et al., 2004) ปลาสลิดทะเล (Kuriiwa et al., 2007)และศึกษาในกุ้งจำนวน 4 ชนิด คือ *Penaeus merguiensis*, *P. silasi*, *P. monodon* และ *P. semisalcatus* ที่อาศัยในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน (Wanna, Chotigeat, & Phongdara, 2006) และ *Therileria* (Aktas, Bendale, Altay, Dumanli, Tsuji, & Holman, 2007) เป็นต้น

จากรายงานการวิจัยข้างต้นพบว่าสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในธรรมชาติล้วนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างชนิดแตกต่างกันไป ซึ่งการวิจัยในครั้งนี้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาการ์ตูนอานม้าทั้งในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอและนิวเคลียร์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP เพื่อให้ทราบข้อมูลทางพันธุกรรมของปลาการ์ตูนอานม้าในแหล่งธรรมชาติ โดยเปรียบเทียบกับปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากแหล่งเพาะเลี้ยง หากผลการวิจัยทราบว่า ประชากรปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ทำให้มีแนวโน้มที่จะสามารถดำรงเผ่าพันธุ์ต่อไปได้ เมื่อมีความสมดุลในธรรมชาติ อีกทั้งยังสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมของการเพาะเลี้ยง เพราะความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เพิ่มมากขึ้น ก็จะมีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ มีการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ต่อไป หากมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยก็จะสามารถดำเนินการวางแผน แก้ไข หรือพิจารณามาตรการด้านการอนุรักษ์ เพื่อให้เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ดำรงเผ่าพันธุ์ต่อไปได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University