

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 วิธีการเตรียมจีโนมิกดีเอ็นเอที่เหมาะสม

1. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปลาการ์ตูนอานม้า

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้า ด้วยวิธีสกัดที่แตกต่างกัน 4 วิธี ได้แก่

- 1) ชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit 2) PCR- ready genomic DNA 3) Chloroform และ
- 4) Guanidine Thiocyanate หลังจากละลายตะกอนดีเอ็นเอ แล้วทำอิเล็กโทรโฟริสิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ความยาวของเจล 10 เซนติเมตร โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ระยะเวลา 30 นาที พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละวิธีมีขนาดมากกว่า 12 กิโลเบสแสดงในภาพที่ 4-1 เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb plus DNA Ladder (M_r) แต่ดีเอ็นเอที่เตรียมจากวิธี PCR- ready genomic DNA ไม่ปรากฏแถบ (ช่อง 3-4) ส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วย Chloroform (ช่อง 5-6) และ Guanidine Thiocyanate (ช่อง 7-8) มีการขาดของดีเอ็นเอเล็กน้อยซึ่งปรากฏเป็นลักษณะแถบขาว (smear)

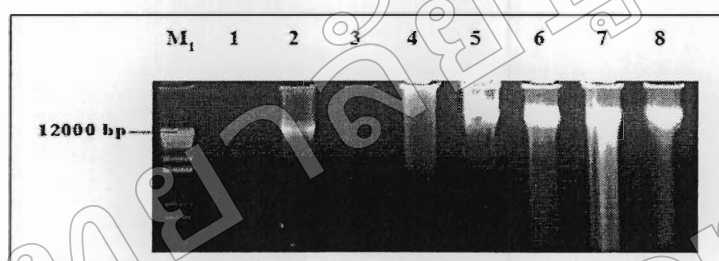
การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 4 วิธีไปวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอและนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบทั้งคุณภาพและปริมาณของตัวอย่างแช่แข็งกับตัวอย่างที่เก็บรักษาในเอทานอล 100% รวมถึงระยะเวลาในการเตรียม สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4-1, ภาพที่ 4-3 และภาพที่ 4-4 คือ ดีเอ็นเอจากตัวอย่างแช่แข็งที่สกัดด้วยชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit มีค่าความบริสุทธิ์มากที่สุดคือ 1.700 ± 0.274 และดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่แช่ในเอทานอล 100% ที่สกัดด้วย Guanidine Thiocyanate มีค่าความบริสุทธิ์น้อยที่สุด คือ 1.406 ± 0.108 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละวิธีพบว่า การสกัดด้วยวิธี PCR- ready genomic DNA จากตัวอย่างที่แช่ในเอทานอล ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดคือ $5.309 \pm 0.135 \mu\text{g}/\text{เนื้อเยื่อ } 10 \text{ mg}$ แต่ตัวอย่างแช่แข็งที่สกัดด้วย Chloroform ได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ $0.256 \pm 0.192 \mu\text{g}/\text{เนื้อเยื่อ } 10 \text{ mg}$

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ยีนหรือบริเวณต่างๆ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 4 วิธี ในเชิงคุณภาพนั้น ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในบริเวณยีน ND4-ND5, 16S rRNA และ ITS-1 พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการสกัด 4 วิธีของปลาการ์ตูนอานม้าทุกตัวอย่าง ให้ผลเหมือนกันคือ มีขนาดประมาณ 900, 650 และ 600 คู่เบส ในแต่ละบริเวณที่เพิ่มจำนวน ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก 4 วิธี คือ

- 1) ชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit 2) PCR- ready genomic DNA 3) Chloroform และ
- 4) Guanidine Thiocyanate แสดงดังภาพที่ 4-2 (a-d) ตามลำดับ (แสดงเพียงบางตัวอย่าง)

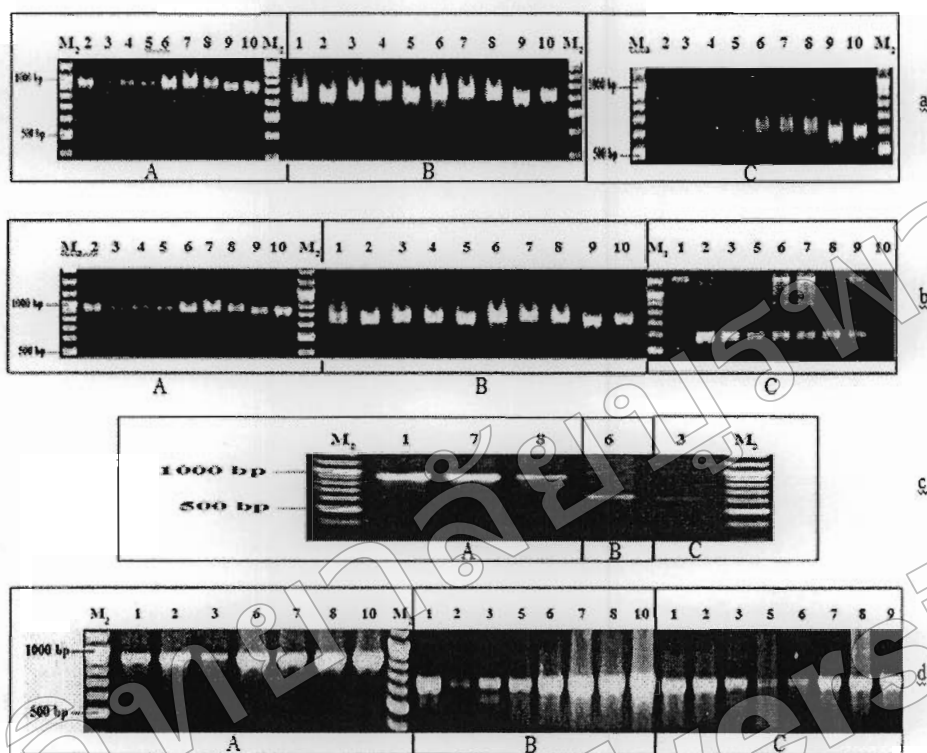


ภาพที่ 4-1 แถบดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อปลาการ์ตูนอานม้าที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งและแช่ในเอทานอลแล้วสกัดได้จาก 4 วิธี

- | | |
|---------------------|---|
| ช่อง M ₁ | คือ 1 Kb plus DNA Ladder |
| ช่อง 1-2 | คือ ดีเอ็นเอจากชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit |
| ช่อง 3-4 | คือ ดีเอ็นเอจากวิธี PCR- ready genomic DNA |
| ช่อง 5-6 | คือ ดีเอ็นเอจากการสกัดด้วย Chloroform |
| ช่อง 7-8 | คือ ดีเอ็นเอจากการสกัดด้วย Guanidine Thiocyanate |

หมายเหตุ: ช่อง 1, 3, 5 และ 7 เป็นตัวอย่างแช่แข็ง

ช่อง 2, 4, 6 และ 8 เป็นตัวอย่างที่แช่ในเอทานอล 100%



ภาพที่ 4-2 แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของปลาการ์ตูนฮานม้าในบริเวณยีน ND4-ND5, 16S rRNA และ ITS-1 (A, B และ C ตามลำดับ) โดยสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (a), PCR- ready genomic DNA (b), Chloroform (c) และ Guanidine Thiocyanate (d)

ช่อง M₂ คือ 100 bp DNA Ladder Plus

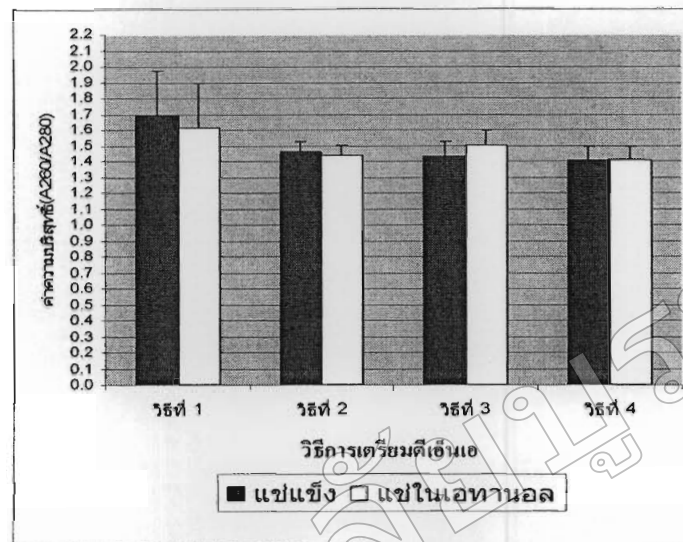
ช่อง 1-5 คือ ตัวอย่างปลาการ์ตูนฮานม้าที่เก็บด้วยวิธีแช่แข็ง

ช่อง 6-10 คือ ตัวอย่างปลาการ์ตูนฮานม้าที่แช่ในเอทานอล 100%

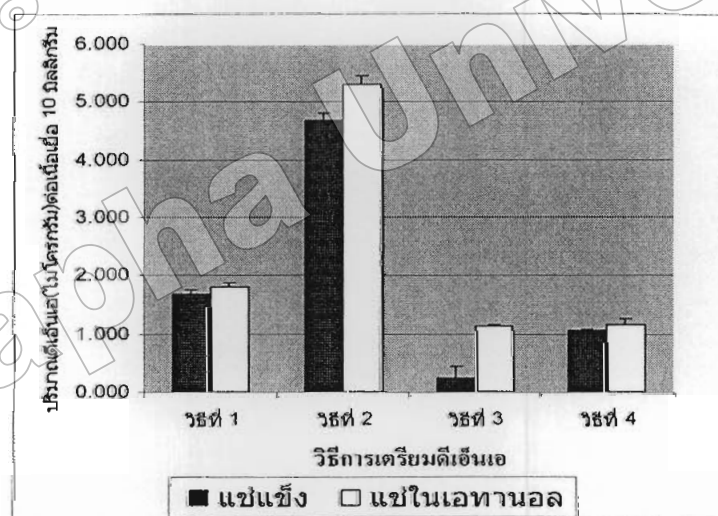
ตารางที่ 4-1 เปรียบเทียบปริมาณ คุณภาพของดีเอ็นเอ และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

วิธีสกัดดีเอ็นเอ	ความบริสุทธิ์ (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	ปริมาณดีเอ็นเอ (μg/เนื้อเยื่อ 10 mg)	ระยะเวลา ในการสกัด	ผลของ ปฏิกิริยา PCR		
				ND4-ND5	16S rRNA	ITS-1
ชุดสกัด GF-1 Tissue						
DNA Extraction Kit						
- ตัวอย่างแช่แข็ง	1.700±0.274	1.697±0.067	45 นาที	+	+	+
- ตัวอย่างแช่ในเอทานอล	1.620±0.125	1.809±0.067		+	+	+
PCR- ready genomic						
DNA						
- ตัวอย่างแช่แข็ง	1.463±0.063	4.697±0.118	25 นาที	+	+	+
- ตัวอย่างแช่ในเอทานอล	1.439±0.099	5.309±0.135		+	+	+
Chloroform						
- ตัวอย่างแช่แข็ง	1.428±0.099	0.256±0.192	8 ชั่วโมง	+	-	+
- ตัวอย่างแช่ในเอทานอล	1.504±0.135	1.135±0.033		+	+	-
Guanidine Thiocyanate						
- ตัวอย่างแช่แข็ง	1.406±0.087	1.070±0.033	7 ชั่วโมง	+	+	+
- ตัวอย่างแช่ในเอทานอล	1.406±0.108	1.159±0.094		+	+	+

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งที่อิสระต่อกัน



ภาพที่ 4-3 ค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีต่างกัน 4 วิธีจากตัวอย่างเนื้อแข็งและแช่ในเอทานอล 100%



ภาพที่ 4-4 ค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างเนื้อแข็งและแช่ในเอทานอล 100% จากวิธีสกัดทั้ง 4 วิธี

หมายเหตุ วิธีที่ 1 คือ การสกัดด้วยชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit

วิธีที่ 2 คือ วิธี PCR- ready genomic DNA

วิธีที่ 3 คือ การสกัดด้วย Chloroform

วิธีที่ 4 คือ การสกัดด้วย Guanidine Thiocyanate

ตอนที่ 2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาการ์ตูนอานม้า

1. บริเวณยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

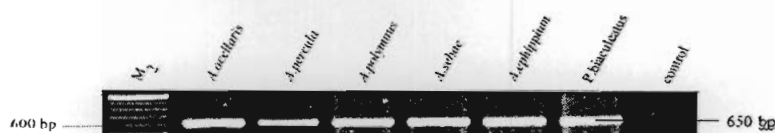
ในการศึกษาครั้งนี้เริ่มต้นจากการทดสอบว่ายีน 16S rRNA มีความเหมาะสมที่จะใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรภายในชนิดเดียวกันหรือไม่ จึงศึกษาเปรียบเทียบความเหมาะสมในตัวอย่างต่างชนิดเป็นอันดับแรก คือ จากปลาการ์ตูนอานม้า เปรียบเทียบกับปลาการ์ตูนชนิดอื่น ๆ อีก 5 ชนิด คือ ปลาการ์ตูนส้มขาว ปลาการ์ตูนเพอคูล่า ปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลือง ปลาการ์ตูนแดงดำ และปลาการ์ตูนแดง โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ (16Sar_L/16Sbr_H) พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ทุกตัวอย่างของปลาการ์ตูนทั้ง 6 ชนิด มีขนาดใกล้เคียงกันคือประมาณ 650 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder Plus (M_{100}) ดังภาพที่ 4-5 และเมื่อวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอของปลาการ์ตูน 6 ชนิดภายหลังการตัดผลผลิตพีซีอาร์บริเวณยีน 16S rRNA ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ เริ่มจากนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rRNA ขนาดประมาณ 529 คู่เบสของปลาการ์ตูนอานม้าในฐานข้อมูล GenBank (Accession number AY666170) (Sparks & Smith, 2004) มาทำการคัดเลือกชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์ด้วยโปรแกรม webcutter 2.0 และพบว่า เอนไซม์ *MseI* ซึ่งมีบริเวณจดจำของลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-T¹TAA-3' ตัดผลผลิตพีซีอาร์ของปลาการ์ตูนทั้ง 6 ชนิด คือ เมื่อใช้ *MseI* ได้รูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะที่สามารถแบ่งกลุ่มปลาการ์ตูนได้ 2 กลุ่ม โดย กลุ่มที่ 1) ปลาการ์ตูนส้มขาว ปลาการ์ตูนเพอคูล่า ปลาการ์ตูนอานม้าและปลาการ์ตูนแดงดำ ปรากฏแถบดีเอ็นเอเข้ม 2 แถบ (ขนาดประมาณ 140 และ 160 คู่เบส) กลุ่มที่ 2) ปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลืองและปลาการ์ตูนแดง ปรากฏแถบดีเอ็นเอเข้ม 2 แถบเช่นกัน (ขนาดประมาณ 140 และ 250 คู่เบส) แต่ไม่สามารถบ่งชี้ระหว่างชนิดได้ (ภาพที่ 4-6)

2. บริเวณยีน ND4-ND5 ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

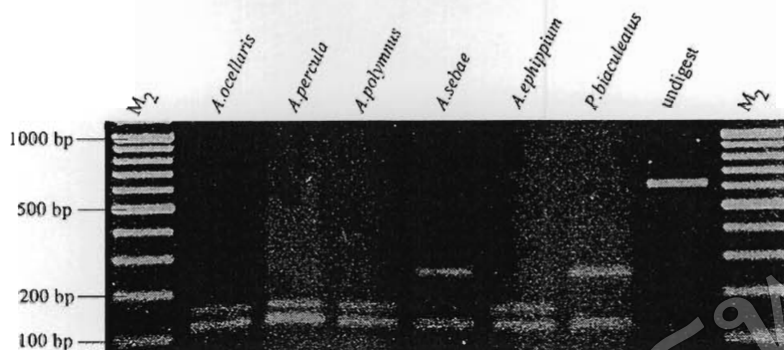
ในการศึกษาครั้งนี้เริ่มต้นศึกษาจากปลาการ์ตูนอานม้าเปรียบเทียบกับปลาการ์ตูนชนิดอื่นๆ อีก 3 ชนิด คือ ปลาการ์ตูนอินเดียนแดงส้ม ปลาการ์ตูนเพอคูล่า และ ปลาการ์ตูนส้มขาว เพื่อดูแนวโน้มความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มปลาการ์ตูนเป็นข้อมูลเบื้องต้น แล้วจึงศึกษาเฉพาะในปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) ในลำดับต่อไป โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ND4-ND5 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ ND4-L2/ND5-R2 พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ทุกตัวอย่างของปลาการ์ตูนทั้ง 4 ชนิด มีขนาดใกล้เคียงกันคือประมาณ 895 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder Plus (M_{100}) ดังภาพที่ 4-7 และเมื่อตัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ *BfuCI* หรือ *DdeI* ซึ่งผ่านการวิเคราะห์และการตรวจสอบตำแหน่งตัดด้วยโปรแกรม webcutter 2.0 มาก่อน โดยพบความ

แตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอระหว่างปลาการ์ตูนทั้ง 4 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 4-11 นั่นคือเมื่อใช้ *BfuCI* รูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะหลังตัดในปลาการ์ตูนอานม้าปรากฏแถบดีเอ็นเอเข็ม 4 แถบ (ขนาดประมาณ 125, 200, 270 และ 300 คู่เบส) ปลาการ์ตูนอินเดียนแดงส้มปรากฏแถบดีเอ็นเอเข็ม 3 แถบ (ประมาณ 125, 200 และ 560 คู่เบส) ปลาการ์ตูนเพอคูล่าปรากฏรูปแบบดีเอ็นเอเข็ม 3 แถบ (ประมาณ 125, 175 และ 570 คู่เบส) ส่วนปลาการ์ตูนส้มขาวมี 3 แถบ (ประมาณ 125, 175 และ 580 คู่เบส) และเมื่อใช้เอนไซม์ *DdeI* ได้แถบดีเอ็นเอหลังตัด 3 หรือ 2 แถบที่มีขนาดแตกต่างกันในแต่ละชนิดคือ ในปลาการ์ตูนอานม้าปรากฏชัดเจน 3 แถบ (ประมาณ 175, 190 และ 525 คู่เบส) ปลาการ์ตูนอินเดียนแดงส้มมีแถบดีเอ็นเอจำเพาะ 3 แถบ (ประมาณ 175, 190 และ 400 คู่เบส) ปลาการ์ตูนเพอคูล่าปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน 3 แถบ (ประมาณ 155, 240 และ 335 คู่เบส) ส่วนปลาการ์ตูนส้มขาวมีแถบดีเอ็นเอจำเพาะ 2 แถบ (ประมาณ 365 และ 460 คู่เบส)

เมื่อทำการศึกษาภายในประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าโดยใช้ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ คือ 1) จากธรรมชาติ (NA) บริเวณหาดปลา จ.ระยอง 2) ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) 3) ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต (PU) 4) ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. พังงา (PA) และ 5) ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี (CN) พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลผลิตพีซีอาร์ในบริเวณ بین ND4-ND5 ที่มีขนาดประมาณ 895 คู่เบส แสดงดังภาพที่ 4-9 เมื่อตัดดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ในแต่ละตัวอย่าง (สุ่มทดสอบ 25 ตัวอย่าง) ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกัน คือ *BfuCI*+*HeaIII* และ *DdeI*+*HeaIII* โดยผ่านการตรวจสอบตำแหน่งตัดด้วยโปรแกรม webcutter 2.0 มาก่อน แต่ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างภายในประชากรของปลาการ์ตูนอานม้า แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏภายหลังตัดด้วย *BfuCI*+*HeaIII* มีรูปแบบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมดคือมีจำนวน 7 แถบ ขนาดประมาณ 85, 95, 110, 130, 140, 180 และ 255 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4-10 (แสดงเพียง 14 ตัวอย่าง) และเช่นเดียวกับการตัดด้วยเอนไซม์ *DdeI*+*HeaIII* ปรากฏแถบดีเอ็นเอเข็มจำนวน 5 แถบ ขนาดประมาณ 60, 165, 175, 240 และ 286 คู่เบส แสดงในภาพที่ 4-11 (แสดงเพียง 12 ตัวอย่าง)



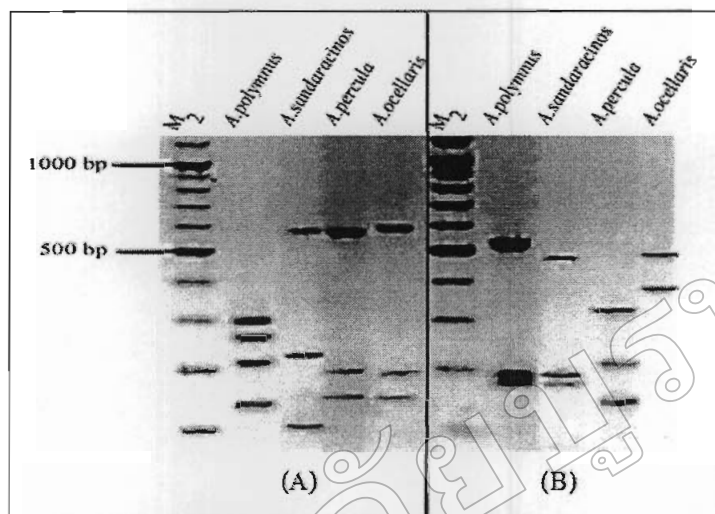
ภาพที่ 4-5 ผลผลิตพีซีอาร์ในบริเวณ بین 16S rRNA ขนาดประมาณ 650 คู่เบสของปลาการ์ตูน 6 ชนิด ได้แก่ ปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ปลาการ์ตูนเพอคูล่า (*A. percula*) ปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) ปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลือง (*A. sebae*) ปลาการ์ตูนแดงดำ (*A. ephippium*) ปลาการ์ตูนแดง (*P. biaculeatus*) และปฏิกิริยาพีซีอาร์ควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ (control) ตามลำดับ



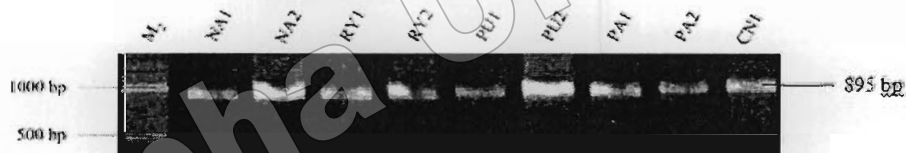
ภาพที่ 4-6 รูปแบบ PCR-RFLP ในบริเวณ 16S rRNA ภายหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *MseI* ของ ปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ปลาการ์ตูนเพอคูล่า (*A. percula*) ปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) ปลาการ์ตูนลายปล้องหวงเหลือง (*A. sebae*) ปลาการ์ตูนแดงดำ (*A. ephippium*) ปลาการ์ตูนแดง (*P. biaculeatus*) และผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของปลาการ์ตูนอานม้าก่อนตัดด้วยเอนไซม์ (undigest) ตามลำดับ



ภาพที่ 4-7 แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ซีอาร์ในบริเวณ ND4-ND5 ขนาดประมาณ 895 คู่เบสของ ปลาการ์ตูน 4 ชนิด ได้แก่ ปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) ปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้ม (*A. sandaracinos*) ปลาการ์ตูนเพอคูล่า (*A. percula*) และปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder Plus (*M₂*)

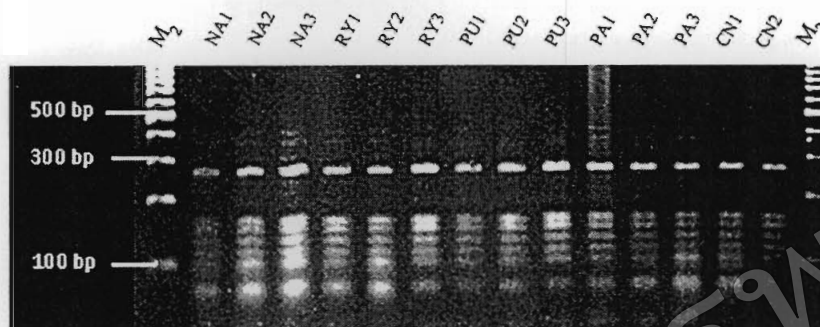


ภาพที่ 4-8 รูปแบบ PCR-RFLP ในบริเวณ ND4-ND5 ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *BfuCI* (A) และ *DdeI* (B) ของปลาการ์ตูน 4 ชนิด คือ ปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymus*) ปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้ม (*A. sandaracinos*) ปลาการ์ตูนเพอคูล่า (*A. percula*) และปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*)



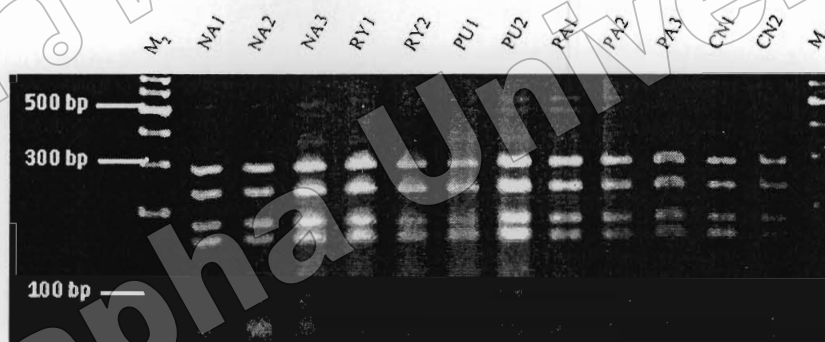
ภาพที่ 4-9 แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในบริเวณ ND4-ND5 ขนาดประมาณ 895 คู่เบสของปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งต่าง ๆ (แสดงเพียง 9 ตัวอย่าง) เปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder Plus (M_2)

หมายเหตุ	NA	คือ ตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ จ. ระยอง
	RY	คือ ตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง
	PU	คือ ตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต
	PA	คือ ตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. พังงา
	CN	คือ ตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี
	1, 2	คือ ลำดับตัวอย่าง



ภาพที่ 4-10 รูปแบบ PCR-RFLP ในบริเวณ ND4-ND5 ของปลาการ์ตูนอานม้าในแต่ละแหล่ง
 ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *BfuCI*+*HeaIII* (NA; ปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ,
 RY, PU, PA, CN; ปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก จ.ระยอง จ.ภูเก็ต จ. พังงา
 และ จ. ชลบุรี ตามลำดับ)

หมายเหตุ 1, 2, 3 คือ ลำดับตัวอย่าง

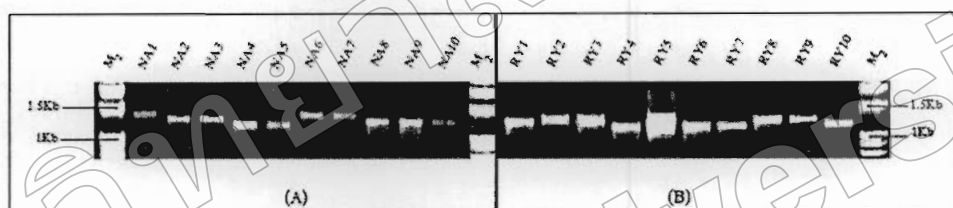


ภาพที่ 4-11 รูปแบบ PCR-RFLP ในบริเวณ ND4-ND5 ของปลาการ์ตูนอานม้าในแต่ละแหล่ง
 ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *DdeI*+*HeaIII* (NA; ปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ,
 RY, PU, PA, CN; ปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก จ.ระยอง จ.ภูเก็ต จ. พังงา
 และ จ. ชลบุรี ตามลำดับ)

หมายเหตุ 1, 2, 3 คือ ลำดับตัวอย่าง

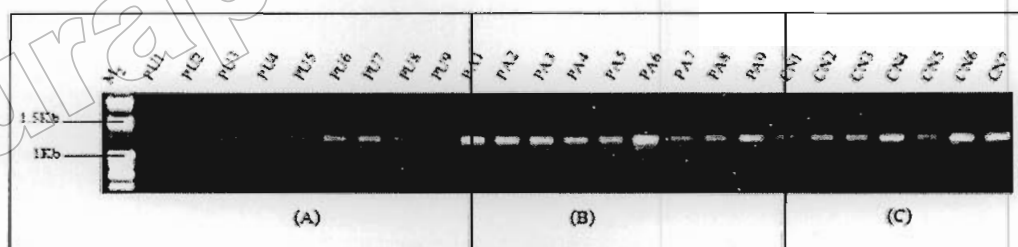
3. บริเวณ D-loop หรือ control region ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติ จ. ระยอง (NA) และปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ซีอาร์ที่มีขนาดอยู่ในช่วงประมาณ 1,100-1,400 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4-12 (A และ B) ส่วนผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก จ. ภูเก็ต จ. พังงา และ จ. ชลบุรี (PU, PA และ CN ตามลำดับ) มีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4-13 (A, B และ C) ตามลำดับ และสามารถยืนยันได้ว่าเป็นบริเวณ D-loop จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างที่สุ่มมาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY10) จำนวน 1 ตัวอย่าง และ BLAST กับฐานข้อมูล GenBank ดังแสดงในตารางที่ 4-2



ภาพที่ 4-12 แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ซีอาร์ในบริเวณ D-loop ขนาดประมาณ 1,100-1,400 คู่เบสของปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ (A) (แสดงเพียง 10 ตัวอย่าง) และจากแหล่งเพาะเลี้ยงใน จ. ระยอง (B) เปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder Plus (M_2)

หมายเหตุ 1, 2, 3, ..., 10 คือ ลำดับตัวอย่าง



ภาพที่ 4-13 แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ซีอาร์ในบริเวณ D-loop ขนาดประมาณ 1,100 คู่เบสของปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยงใน จ. ภูเก็ต (A) จ. พังงา (B) และ จ. ชลบุรี (C) (แสดงเพียงบางตัวอย่าง) เปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder Plus (M_2)

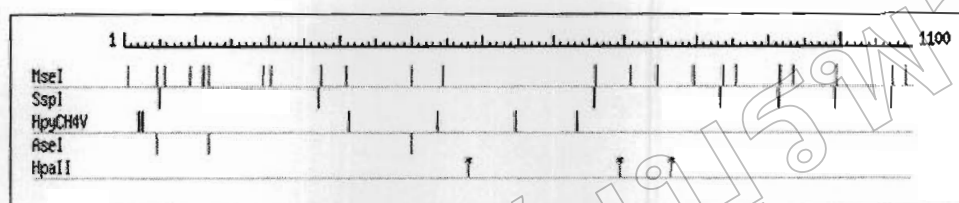
หมายเหตุ 1, 2, 3, ..., 9 คือ ลำดับตัวอย่าง

ตารางที่ 4-2 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D-loop ของปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) จากการศึกษาข้อมูล GenBank

Accession no.	ชนิดของ ปลาการ์ตูน	จำนวนเบสของปลาการ์ตูนอานม้า/ จำนวนเบสที่ เทียบเคียงทั้งหมด (คู่เบส)		% ความเหมือน
AP006017	<i>A. ocellaris</i>	780/965	80	
EF990146	<i>A. clarkii</i>	455/523	90	
DQ343941	<i>A. polymnus</i>	373/403	92	
DQ343932	<i>A. frenatus</i>	361/404	89	
EU113313	<i>A. sebae</i>	345/366	94	

เมื่อทำการตัดผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ D-loop ด้วยเอนไซม์ 5 ชนิด จากการคัดเลือกด้วยโปรแกรม webcutter 2.0 (แสดงจำนวนขึ้นดีเอ็นเอและขนาดของขึ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าจะได้ของบริเวณ D-loop ดังตารางที่ 4-3 และแสดงไดอะแกรมเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ 5 ชนิด ใ้ดังภาพที่ 4-14) และเมื่อทำการตัดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิด กับตัวอย่างทั้งหมดที่มาจากธรรมชาติ จ. ระยอง (NA) ฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก จ. ระยอง จ. ภูเก็ต จ. พังงา และ จ. ชลบุรี (RY, PU, PA และ CN) พบว่าจำนวนรูปแบบ haplotype ของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *MseI*, *SspI*, *HpyCH4V*, *AseI* และ *HpaII* มีจำนวน 1, 3, 10, 8 และ 5 รูปแบบตามลำดับ (ใช้สัญลักษณ์ A, B, C, ... ในแต่ละรูปแบบที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์แต่ละชนิด) รายละเอียดขนาดของขึ้นดีเอ็นเอแสดงไว้ดังตาราง 4-4 เมื่อพิจารณาความถี่ของรูปแบบ haplotype ในแต่ละเอนไซม์ (ตารางที่ 4-5) พบว่าเอนไซม์ *MseI* ปรากฏเพียง haplotype เดียว จึงไม่ได้แสดงข้อมูลในตารางสำหรับเอนไซม์ *SspI* พบรูปแบบ *SspI*-A มากที่สุด คิดเป็น 77.7% เมื่อใช้เอนไซม์ *HpyCH4V* พบรูปแบบ *HpyCH4V*-C มากที่สุดในกลุ่มปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติ (NA) ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) และ จ. ชลบุรี (CN) ซึ่งคิดเป็น 27.7% และพบรูปแบบ *HpyCH4V*-I ได้เฉพาะในกลุ่มปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต (PU) และ จ. พังงา (PA) เท่านั้น สำหรับการตัดด้วยเอนไซม์ *AseI* พบรูปแบบ *AseI*-B มากที่สุดในกลุ่มปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ (NA) ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) และ จ. ชลบุรี (CN) คิดเป็น 29.73% แต่ในกลุ่มปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต (PU) และ จ. พังงา (PA) พบเฉพาะรูปแบบ *AseI*-H เพียงรูปแบบเดียวเท่านั้น ส่วนเอนไซม์ *HpaII* พบรูปแบบ *HpaII*-C มากที่สุดใน 3 กลุ่ม คือ ปลาการ์ตูนอานม้าจาก

ธรรมชาติ (NA) ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) และ จ. ชลบุรี (CN) คิดเป็น 12.84% และในกลุ่มปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต (PU) และ จ. พังงา (PA) พบเฉพาะรูปแบบ *HpaII*-C เพียงรูปแบบเดียวเท่านั้น



ภาพที่ 4-14 ไดอะแกรมลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D-loop ขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส ตัดด้วยเอนไซม์ *MseI*, *SspI*, *HpyCH4V*, *AseI* และ *HpaII* (|) แสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์

ตารางที่ 4-3 ชนิดเอนไซม์ จำนวนชิ้นดีเอ็นเอและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ที่คาดการณ์เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *MseI*, *SspI*, *HpyCH4V*, *AseI* และ *HpaII* ในปลาการ์ตูนอานม้า (รหัส RY10)

ชนิดเอนไซม์	จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)
<i>MseI</i>	24	215, 93, 79, 75, 70, 61, 61, 51, 49, 43, 40, 40, 38, 34, 34, 19, 3(18), 11, 10, (2)8 และ 5
<i>SspI</i>	8	386, 220, 177, 79, 79, 79, 52 และ 28
<i>HpyCH4V</i>	7	466, 286, 124, 111, 85, 22 และ 6
<i>AseI</i>	4	698, 282, 72 และ 48
<i>HpaII</i>	4	482, 333, 213 และ 72

ตารางที่ 4-4 รูปแบบ haplotype และขนาดชิ้นดีเอ็นเอของบริเวณ D-loop ที่ได้จากการตัดด้วย
เรสทริกชันเอนไซม์

ชนิดของเอนไซม์	รูปแบบ haplotype	ขนาดชิ้นของดีเอ็นเอ (คู่เบส)
<i>MseI</i>	A	50, 60, 60, 80, 80, 80, 90 และ 210
<i>SspI</i>	A	50, 80, 80, 80, 170, 220 และ 400
	B	65, 80, 80, 80, 170, 220 และ 400
	C	70, 80, 80, 80, 170, 220 และ 400
<i>HpyCH4V</i>	A	80, 110, 120, 290 และ 610
	B	80, 110, 120, 290 และ 550
	C	80, 110, 120, 290 และ 590
	D	80, 110, 120, 290 และ 530
	E	80, 110, 120, 290 และ 710
	F	80, 110, 120, 290 และ 730
	G	80, 110, 120, 290 และ 690
	H	80, 110, 120, 290 และ 490
	I	80, 110, 120, 290 และ 500
	J	80, 110, 120, 290 และ 650
<i>AseI</i>	A	75, 280 และ 910
	B	75, 280 และ 840
	C	75, 280 และ 780
	D	75, 280 และ 900
	E	75, 280 และ 970
	F	75, 280 และ 930
	G	75, 280 และ 730
	H	75, 280 และ 750
<i>HpaII</i>	A	75, 210 และ 500
	B	75, 210, 500 และ 410
	C	75, 210, 500 และ 360
	D	75, 210, 500 และ 570
	E	75, 500 และ 710

3.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากร

เมื่อพิจารณารูปแบบ haplotype ของบริเวณ D-loop ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ ทั้งหมดมาพิจารณารวมกัน (composite haplotype) พบทั้งหมด 23 รูปแบบ ดังแสดงในตารางที่ 4-6 และเมื่อพิจารณา composite haplotype ของตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติ จ. ระยอง (NA) ฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก จ. ระยอง จ. ภูเก็ต จ. พังงา และ จ. ชลบุรี (RY, PU, PA และ CN) composite haplotype ที่พบมากที่สุดในตัวปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติ (NA) ฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก จ. ระยอง และ จ. ชลบุรี (RY และ CN) คือรูปแบบ ACBB คิดเป็น 29.05, 4.05 และ 6.76% ตามลำดับ และรูปแบบ AIHC พบมากที่สุดในตัวปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ตและ จ. พังงา (PU และ PA) คิดเป็น 17.56 และ 25.67% ตามลำดับ และเมื่อทดสอบ Monte Carlo Simulation (1,000 ครั้ง) ความถี่ของ haplotype แพร่กระจายระหว่างประชากร พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างประชากรจากทุกแหล่งที่ศึกษา ($\chi^2=88.35, P < 0.001$)

จากข้อมูล haplotype diversity และ nucleotide diversity แสดงในตารางที่ 4-6 พบว่าประชากรจากธรรมชาติ จ. ระยอง (NA) มีค่า haplotype diversity มากที่สุด (0.75 ± 0.06) ส่วนประชากรจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต (PU) มีค่า nucleotide diversity มากที่สุด (0.010) ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าในแต่ละประชากรมีค่า haplotype diversity ค่อนข้างสูง แสดงว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงภายในแต่ละกลุ่มประชากรของปลาการ์ตูนอานม้า

3.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร

เมื่อนำ haplotype ของบริเวณ D-loop ที่ได้ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ของปลาการ์ตูนอานม้าจาก 5 แหล่ง มาวิเคราะห์ค่า Similarity distance ด้วยโปรแกรม Gene Directory ระหว่าง haplotype ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด คือ *SspI*, *HpyCH4V*, *AseI* และ *HpaII* โดยใช้ค่า Similarity distance ระหว่าง composite haplotype (คำนวณตามวิธีของ Dice) ของทั้ง 4 เอนไซม์ สร้างแผนโคโรแกรมวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม PAUP* (Swofford, 2002) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างประชากรของปลาการ์ตูนอานม้า ดังภาพที่ 4-15 พบว่าสามารถแยกกลุ่มประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแต่ละแหล่งออกจากกันได้ชัดเจน และทุกกลุ่มประชากรสามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม โดยประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี (CN) มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันที่ระดับ 50% กลุ่มปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) มีความเหมือนของลักษณะทางพันธุกรรมภายในกลุ่มสูงถึง 75% สำหรับกลุ่มประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต (PU) มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันที่ระดับ 30% ภายใน

ประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ จ. ระยอง (NA) มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันที่ระดับ 50% ส่วนภายในประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. พังงา (PA) มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันที่ระดับ 40%

ผลการวิเคราะห์จาก Analysis of Molecular Variance (AMOVA) พบว่า Percentage of variation ระหว่างกลุ่มประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าเท่ากับ 50.83 และภายในประชากรเท่ากับ 49.17 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งระหว่างประชากรและภายในประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าในแต่ละแหล่ง แสดงดังตารางที่ 4-7

เมื่อเปรียบเทียบค่า F_{ST} ของแต่ละกลุ่มประชากรพบว่ามีค่าระหว่าง 0.08 (NA-RY; ระหว่างประชากรจากธรรมชาติกับฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง) ถึง 0.79 (PA-CN; ระหว่างประชากรที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. พังงากับฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี) โดยค่า F_{ST} ที่ได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในแต่ละแหล่งที่ทำการศึกษา (ตารางที่ 4-8) เมื่อทำการสร้างแผนโคโรแกรมจากค่า genetic distance โดยใช้โปรแกรม Phylip 3.86 พบว่าประชากรจาก 5 แหล่ง สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย (1) กลุ่ม NA ซึ่งเป็นประชากรที่มาจากธรรมชาติ (2) RY และ CN ซึ่งมาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก จ. ระยอง และ จ. ชลบุรี ตามลำดับ (3) PU และ PA ซึ่งมาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก จ. ภูเก็ต และ จ. พังงา ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4-16

ตารางที่ 4-5 ความถี่ของรูปแบบ haplotype ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์บริเวณ D-loop ของ
ประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งต่าง ๆ

ชนิดของเอนไซม์	รูปแบบ haplotype	% ความถี่	ความถี่ของรูปแบบในแต่ละแหล่ง (จำนวน)				
			NA (n=43)	RY (n=10)	PU (n=26)	PA (n=50)	CN (n=19)
<i>SspI</i>	A	77.7	33	10	15	38	19
	B	9.4	4	-	3	7	-
	C	12.8	6	-	8	5	-
<i>HpyCH4V</i>	A	2.0	3	-	-	-	-
	B	7.4	3	-	1	5	2
	C	27.7	21	6	4	-	10
	D	4.7	7	-	-	-	-
	E	3.3	5	-	-	-	-
	F	2.0	3	-	-	-	-
	G	3.3	1	-	-	-	4
	H	2.7	-	4	-	-	-
	I	44.5	-	-	21	45	-
	J	2.0	-	-	-	-	3
<i>AseI</i>	A	2.0	3	-	-	-	-
	B	28.3	24	6	-	-	12
	C	4.7	7	-	-	-	-
	D	3.3	5	-	-	-	-
	E	2.0	3	-	-	-	-
	F	5.4	1	-	-	-	7
	G	2.7	-	4	-	-	-
	H	51.3	-	-	26	50	-
<i>HpaII</i>	A	3.3	5	-	-	-	-
	B	20.9	25	6	-	-	-
	C	71.6	7	4	26	50	19
	D	0.006	1	-	-	-	-
	E	0.006	1	-	-	-	-

หมายเหตุ NA=ธรรมชาติ จ. ระยอง, RY=เพาะเลี้ยง จ. ระยอง, PU=เพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต,
PA=เพาะเลี้ยง จ. พังงา, CN=เพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี

ตารางที่ 4-6 ความถี่ของ composite haplotype, haplotype diversity และ nucleotide diversity บริเวณ D-loop ภายในประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งต่าง ๆ

Composite	ความถี่ของรูปแบบ				
	NA	RY	PU	PA	CN
h1 haplotype AAAA	1				
h2 BBBB	1				
h3 ACBB	21	6			10
h4 ADCC	5				
h5 AEDA	3				
h6 AEDD	1				
h7 BEDA	1				
h8 AFDA	1				
h9 ADCC	2				
h10 AGFE	1				
h11 CFED	2				
h12 CBBB	2				
h13 CAAB	1				
h14 CAAD	1				
h15 AHGC		4			
h16 AIHC			11	38	
h17 BIHC			3	7	
h18 CIHC			7		
h19 CBHC			1	5	
h20 ACHC			4		
h21 AGFB					4
h22 AJFB					3
h23 ABBB					2
N	43	10	26	50	19
Haplotype diversity ($h \pm SE$)	0.75 $\pm$ 0.06	0.53 $\pm$ 0.09	0.73 $\pm$ 0.5	0.40 $\pm$ 0.07	0.67 $\pm$ 0.08
Nucleotide diversity (π)	0.007	0.007	0.010	0.006	0.008

หมายเหตุ สัญลักษณ์ที่แสดงในช่อง composite haplotype หมายถึงรูปแบบ haplotype ที่ได้จาก

เอนไซม์ *SspI*, *HpyCH4V*, *AseI* และ *HpaII* ตามลำดับ

NA=ธรรมชาติ จ. ระยอง, RY=เพาะเลี้ยง จ. ระยอง, PU=เพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต

PA=เพาะเลี้ยง จ. พังงา, CN=เพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี

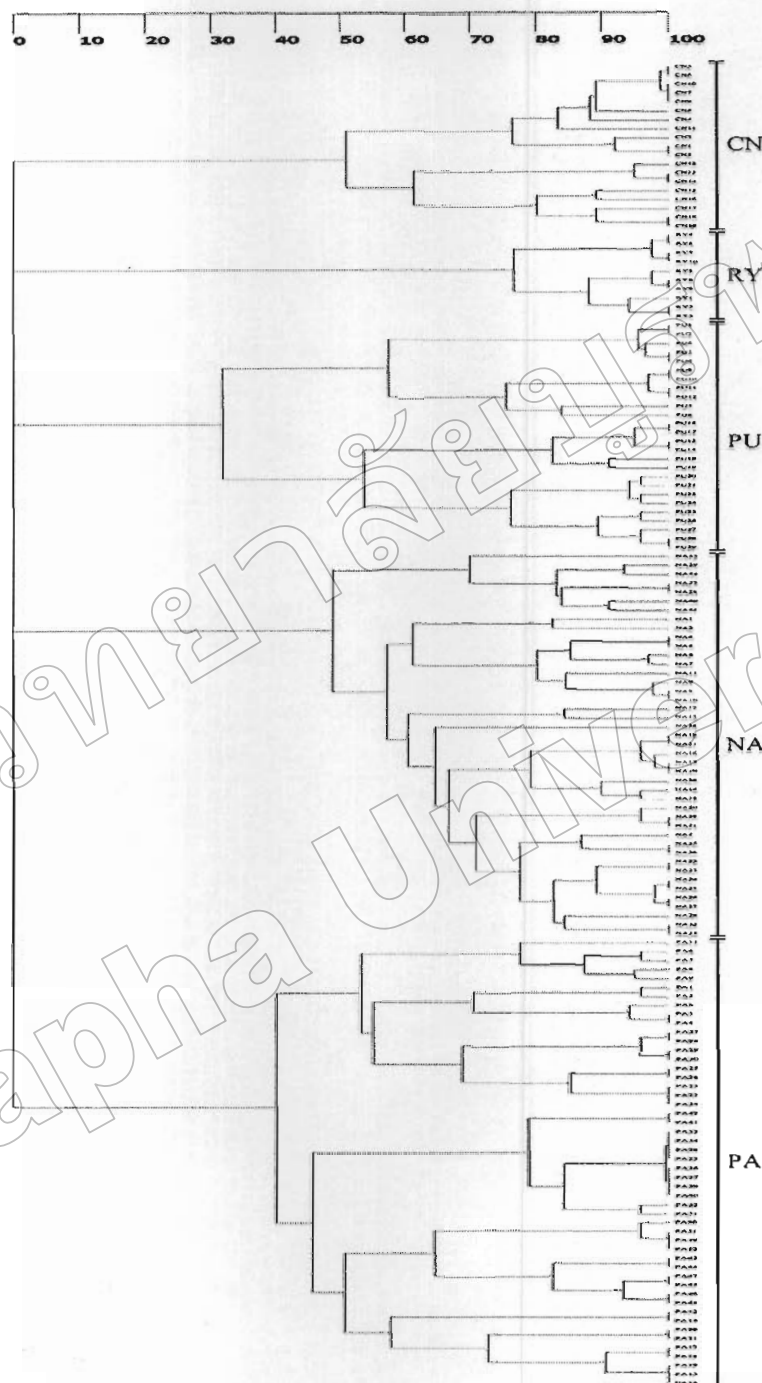
ตารางที่ 4-7 ผลการวิเคราะห์ AMOVA ในบริเวณ D-loop ของปลาการ์ตูนอานม้าจาก
ประชากร 5 แหล่ง

Source of variation	df	Variance components	Percentage of variation
Among populations	4	1.2915	50.83
Within populations	143	1.2491	49.17
Total	147	2.541	
Fixation Index	$F_{ST} : 0.5083 (P < 0.05)$		

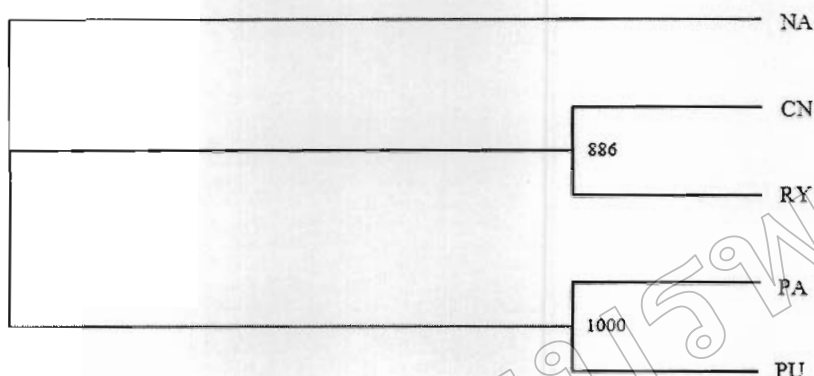
ตารางที่ 4-8 เปรียบเทียบค่า F_{ST} โดยวิเคราะห์จากบริเวณ D-loop ระหว่างกลุ่มประชากรของ
ปลาการ์ตูนอานม้า (ครึ่งเมทริกซ์ล่าง) และ P -value (ครึ่งเมทริกซ์บน)

* แสดงระดับค่าที่สำคัญที่ $p < 0.05$

	NA	RY	PU	PA	CN
NA		0.030*	0.000*	0.000*	0.000*
RY	0.08		0.000*	0.000*	0.000*
PU	0.46	0.61		0.000*	0.000*
PA	0.56	0.74	0.13		0.000*
CN	0.11	0.20	0.69	0.79	



ภาพที่ 4-15 UPGMA dendrogram บริเวณ D-loop ของแต่ละประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งต่าง ๆ สร้างจากโปรแกรม Gene Directory (NA; ปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ, RY, PU, PA, CN; ปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก จ.ระยอง จ.ภูเก็ต จ. พังงา และ จ. ชลบุรี ตามลำดับ)



ภาพที่ 4-16 UPGMA dendrogram บริเวณ D-loop ของประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจาก 5 แหล่ง
คำนวณจาก Nei's genetic distance และ bootstrap=1,000 ครั้ง (NA; ปลาการ์ตูนอานม้า
จากธรรมชาติ, RY, PU, PA, CN; ปลาการ์ตูนอานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก
จ.ระยอง จ.ภูเก็ต จ. พังงา และ จ. ชลบุรี ตามลำดับ)

4. บริเวณ ITS-1 ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในบริเวณ ITS-1 พบว่าได้ผลิตผลพีซีอาร์ที่มี
ขนาดใกล้เคียงกันจากตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งจากธรรมชาติ (NA) และฟาร์มเพาะเลี้ยง 4 แหล่ง
(RY, PU, PA และ CN) คือ ประมาณ 750 คู่เบส (ภาพที่ 4-17) โดยบริเวณ ITS-1 นี้ยืนยันว่าเป็นการ
เพิ่มผลผลิตในบริเวณนี้จริงจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ผ่านการโคลนของผลิตผลพีซีอาร์ที่
เพิ่มจำนวนได้และ BLAST กับฐานข้อมูล GenBank (ไม่ได้แสดงผล)

เมื่อทำการวิเคราะห์หาตำแหน่งการตัด โดยใช้โปรแกรม webcutter 2.0 และตัดด้วย
เรสทริกชันเอนไซม์ 5 ชนิด คือ *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI*, *HpaII* และ *MnII* จำนวนชิ้นดีเอ็นเอและขนาด
ของชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าจะได้แสดงในตารางที่ 4-9 และแสดงไดอะแกรมตำแหน่งตัดของแต่ละ
เอนไซม์ไว้ดังภาพที่ 4-18

เมื่อตัดผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิด (*HaeIII*, *HinfI*, *HpaII*,
MnII และ *HhaI*) กับจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 149 ตัวอย่างที่มาจากธรรมชาติ จ. ระยอง (NA)
ฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก จ. ระยอง จ. ภูเก็ต จ. พังงา และ จ. ชลบุรี (RY, PU, PA และ CN) พบรูปแบบ
haplotype ของแต่ละเอนไซม์จำนวน 6, 1, 3, 5 และ 6 รูปแบบตามลำดับ แสดงไว้ดังตาราง 4-10
และเมื่อพิจารณาในแต่ละเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ *HinfI* ปรากฏเพียงหนึ่ง haplotype จึงไม่นำมาใช้
ในการวิเคราะห์และไม่ได้แสดงข้อมูลในตาราง เอนไซม์ *HaeIII* พบว่าให้รูปแบบ A มากที่สุด คิด
เป็น 50.67% จากตัวอย่างทั้งหมด 149 ตัวอย่าง สำหรับเอนไซม์ *HhaI* พบรูปแบบ A มากที่สุด

เช่นกัน คิดเป็น 76.67% ส่วนการตัดด้วยเอนไซม์ *HpaII* พบรูปแบบ A มากที่สุดในทุกกลุ่มตัวอย่าง คิดเป็น 70% และเอนไซม์ *MnII* พบรูปแบบ A มากที่สุดใน 2 กลุ่มประชากร คือ กลุ่มปลาการ์ตูน อานม้าจากธรรมชาติ จ. ระยอง (NA) และจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) ในกลุ่มปลาการ์ตูน อานม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต (PU) พบรูปแบบ C มากที่สุด จากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. พังงา (PA) พบรูปแบบ D มากที่สุด และในกลุ่มที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี (CN) พบรูปแบบ B มากที่สุด

4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากร

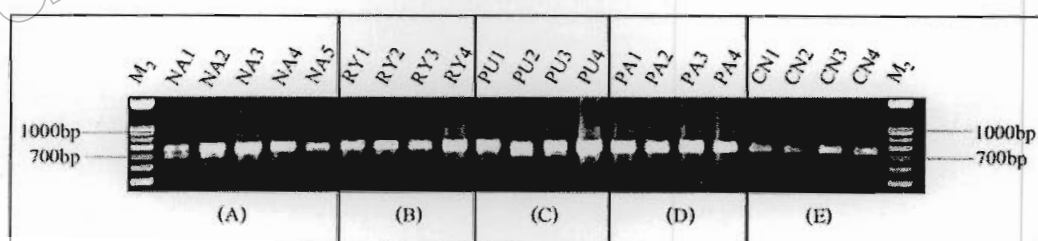
เมื่อพิจารณารูปแบบรวม composite haplotype พบทั้งหมด 31 รูปแบบ ดังแสดงในตาราง ที่ 4-12 และเมื่อพิจารณาข้อมูลของตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติ จ. ระยอง (NA) ฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก จ. ระยอง จ. ภูเก็ต จ. พังงา และ จ. ชลบุรี (RY, PU, PA และ CN) สรุปได้ว่า composite haplotype ที่พบมากที่สุดในประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากธรรมชาติ (NA) และจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) คือรูปแบบ AAAA (14 และ 3.33% จากตัวอย่างทั้งหมด 149 ตัวอย่างที่ทำการทดสอบ ตามลำดับ) สำหรับรูปแบบ AAAC พบมากที่สุดในตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต (PU) ซึ่งคิดเป็น 8% รูปแบบที่พบมากที่สุดในประชากรปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. พังงา (PA) คือ AADD คิดเป็น 6% และรูปแบบ CAAB พบมากที่สุดในประชากรปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี (CN) คิดเป็น 4% ผลการทดสอบ Monte Carlo Simulation (1,000 ครั้ง) เพื่อวิเคราะห์ความถี่ของ haplotype ในการแพร่กระจายระหว่างประชากร พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างประชากรทั้ง 5 แหล่งที่ศึกษา ($\chi^2=121.84, P < 0.001$) และพบว่าประชากรจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. พังงา มีค่า haplotype diversity มากที่สุด (0.91 ± 0.01) ส่วนประชากรจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต (PU) มีค่า nucleotide diversity มากที่สุด (0.004) แสดงในตารางที่ 4-12 ประชากรในแต่ละแหล่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.000-0.004

4.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร

จากการวิเคราะห์ Analysis of Molecular Variance (AMOVA) พบว่า Percentage of variation ระหว่างกลุ่มประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าเท่ากับ 15.40 และภายในประชากรเท่ากับ 84.60 แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจนภายในประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าเมื่อพิจารณาในบริเวณ ITS-1 แสดงดังตารางที่ 4-13

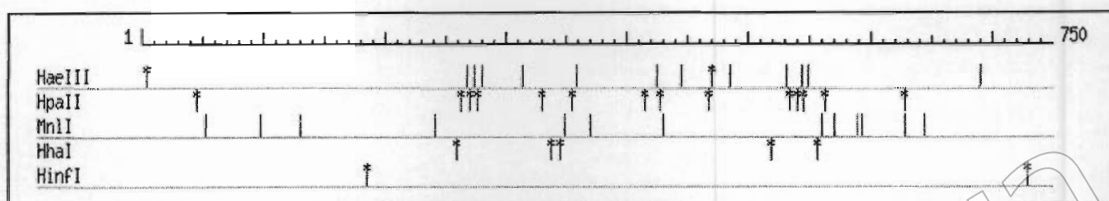
เมื่อเปรียบเทียบค่า F_{ST} ของแต่ละกลุ่มประชากรพบว่ามีค่าระหว่าง -0.010 (NA-RY; ระหว่างประชากรจากธรรมชาติกับฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง) ถึง 0.26 (NA-PU; ระหว่างประชากรจากธรรมชาติกับฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต) ซึ่งมีค่าต่ำ โดยค่า F_{ST} ที่ได้แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรที่ทำการศึกษา ซึ่งแตกต่างกันมากที่สุดภายในประชากรจาก NA และจาก PU ($F_{ST}=0.26$) แสดงดังตารางที่ 4-14

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากรโดยคำนวณค่า Similarity distance ระหว่าง composite haplotype ของทั้ง 4 เอนไซม์ แสดงดังภาพที่ 4-19 พบว่าสามารถแยกกลุ่มประชากรปลาการ์ตูนอานม้า จากทั้ง 5 แหล่ง คือ จากธรรมชาติ จ. ระยอง (NA) จากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต (PU) ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. พังงา (PA) และฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี (CN) ออกจากกันได้ชัดเจน โดยในแต่ละกลุ่มสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มย่อยและพบความเหมือนของลักษณะทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรที่ระดับความเหมือน 40% และเมื่อทำการสร้างเดนโดรแกรมจากค่า genetic distance โดยใช้โปรแกรม Phylip 3.86 พบว่า ประชากรจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) มีความใกล้ชิดกับธรรมชาติมากที่สุด (NA) รองลงมาคือ ประชากรจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี (CN) แยกออกจากประชากรที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต (PU) และ จ. พังงา (PA) อย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 4-20



ภาพที่ 4-17 แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในบริเวณ ITS-1 ขนาดประมาณ 750 คู่เบสของ ปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติ (A) ฟาร์มเพาะเลี้ยงใน จ. ระยอง (B) จ. ภูเก็ต (C) จ. พังงา (D) และ จ. ชลบุรี (E) (แสดงเพียงบางตัวอย่าง)

หมายเหตุ 1, 2, 3, ... คือ ลำดับตัวอย่าง



ภาพที่ 4-18 ไดอะแกรมลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-1 ของตัวแทนปลาการ์ตูนอน้ำจืด
ธรรมชาติ ขนาดประมาณ 750 คู่เบส ตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII*, *HpaII*, *MnlI*, *HhaI* และ
HinfI โดยใช้โปรแกรม NEBcutter 2.0 สัญลักษณ์ (|) แสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์

ตารางที่ 4-9 ชนิดเอนไซม์ จำนวนชิ้นดีเอ็นเอและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์โดยใช้
โปรแกรม webcutter 2.0 ของลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวแทนปลาการ์ตูนอน้ำ
(รหัส NA31) ในบริเวณ ITS-1

ชนิด เอนไซม์	จำนวนชิ้น ดีเอ็นเอ	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)
<i>HaeIII</i>	15	264, 142, 67, 58, 47, 45, 34, 25, 20, 14, 12, 2(6) และ 2(5)
<i>HpaII</i>	15	217, 121, 66, 65, 59, 53, 47, 40, 26, 17, 13, 8, 7, 6 และ 5
<i>MnlI</i>	14	130, 112, 107, 105, 60, 54, 45, 35, 32, 21, 19, 16, 10 และ 4
<i>HhaI</i>	6	260, 192, 173, 79, 38 และ 8
<i>HinfI</i>	3	544, 186 และ 20

ตารางที่ 4-10 รูปแบบ haplotype และขนาดชิ้นดีเอ็นเอของบริเวณ ITS-1 ที่ได้จากการตัดด้วย
เรสทริกชันเอนไซม์

ชนิดของเอนไซม์	รูปแบบ haplotype	ขนาดชิ้นของดีเอ็นเอ (คู่เบส)
<i>HaeIII</i>	A	45, 70, 105, 150, 160 และ 220
	B	60, 105, 150 และ 220
	C	45, 70, 105, 160 และ 220
	D	45, 70, 105, 150 และ 220
	E	45, 70, 105, 140, 150, และ 220
	F	45, 70, 105, 200 และ 250
<i>HpaII</i>	A	45, 70, 90, 120 และ 215
	B	45, 70, 90 และ 215
	C	45, 70, 150 และ 230
	D	45, 70, 90, 120, 180 และ 215
	E	45, 70, 110 และ 215
<i>MnII</i>	A	50, 70, 90, 105, 115 และ 130
	B	50, 70, 90, 105 และ 130
	C	50, 70, 90, 105, 115, 130 และ 165
	D	50, 70, 90, 105, 115, 130 และ 190
	E	50, 70, 105 และ 130
	F	50, 70, 90, 105 และ 190
<i>HhaI</i>	A	40, 70, 175, 190 และ 205
	B	40, 70 และ 175
	C	40, 70, 175 และ 205
<i>HinfI</i>	A	180 และ 550

ตารางที่ 4-11 ความถี่ของรูปแบบ haplotype ภายหลังจากตัดด้วยเอนไซม์บริเวณ ITS-1 ของ
ประชากรปลาการ์ตูนานมาจกแหล่งต่าง ๆ

ชนิดของ เอนไซม์	รูปแบบ haplotype	%	ความถี่ของรูปแบบในแต่ละประชากร (จำนวน)				
			NA (n=43)	RY (n=10)	PU (n=28)	PA (n=50)	CN (n=18)
<i>HaeIII</i>	A	50.3	24	8	13	30	-
	B	0.006	1	-	-	-	-
	C	35.5	18	2	9	11	13
	D	5.3	-	-	6	2	-
	E	7.3	-	-	-	6	5
	F	0.006	-	-	-	1	-
<i>HpaII</i>	A	70.4	39	10	19	22	15
	B	8.7	4	-	9	-	-
	C	3.3	-	-	-	5	-
	D	12.7	-	-	-	16	3
	E	4.0	-	-	-	6	-
<i>MnII</i>	A	45.6	36	7	1	17	7
	B	22.1	7	3	8	4	11
	C	12.7	-	-	19	-	-
	D	12.0	-	-	-	18	-
	E	5.3	-	-	-	8	-
	F	2.0	-	-	-	3	-
<i>HhaI</i>	A	76.5	36	9	19	36	14
	B	18.7	1	1	9	13	4
	C	4.6	6	-	-	1	-

หมายเหตุ NA=ธรรมชาติ จ. ระยอง, RY=ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง, PU=ฟาร์มเพาะเลี้ยง
จ. อุทัยธานี, PA=ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. พังงา และ CN=ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี

ตารางที่ 4-12 ความถี่ของ composite haplotype, haplotype diversity และ nucleotide diversity
บริเวณ ITS-1 ภายในประชากรปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งต่าง ๆ

Haplotype	Composite haplotype	แหล่งตัวอย่าง				CN
		NA	RY	PU	PA	
<i>g1</i>	AAAA	25	5	1	6	
<i>g2</i>	BAAA	1				
<i>g3</i>	CAAA	10	1			
<i>g4</i>	CBAA	1	1			
<i>g5</i>	CCAA	2				
<i>g6</i>	CCBB	2				
<i>g7</i>	CBBB	2				
<i>g8</i>	AAAB		3			
<i>g9</i>	AAAC			12		
<i>g10</i>	DAAC			6		
<i>g11</i>	CADA					3
<i>g12</i>	CBCC			1		
<i>g13</i>	CBCB			8		
<i>g14</i>	AADD				9	
<i>g15</i>	AAAD				6	
<i>g16</i>	CBAB				1	
<i>g17</i>	CBDA				1	
<i>g18</i>	AADA				4	
<i>g19</i>	CBCE				4	
<i>g20</i>	FCDF				1	
<i>g21</i>	AADF				2	
<i>g22</i>	DAAD				2	
<i>g23</i>	EAAD				1	
<i>g24</i>	EAAA				6	4
<i>g25</i>	ABCB				1	
<i>g26</i>	EAAB					1
<i>g27</i>	CBAB					3
<i>g28</i>	CAAB					6
<i>g29</i>	ABAB					1
<i>g30</i>	CBEB				2	
<i>g31</i>	CBEE				4	
N		43	10	28	50	18

ตารางที่ 4-12 (ต่อ)

Haplotype diversity ($h \pm SE$)	0.59 $\pm$ 0.07	0.71 $\pm$ 0.11	0.71 $\pm$ 0.04	0.91 $\pm$ 0.01	0.82 $\pm$ 0.05
Nucleotide diversity (π)	0.000	0.000	0.004	0.001	0.001

หมายเหตุ สัญลักษณ์ที่แสดงในช่อง composite haplotype หมายถึงรูปแบบ haplotype ที่ได้จาก เอนไซม์ *Hae*III, *Hha*I, *Hpa*II และ *Mn*II ตามลำดับ

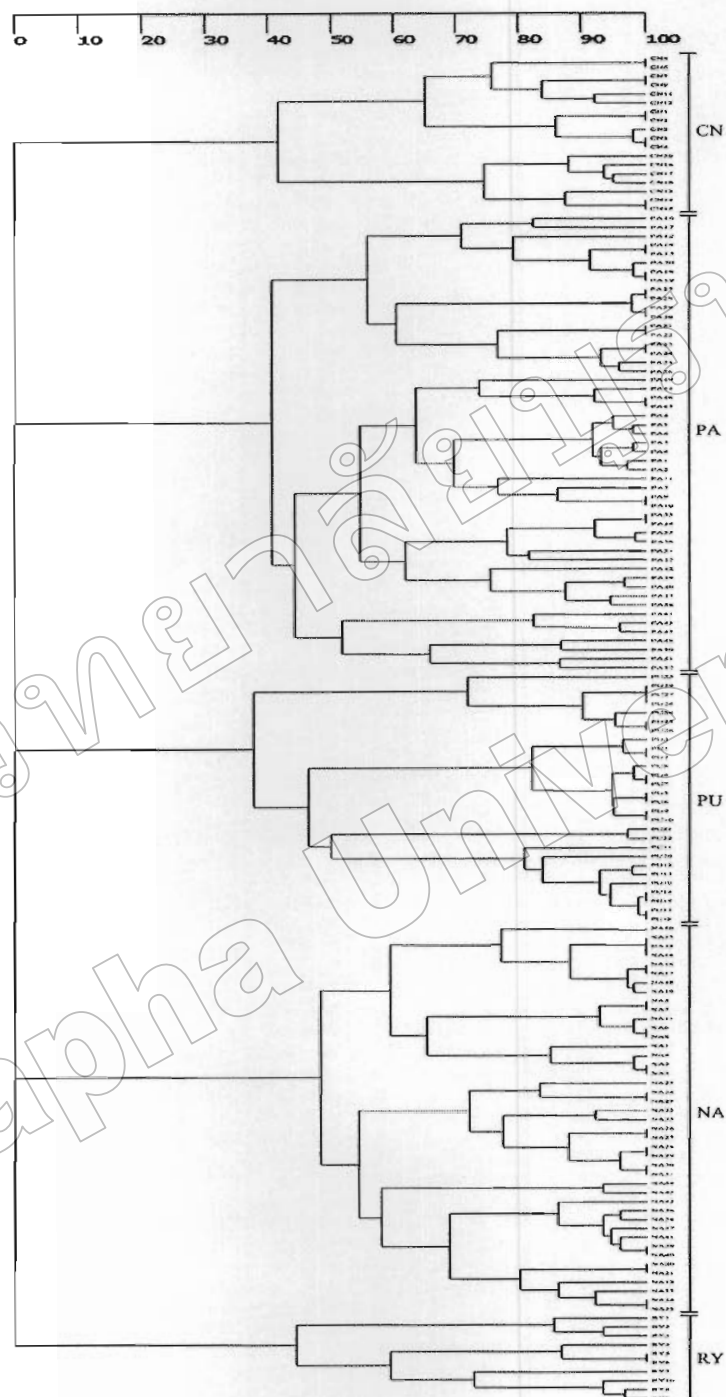
ตารางที่ 4-13 ผลการวิเคราะห์ AMOVA ในบริเวณ ITS-1 ของปลาคาร์ตูนานม้า จาก ประชากร 5 แหล่ง

Source of variation	df	Variance components	Percentage of variation
Among populations	4	0.3193	15.40
Within populations	145	1.7544	84.60
Total	149	2.0736	
Fixation Index	$F_{ST} : 0.1539 (P < 0.05)$		

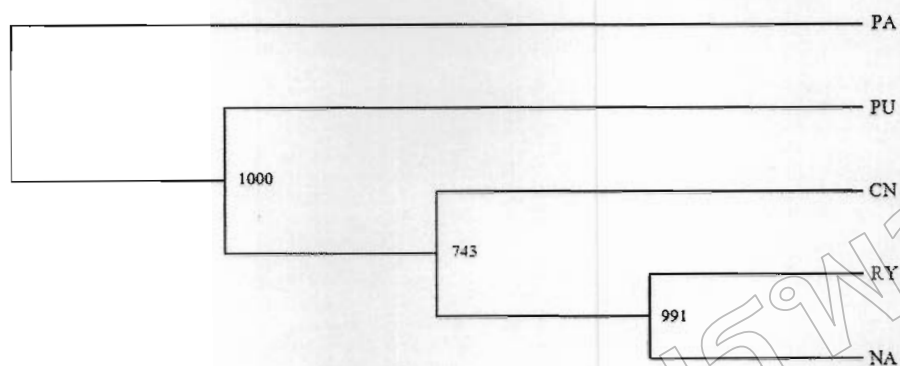
ตารางที่ 4-14 เปรียบเทียบค่า F_{ST} โดยวิเคราะห์จากบริเวณ ITS-1 ระหว่างกลุ่มประชากรของ ปลาคาร์ตูนานม้า (ครึ่งเมทริกซ์ล่าง) และ P -value (ครึ่งเมทริกซ์บน)

* แสดงระดับความนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

	NA	RY	PU	PA	CN
NA		0.569	0.000*	0.000*	0.000*
RY	-0.01		0.018*	0.046*	0.000*
PU	0.26	0.18		0.000*	0.000*
PA	0.13	0.07	0.15		0.041*
CN	0.17	0.13	0.22	0.10	



ภาพที่ 4-19 UPGMA dendrogram บริเวณ ITS-1 ของแต่ละประชากรปลาการ์ตูนาน้ำจากแหล่งต่าง ๆ สร้างจากโปรแกรม Gene Directory (NA; ปลาการ์ตูนาน้ำจากธรรมชาติ, RY, PU, PA, CN; ปลาการ์ตูนาน้ำจากฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก จ.ระยอง จ.ภูเก็ต จ. พังงา และ จ. ชลบุรี ตามลำดับ)



ภาพที่ 4-20 UPGMA dendrogram บริเวณ ITS-I ของประชากรปลาการ์ตูนอนม้าจาก 5 แหล่ง
คำนวณจาก Nei's genetic distance และ bootstrap=1,000 ครั้ง (NA; ปลาการ์ตูนอนม้า
จากธรรมชาติ, RY, PU, PA, CN; ปลาการ์ตูนอนม้าจากฟาร์มเพาะเลี้ยงจาก
จ.ระยอง จ.ภูเก็ต จ. พังงา และ จ. ชลบุรี ตามลำดับ