ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดปลาหมู 14 ชนิด

DNA Barcoding for Species Identification of 14 Loaches

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์[1,2*], มนัดดา แดงสิงห์[1] และนนทรี ปานพรหมมินทร์[3]

Dutrudi Panprommin, Manadda Dangsing and Nontree Panprommin

[1]สาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

[3]สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ กรมประมง ปทุมธานี 12120

* Corresponding author email: dutrudeep@yahoo.com

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้รูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase I (COI) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด ในการจำแนกชนิดปลาหมู จำนวน 14 ชนิด 59 ตัวอย่าง จากผลการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน COI จากปลาทั้งหมด พบว่า มีความยาวของยีนเฉลี่ยประมาณ 630 คู่เบส จากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของยีน COI ของปลาทั้ง 14 ชนิดกับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล พบว่ายังไม่มีการรายงานข้อมูลของยีน COI ในปลา จำนวน 11 และ 5 ชนิด ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD ตามลำดับ ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ฐานข้อมูลของยีน COI ของปลาเพิ่มจำนวนมากขึ้น และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน COI ของปลาทั้ง 14 ชนิด โดยการสร้าง phylogenetic tree พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI สามารถแบ่งกลุ่มของปลาหมูสอดคล้องกับระบบอนุกรมวิธานของปลา นอกจากนี้ยังแยกปลาแต่ละชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจนอีกด้วย ยกเว้นปลาหมูน่านและปลาหมูอารีย์

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ยีน cytochrome c oxidase I, การจำแนกชนิด, ปลาหมู

Abstract

The purpose of this study is to determine the pattern of cytochrome c oxidase I (COI) sequence of 14 loaches for using as DNA barcode. The average of COI sequence length of 14 fish species was 630 bp. The similarity analysis (blastn) found that there were 11 and 5 species not presented in GenBank and BOLD database, respectively. The sequences of COI gene from this study were reported in GenBank, which were increased COI gene information. A phylogenetic tree of COI gene from 14 fish species was constructed to analyze the evolution relationship. The node of tree was divided into 2 major branches followed fish family, Botiidae and Cobitidae. Furthermore, COI

sequences also separated each fish species from each other clearly, excepted *A. nigrolineata* and *A. sidthimunki*.

Keywords: DNA barcoding, Cytochrome c oxidase I, Species Identification, Loach

คำนำ

ปลาหมูเป็นกลุ่มของปลาน้ำจืดขนาดเล็กที่มีลวดลายและสีสันสวยงาม โดยมีลักษณะเด่น คือ มีกระดูกเป็นหนามโค้งพับซ่อนอยู่บริเวณใต้ตาข้างละ 1 ชิ้น (Šlechtová *et al*., 2008) จึงทำให้มีชื่อสามัญว่า “spined loaches” พบทั่วไปตามบริเวณที่น้ำไหลแรง ต้นน้ำลำธารบนภูเขาหรือน้ำตก มักอาศัยตามพื้นท้องน้ำเป็นฝูงใหญ่ ปลาหมูจัดอยู่ในอันดับ Cypriniformes มหาวงศ์ Cobitoidea ซึ่งในปัจจุบันปลาที่อยู่ในมหาวงศ์ Cobitoidea พบทั่วโลก 10 ครอบครัว 185 สกุล และ 1,499 ชนิด (Kottelat, 2012) สำหรับในประเทศไทยพบปลาหมูหลายชนิด ได้แก่ ปลาหมูน่าน (*Ambastaia nigrolineata*) ปลาหมูอารีย์ (*A. sidthimunki*) ปลาหมูขาว (*Yasuhikotakia modesta*) ปลาหมูข้างลาย (*Syncrossus helodes*) เป็นต้น

จากการที่ปลาหมูเหล่านี้มีความหลากหลายของชนิดสูง มีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมาก ทำให้ประสบปัญหาในการจำแนกชนิด หรือต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านในการจำแนก ประกอบกับบางครั้งตัวอย่างปลาที่ได้มานั้นอยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์ หรืออยู่ในช่วงพัฒนาการต่างๆ เช่น ไข่ ลูกปลาวัยอ่อน หรือลูกปลาวัยรุ่น ซึ่งทำให้มีปัญหาในการจำแนกชนิดได้ ปัจจุบันนิยมใช้วิธีการทางอณูชีววิทยามาร่วมในการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยเทคนิคที่เรียกว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต มีลักษณะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ของยีนที่อยู่ในไมโตคอนเดรียของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ ยีน cytochrome c oxidase I (COI) (Hebert *et al*., 2003) โดยมีคุณสมบัติเฉพาะเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ทำให้ง่ายต่อการจำแนก ตรวจสอบ และติดตาม ซึ่งในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์นิยมใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้แก่ นก (Hebert *et al*., 2004) แมงมุม (Barrett and Hebert, 2005) และผีเสื้อ (Hausmann *et al*., 2011) เป็นต้น ในปลาก็มีผู้นิยมใช้ในการจำแนกชนิดเช่นกัน ได้แก่ ปลาทะเลที่อาศัยอยู่ในประเทศออสเตรเลีย (Ward *et al*., 2005) ปลาซิว (Panprommin *et al*., 2013) ปลาเศรษฐกิจในแม่น้ำปิง จังหวัดตาก (Yomkerd and Panprommin, 2013) เป็นต้น

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ยีน COI เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดปลาหมู จำนวน 14 ชนิด และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลา ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถรวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาต่อไปและประยุกต์ใช้ในงานประมงด้านต่างๆ เช่น การจำแนกลูกปลาวัยอ่อน การจำแนกชนิดปลาเพื่อการส่งออก เป็นต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การรวบรวมตัวอย่างปลา

รวบรวมตัวอย่างปลาหมู จำนวน 14 ชนิด ชนิดละ 3-5 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ ปลาหมูในครอบครัว Botiidae ได้แก่ ปลาหมูลายเมฆ (*Botia kubotai*) ปลาหมูโยโย่ (*B. almorhae*) ปลาหมูม้าลาย (*B. striata*) ปลาหมูลายคู่ (*B. rostrata*) ปลาหมูน่าน (*Ambastaia nigrolineata*) ปลาหมูอารีย์ (*A. sidthimunki*) ปลาหมูขาว (*Yasuhikotakia modesta*) ปลาหมูค้อ (*Y. morleti*) ปลาหมูสัก (*Y. lecontei*) ปลาหมูข้างลาย (*Syncrossus helodes*) ปลาหมูจักรพรรดิ์ (*S. berdmorei*) ปลาหมูอินโด (*Chromobotia macracanthus*) และครอบครัว Cobitidae ได้แก่ ปลาปล้องอ้อย (*Pangio kuhlii*) และปลารากกล้วย (*Acantopsis choirorhynchos*) โดยรวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติ (Table 1) และซื้อจากร้านขายปลาสวยงาม จากนั้นนำตัวอย่างปลาไปแช่ในขวดพลาสติกที่มีเอทานอล บริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะสกัดดีเอ็นเอ

Table 1 Natural Sources of 5 loaches of this study

Fish species	Thai name	Sources
A. nigrolineata	ปลาหมูน่าน	Wa river, Nan province
Y. modesta	ปลาหมูขาว	Chao Phraya river, Chainat province
Y. morleti	ปลาหมูค้อ	Wa river, Nan province
S. helodes	ปลาหมูข้างลาย	Ping river, Tak province
A. choirorhynchos	ปลารากกล้วย	Ping river, Tak province

2. การสกัดดีเอ็นเอจากครีบปลาตัวอย่าง

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากครีบของปลาตัวอย่างด้วยวิธี phenol-chloroform extraction (Sambrook and Russell, 2001) และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี 1% agarose gel electrophoresis

3. การเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยปฏิกิริยา PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยมีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x *Taq* buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.4 μM COI primers, 1 μM dNTPs, 0.625 unit *Taq* DNA Polymerase และดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาตร 0.5-2 ไมโครลิตร (Ward *et al*., 2005) และมีสภาวะการทำงานทั้งหมด 35 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จากการศึกษาของ Ward *et al*. (2005) โดยใช้ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (Table 2)

Table 2 Gene specific primers used for amplification of COI gene

Primer names	Sequences from 5' to 3'
FishF1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC
FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA
FishR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA

Source: Ward *et al.* (2005)

จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan) และตรวจสอบคุณภาพโดยวิธี 1% agarose gel electrophoresis

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิต PCR ที่บริสุทธิ์ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ทางด้านปลาย 5' ด้วยไพรเมอร์ FishF1 และ FishF2 โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul *et al.*, 1990) และฐานข้อมูล BOLD (http://www.boldsystems.org) และรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในฐานข้อมูล GenBank

ศึกษารูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาแต่ละชนิดด้วยโปรแกรม ClustalW (Thomson *et al.*, 1994) และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Genetyx version 5.0 (Genetyx Corp., Japan) วิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)

ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI

จากการสกัดดีเอ็นเอจากครีบปลาด้วยวิธี phenol-chloroform extraction แล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี 1% agarose gel electrophoresis พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่ที่ชัดเจน (ไม่แสดงข้อมูล) ซึ่งถึงแม้ว่ามีการปนเปื้อนด้วยโปรตีนและอาร์เอ็นเอ แต่ก็ยังสามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน COI ต่อไปได้ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (Fig.1) ซึ่งปฏิกิริยา PCR สามารถเพิ่มปริมาณยีนนี้ได้ในปลาทุกชนิด และเมื่อนำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ FishF1 และ FishF2 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาวต่างๆ กัน (Table 3) โดยมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 630 คู่เบส อยู่ในช่วง 621-639 คู่เบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดนี้ได้รายงานในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ Accession number JQ661339-JQ661363 และ KF738178-KF738211 (Table 3)

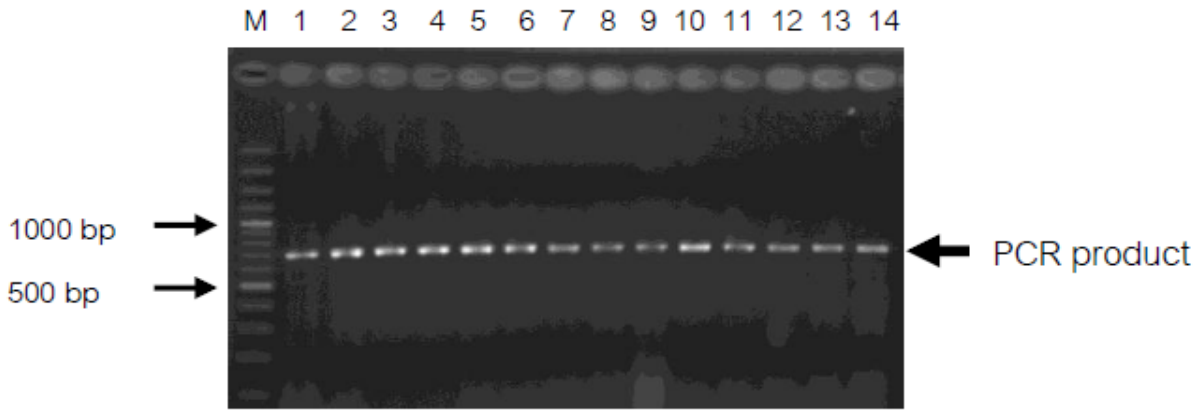

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products from 14 loaches (lane 1-14). 100 bp DNA ladder (Fermentas, Lithuania) was used as marker.

Table 3 Summary of COI sequences of 14 loaches

Family	Genus	Scientific name	Thai name	No. of Samples	Sequences length (bp)	Accession number
Botiidae	*Botia*	*B. kubotai*	ปลาหมูลายเมฆ	4	621	KF738178-KF738181
		B. almorhae	ปลาหมูโยโย่	4	621	KF738182-KF738185
		B. striata	ปลาหมูม้าลาย	3	636	KF738186-KF738188
		B. rostrata	ปลาหมูลายคู่	4	621	KF738189-KF738192
	Ambastaia	*A. nigrolineata*	ปลาหมูน่าน	4	627	KF738193-KF738196
		A. sidthimunki	ปลาหมูอารีย์	4	627	KF738197-KF738200
	Yasuhikotakia	*Y. modesta*	ปลาหมูขาว	5	639	JQ661354-JQ661358
		Y. morleti	ปลาหมูค้อ	5	639	JQ661339-JQ661343
		Y. lecontei	ปลาหมูสัก	5	634	JQ661359-JQ661363
	Syncrossus	*S. helodes*	ปลาหมูข้างลาย	5	635	JQ661349-JQ661353
		S. berdmorei	ปลาหมูจักรพรรดิ์	3	621	KF738201-KF738203
	Chromobotia	*C. macracanthus*	ปลาหมูอินโด	4	636	KF738204-KF738207
Cobitidae	*Pangio*	*P. kuhlii*	ปลาปล้องอ้อย	4	636	KF738208-KF738211
	Acantopsis	*A. choirorhynchos*	ปลารากกล้วย	5	625	JQ661344-JQ661348

เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาทุกชนิดกับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD (Table 4) พบว่า ฐานข้อมูล GenBank ยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลา 11 ชนิด คือ ปลาหมูลายเมฆ ปลาหมูโยโย่ ปลาหมูม้าลาย ปลาหมูลายคู่ ปลาหมูน่าน ปลาหมู

อารีย์ ปลาหมูค้อ ปลาหมูสัก ปลาหมูจักรพรรดิ์ ปลาหมูอินโด และปลาปล้องอ้อย ในขณะที่ฐานข้อมูล BOLD ยังไม่มีรายงานในปลา 5 ชนิดเท่านั้น คือ ปลาหมูลายเมฆ ปลาหมูน่าน ปลาหมูอารีย์ ปลาหมูจักรพรรดิ์ และปลาปล้องอ้อย ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลใหม่ จึงเป็นการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาดังกล่าวเป็นครั้งแรก

Table 4 Similarity search of the COI nucleotide sequences in 14 loaches on GenBank and BOLD database (as of September 13, 2013)

Accession number	Species	Species identification (%Similarity)	
		GenBank	BOLD
KF738178	*Botia kubotai*	*Botia dario* (90%)	-
KF738182	*Botia almorhae*	*Botia dario* (90%)	*Botia almorhae* (100%)
KF738186	*Botia striata*	*Botia dario* (90%)	*Botia striata* (100%)
KF738189	*Botia rostrata*	*Botia dario* (91%)	*Botia rostrata* (97.99%)
KF738193	*Ambastaia nigrolineata*	*Sinibotia superciliaris* (90%)	-
KF738197	*Ambastaia sidthimunki*	*Sinibotia superciliaris* (90%)	-
JQ661354	*Yasuhikotakia modesta*	*Yasuhikotakia modesta* (99%)	*Yasuhikotakia modesta* (100%)
JQ661339	*Yasuhikotakia morleti*	*Yasuhikotakia modesta* (90%)	*Yasuhikotakia morleti* (100%)
JQ661359	*Yasuhikotakia lecontei*	*Sinibotia robusta* (86%)	*Yasuhikotakia lecontei* (100%)
JQ661349	*Syncrossus helodes*	*Syncrossus helodes* (100%)	*Syncrossus helodes* (100%)
KF738201	*Syncrossus berdmorei*	*Syncrossus helodes* (90%)	-
KF738204	*Chromobotia macracanthus*	*Hypophthalmichthys nobilis* (85%)	*Chromobotia macracanthus* (99.53%)
KF738208	*Pangio kuhlii*	*Zacco temminckii* (84%)	-
JQ661344	*Acantopsis choirorhynchos*	*Acantopsis choirorhynchos* (99%)	*Acantopsis choirorhynchos* (100%)

จากการศึกษารูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาแต่ละชนิดด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่ามีปลาเพียง 5 ชนิดเท่านั้นที่มีเพียง 1 รูปแบบ (haplotype) ในขณะที่ปลาหมูโยโย่ ปลาหมูน่าน ปลาหมูอารีย์ ปลาหมูค้อ ปลาหมูอินโด ปลาปล้องอ้อยและปลารากกล้วยมี 2 รูปแบบ และปลาหมูขาว ปลาหมูสักมี 4 รูปแบบ โดยปลาแต่ละชนิดจะมีรูปแบบแตกต่างจากปลาชนิดอื่นๆ อย่างชัดเจน ยกเว้นปลาหมูน่านกับปลาหมูอารีย์เท่านั้นที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เหมือนกันหมดทุกตำแหน่งในความยาว 627 คู่เบสเท่ากัน แต่มีความหลากหลายของเบสเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น คือตำแหน่งที่ 126 (Fig.2)

```
ปลาหมูน่าน 1    121  ATACCAATCCTTATTGGAGGATTTGGAAACTGACTACTTCCATTAATGATTGGGGCCCCA  180
ปลาหมูน่าน 2    121  ATACCGATCCTTATTGGAGGATTTGGAAACTGACTACTTCCATTAATGATTGGGGCCCCA  180
ปลาหมูน่าน 3    121  ATACCAATCCTTATTGGAGGATTTGGAAACTGACTACTTCCATTAATGATTGGGGCCCCA  180
ปลาหมูน่าน 4    121  ATACCGATCCTTATTGGAGGATTTGGAAACTGACTACTTCCATTAATGATTGGGGCCCCA  180
ปลาหมูอารีย์ 1  121  ATACCGATCCTTATTGGAGGATTTGGAAACTGACTACTTCCATTAATGATTGGGGCCCCA  180
ปลาหมูอารีย์ 2  121  ATACCGATCCTTATTGGAGGATTTGGAAACTGACTACTTCCATTAATGATTGGGGCCCCA  180
ปลาหมูอารีย์ 3  121  ATACCAATCCTTATTGGAGGATTTGGAAACTGACTACTTCCATTAATGATTGGGGCCCCA  180
ปลาหมูอารีย์ 4  121  ATACCAATCCTTATTGGAGGATTTGGAAACTGACTACTTCCATTAATGATTGGGGCCCCA  180
                     *****.**************************************************
```

Figure 2 Multiple sequence alignment between *A. nigrolineata* (4 individuals) and *A. sidthimunki* (4 individuals) at position 121-180. Base substitution was showed in box.

2. การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาหมูทั้ง 14 ชนิด

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มาสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI จากปลาหมอช้างเหยียบ (*Pristolepis fasciatus*) เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม พบว่าสามารถแยกปลาหมู ซึ่งอยู่ในอันดับ Cypriniformes ออกจากปลาหมอช้างเหยียบที่อยู่ในอันดับ Perciformes ได้อย่างชัดเจน (Fig.3) และยังสามารถแบ่งปลาหมูออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามครอบครัวของปลา คือ ครอบครัว Botiidae และ Cobitidae ได้อีกด้วย โดยครอบครัว Botiidae ประกอบด้วยปลาในสกุล *Botia*, *Ambastaia*, *Yasuhikotakia*, *Syncrossus*, *Chromobotia* และครอบครัว Cobitidae ประกอบด้วยปลาในสกุล *Pangio* และ *Acantopsis* ซึ่งจะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาหมูทั้ง 14 ชนิด สามารถแบ่งกลุ่มของปลาได้อย่างถูกต้องและสอดคล้องกับระบบอนุกรมวิธานของปลา และยังสามารถแยกปลาแต่ละชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจนอีกด้วย ยกเว้นปลาหมูน่านและปลาหมูอารีย์

วิจารณ์ผล

ในการเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่า สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI จากปลาแต่ละชนิดได้ โดยมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 630 คู่เบส ซึ่งมีความยาวสั้นกว่าการศึกษาอื่นๆ ที่ผ่านมา เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในทิศทางเดียว คือ ทางด้านปลาย 5' ของผลผลิต PCR เท่านั้น ในขณะที่การศึกษาอื่นๆ เป็นการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งด้านปลาย 5' และ 3' ของผลผลิต จึงทำให้มีความยาวมากกว่าคือ 652 คู่เบส (Hubert *et al*., 2008) และ 655 คู่เบส (Ward *et al*., 2005)

เมื่อศึกษารูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาแต่ละชนิด พบว่า ปลาจำนวน 9 ชนิดมีมากกว่า 1 รูปแบบ โดยเป็นการเปลี่ยนแปลงเบสทั้งแบบ transition (การแทนที่เบสด้วยเบสกลุ่มเดียวกัน) และ transversion (การแทนที่เบสด้วยเบสต่างกลุ่มกัน) โดยมีการเปลี่ยนแปลงแบบ transition มากกว่า ซึ่งโดยทั่วไปสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีการเปลี่ยนแปลงแบบ transition มากกว่า transversion (Mahidol *et al*., 2008) อาจ

เนื่องมาจากการแทนที่เบสด้วยเบสกลุ่มเดียวกันมีผลต่อชนิดของกรดอะมิโนน้อยกว่าการแทนที่เบสด้วยเบสต่างกลุ่มกันในการแปลรหัสเป็นโปรตีน

นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาหมูน่านและปลาหมูอารีย์ที่มีความยาวเท่ากัน คือ 627 คู่เบส มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ ต่างกันเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น คือตำแหน่งที่ 126 ซึ่งจากการสอบถามเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลาหมูอารีย์ จังหวัดราชบุรี พบว่า ปลาหมูอารีย์ทั้ง 4 ตัวที่นำมาศึกษาครั้งนี้เป็นปลาลูกผสมระหว่างปลาหมูน่านเพศเมีย กับปลาหมูอารีย์เพศผู้ เนื่องจากปลาหมูอารีย์เป็นปลาที่หาได้ยากตามแหล่งน้ำธรรมชาติต่างๆ ในขณะที่ปลาหมูน่านสามารถหาได้ที่ลำน้ำว้า จังหวัดน่าน ทำให้ลูกผสมที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่อยู่ในไมโตคอนเดรียเหมือนแม่ทุกประการ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ไม่สามารถแยกชนิดของปลาลูกผสมนี้ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Wong *et al*. (2011) ที่ทำการศึกษาการจำแนกชนิดปลากลุ่ม catfish พบว่า ปลาลูกผสม *Ictalurus punctatus* x *I. furcatus* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เหมือนปลา *I. punctatus* ที่เป็นแม่ทุกประการ ดังนั้นอาจต้องใช้ยีนในนิวเคลียส เช่น ยีน 12S rRNA (Ardura *et al*., 2010) ยีน RAG1, RAG2 (recombination activating gene) (ZhongDuo *et al*., 2010) มาร่วมในการศึกษาครั้งนี้

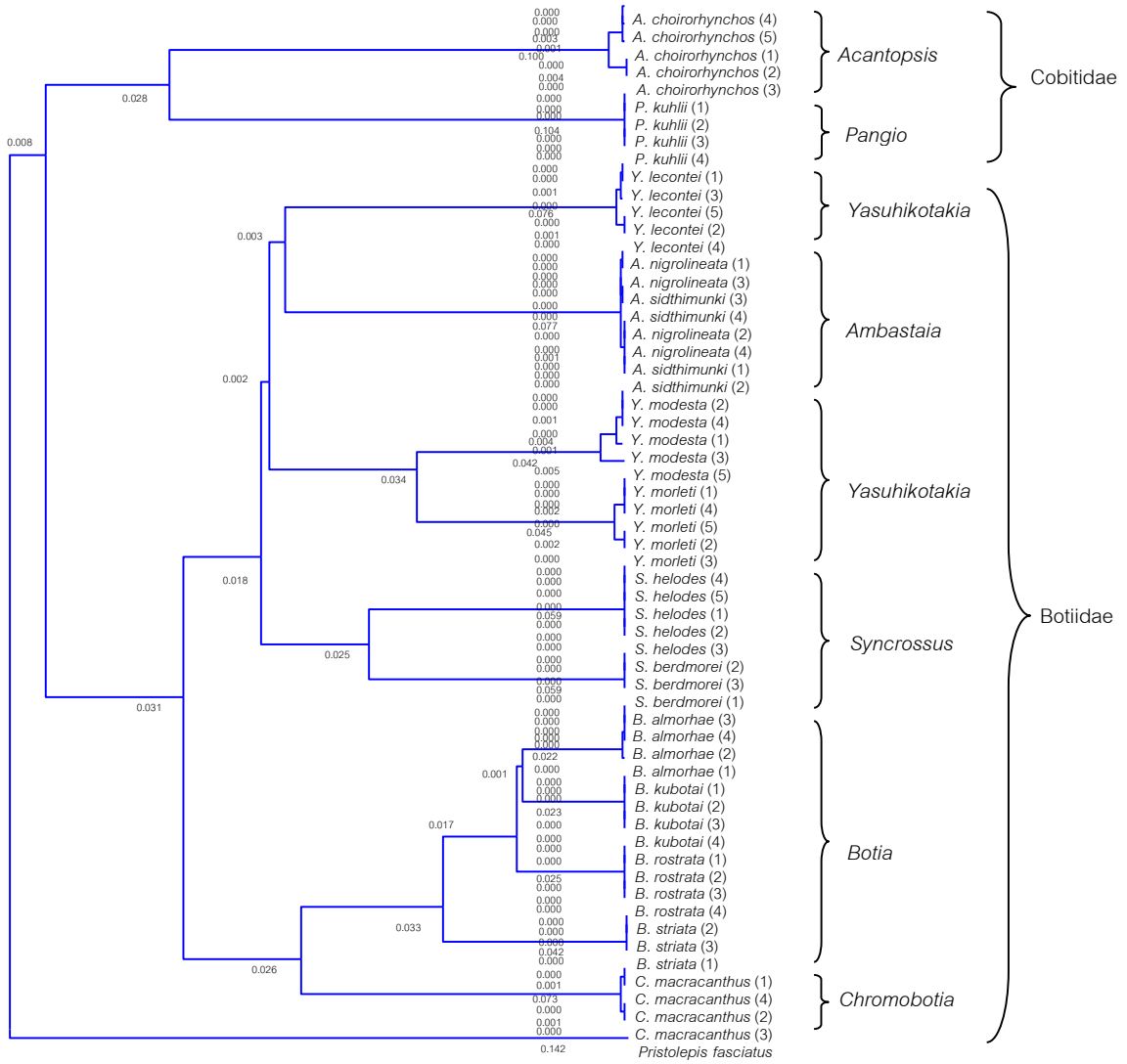

Figure 3 Phylogenetic tree of COI sequences of 14 loaches. The COI sequence of *Pristolepis fasciatus* used as an out group.

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาหมูในมหาวงศ์ Cobitoidea จำนวน 14 ชนิด จะเห็นได้ว่าปลาแต่ละสกุลถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ยกเว้นปลาในสกุล *Ambastaia* และ *Yasuhikotakia* เนื่องจากปลาทั้งสองสกุลนี้มีความใกล้ชิดกันมาก เพิ่งถูกแยกออกจากกันในปี พ.ศ. 2555 (Kottelat, 2012) นอกจากนี้ปลาในครอบครัว Botiidae ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มของปลาในสกุล *Yasuhikotakia*, *Ambastaia*, *Syncrossus* และกลุ่มของปลาในสกุล *Botia*, *Chromobotia* ซึ่งมีผลการศึกษาเช่นเดียวกับการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome b และ 12S rDNA (Šlechtová *et al.*, 2006)

สรุปผล

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกชนิดปลาหมูในมหาวงศ์ Cobitoidea จำนวน 14 ชนิด สามารถแยกความแตกต่างของปลา 12 ชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน ส่วนอีก 2 ชนิดไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดได้ และใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้เป็นอย่างดี ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะถูกรวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการกลาง มหาวิทยาลัยพะเยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215, 403-410.

Ardura, A., Linde, A.R., Moreira, J.C. and Garcia-Vazquez, E. 2010. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. Biological Conservation 143, 1438-1443.

Barrett, R.D.H. and Hebert, P.D.N. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. National Research Council Canada, 83, 481-491.

Hausmann, A., Haszprunar, G., Segerer, A.H., Speidel, W., Behounek, G. and Hebert, P.D.N. 2011. Now DNA-barcoded: the butterflies and larger moths of Germany (Lepidoptera: Rhopalocera, Macroheterocera). Spixiana, 34(1), 47-58.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and deWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B, 270, 313-321.

Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemlak, T.S. and Francis, C.M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biology, 2(10), 1657-1663.

Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N.E., Taylor, E., Burridge, M., Watkinson, D., Dumont, P., Curry, A., Bentzen, P., Zhang, J., April, J. and Bernatchez, L. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. PLoS ONE, 3(6), e2490.

Kottelat, M. 2012. Conspectus Cobitidum: An inventory of the loaches of the world (Teleostei: Cypriniformes : Cobitoidei). The Raffles Bulletin of Zoology Supplement No. 26, 1-199.

Mahidol, C., Yoosuk, W., Nugranad, J., Tunkijjanukij, S., Rermdumri, S., Sukmanomon, S., Nguyen, T.T.T. and Na-Nakorn, U. 2008. Molecular genetic studies and preliminary culture experiments of scallops (Bivalve: Pectinidae) in Thailand. (pp. 180-201). *In* Na-Nakorn, U. and Kamonrat, W. (editor). Population genetic for aquaculture. Kasetsart University and Thailand Research Fund. Bangkok. [in Thai]

Panprommin, D., Srionkong, B. and Panprommin, N. 2013. Species identification of 12 Rasborine fish using DNA barcode. Khon Kaen Agriculture Journal, 41(Supplement 1), 459-465. [in Thai]

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning; A laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Šlechtová, V., Bohlen, J., Freyhof, J. and Ráb, P. 2006. Molecular phylogeny of the Southeast Asian freshwater fish family Botiidae (Teleostei: Cobitoidea) and the origin of polyploidy in their evolution. Molecular Phylogenetics and Evolution, 39, 529-541.

Šlechtová, V., Bohlen, J. and Perdices, A. 2008. Molecular phylogeny of the freshwater fish family Cobitidae (Cypriniformes: Teleostei): Delimitation of genera, mitochondrial introgression and evolution of sexual dimorphism. Molecular Phylogenetics and Evolution, 47, 812-831.

Thomson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680.

Ward, R.D., Tyler, S.Z., Bronwyn, H.I., Peter, R.L. and Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 360, 1847-1857.

Wong, L.L., Peatman, E., Lu, J., Kucuktas, H., He, S., Zhou, C., Uthairat, N. and Zhanjiang, L. 2011. DNA barcoding of catfish: species authentication and phylogenetic assessment. PLoS ONE, 6(3), e17812. doi:10.1371/journal.pone.0017812.

Yomkerd, P. and Panprommin, D. 2013. DNA barcoding of 5 fish economy from Ping River, Tak province. Naresuan Phayao Journal, 6(1), 64-70. [in Thai]

ZhongDuo, W., YuSong, G., Wei, T., Lu, L., EnPu, T., ChuWu, L. and Yun, L. 2010. DNA barcoding, phylogenetic relationships and speciation of snappers (genus *Lutjanus*). Science China Life Sciences, 53(8), 1025-1030.