

ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลาในวงศ์ Bagridae โดยใช้เทคนิค RAPD และ ISSR

Study on DNA Fingerprint of Family Bagridae Using RAPD and ISSR Techniques

สุกัญญา คำหล้า¹

Received: April, 2012; Accepted: December, 2012

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลาในวงศ์ Bagridae จำนวน 7 ชนิด ดำเนินการโดยการวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR ในตัวอย่างปลาทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ ปลากดเหลือง (*Hemibagrus nemurus*: HN), ปลากดคัง (*H. wyckioides*: HW), ปลาแขยงข้างลาย (*M. vittatus*: MV), ปลามังกร (อังก) (*M. gulio*: MG), ปลาแขยงธง (*M. bocourti*: MB), ปลาแขยงหิน (*Pseudomystus siamensis*: PS) และปลากดพม่า (*Mystus leucophasis*: ML) ผลการศึกษาจากการทดสอบขั้นต้นด้วยไพรเมอร์ RAPD จำนวน 7 ไพรเมอร์ คัดเลือกไพรเมอร์ซึ่งสามารถแยกชนิดของปลาที่นำมาศึกษาออกจากกันได้ อย่างชัดเจนและให้ผลที่อ่านง่าย สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดได้จำนวน 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-19, OPB-08 และ OPC-02

ส่วนการศึกษาด้วยเทคนิค ISSR เมื่อทดสอบขั้นต้นด้วยไพรเมอร์ ISSR จำนวน 7 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมดยังไม่สามารถแยกชนิดของปลาที่นำมาศึกษาออกจากกันได้ อย่างชัดเจน เพราะแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่คมชัด โดยไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกชนิดปลาได้นั้น สามารถใช้เป็นเครื่องมือช่วย ในการจำแนกชนิดของปลาทั้ง 7 ชนิด

คำสำคัญ : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, ปลาในวงศ์ Bagridae, เทคนิค RAPD, เทคนิค ISSR

¹ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร
E - mail : sugunyakumla@hotmail.com

Abstract

Molecular technique for DNA fingerprinting study in Family Bagridae was developed using RAPD and ISSR DNA marker. Seven species consist of *Hemibagrus nemurus*: HN, *H. wyckioides*: HW, *M. vittatus*: MV, *M. gulio*: MG, *M. bocourti*: MB, *Pseudomystus siamensis*: PS and *Mystus leucophasis*: ML. The total of 7 RAPD and 7 ISSR primers developed from Family Bagridae were screened. Of 6 primers which namely OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-19, OPB-08 and OPC-02 were exhibited useful extinction patterns for identifying the studied species and of 7 total ISSR primers were smear patterns which did not distinguish other species. The 6 RAPD primers could be alternative taxonomic tool for identify this family.

Keywords : DNA fingerprint, Family Bagridae, RAPD Technique, ISSR Technique

บทนำ

ปลาในวงศ์ Bagridae เป็นปลาพื้นเมืองของประเทศไทยอีกวงศ์หนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเนื้อมีรสชาติดีและเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ปลาในวงศ์นี้ที่สามารถเพาะพันธุ์ได้และนิยมนำมาเพาะเลี้ยง คือ ปลากดเหลืองและปลากดคัง นอกจากนี้ยังพบว่าปลาในวงศ์นี้มีการนำมาเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม เนื่องจากมีลวดลายสวยงาม สีสันฉูดฉาด และมีรูปร่างแปลก เช่น ปลาแขยงข้างลาย ปลาแขยงธง และปลาแขยงหิน ซึ่งปลาในวงศ์นี้พบแพร่กระจายทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย

Burgess (1989) รายงานว่า พบปลาสกุล *Mystus* ทั่วโลกมากกว่า 37 ชนิด สำหรับในประเทศไทยจากการสำรวจครั้งแรกโดย Smith (1945) รายงานพบ 9 ชนิด ต่อมา (Suvatti, 1981) รายงานพบ 11 ชนิด และ (สุภาพ และคณะ, 2530) รายงานพบ 13 ชนิด จากการสำรวจพันธุ์ปลาระยะหลังพบปลาชนิดใหม่เพิ่มขึ้น ซึ่งจากการศึกษาจากเอกสารอาจสรุปชนิดปลาสกุล *Mystus* ที่พบ

ในประเทศไทยทั้งหมด 16 ชนิด (ทัศนพล, 2537; Talwar and Jhingran, 1991; Tianpei, 1991; Robert, 1994) แต่จากการศึกษาทางอนุกรมวิธานของปลาสกุลนี้และสกุลใกล้เคียงในระยะต่อมาพบว่ามีความสับสนทางอนุกรมวิธานค่อนข้างมากเนื่องจากลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนกมีน้อยและไม่เด่นชัดจึงเกิดความผิดพลาดของการจัดจำแนก (ศาสด, 2539) ซึ่งลักษณะที่ใช้ในการจำแนกนี้มักขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมทำให้ตรวจสอบผลผิดพลาดได้ บางครั้งจึงต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ แต่อย่างไรก็ตามการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรกแล้วจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่แม่นยำและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ปัจจุบันเทคนิคทางชีวโมเลกุลตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลานาน และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้จากเนื้อเยื่อใดๆ ระยะการเจริญเติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับสภาพ

แวดล้อม จึงมีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาช่วยในการระบุความจำเพาะของประชากรในแต่ละพื้นที่ การจำแนกชนิดของสัตว์น้ำ ลักษณะสีเนื้อ (Aranceda et al., 2005) และการเจริญเติบโต (He et al., 2009) เป็นต้น (Kumla et al., 2012) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากดเหลืองในประเทศไทยด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR พบว่า ไพรเมอร์ OPA-10 ให้แถบ ดีเอ็นเอขนาด 400 bp ที่จำเพาะกับปลากดเหลือง และแถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 bp ที่จำเพาะกับประชากรของปลากดเหลืองในจังหวัดสงขลา นอกจากนี้ ยังพบว่ามีการพัฒนาการใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกชนิดของปลาชนิดต่างๆ อย่างแพร่หลาย ได้แก่ ปลา Spanish barbel (Callejas and Ochando, 1998), ปลาในสกุล *Barbus* (Cyprinidae) 8 ชนิด (*Barbus bocagei* (Steindachner), *B. comizo* (Steindachner), *B. graellsii* (Steindachner), *B. guiraonis* (Steindachner), *B. sclateri* Günther, *B. microcephalus* Almaça, *B. haasi* Mertens and *B. meridionalis* Risso) ในคาบสมุทร Iberian (Callejas and Ochando, 2001) และปลาในกลุ่ม Mahseer 5 ชนิด (*Tor putitora*, *T. tor*, *T. khudree*, *T. mosalmahanadicus* และ *Neolissochilus hexagonolepis*) ในคาบสมุทร อินเดีย (Mohindra et al., 2007) เป็นต้น ทำให้ความรู้สาขานี้ เจริญก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว สามารถนำไปใช้ในการจำแนกและการปรับปรุงพันธุ์เพื่อประโยชน์ในอนาคตต่อไป

Welsh and McClelland, (1990), Williams et al., (1990) ได้พัฒนาเทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs) จากเทคนิคพีซีอาร์แบบมาตรฐาน โดยใช้ไพรเมอร์ สายสั้นๆ โดยทั่วไปมีขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีลำดับเบสไม่เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) และใช้เพียง 1 ไพรเมอร์

จับกับลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งไพรเมอร์ ที่ใช้อาจมีลำดับเบสสอดคล้องกับลำดับเบสบนสาย ดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายช่วง การสังเคราะห์ท่อน ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นที่ต่อเมื่อลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับ ไพรเมอร์วางตัวบนสายดีเอ็นเอสายคู่ของดีเอ็นเอ ต้นแบบในทิศทางตรงกันข้ามกัน การสังเคราะห์ ท่อนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD นั้น ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับดีเอ็นเอเป้าหมายจึงเรียกว่า random amplified และเนื่องจากกระบวนการดังกล่าว ใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างสุ่มเพื่อ จับกับสายดีเอ็นเอ ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอาจมี จำนวนตั้งแต่ 0 ถึง 30 แถบต่อตัวอย่าง ซึ่งแถบ ดีเอ็นเอเหล่านี้มีความหลากหลายทั้งในเรื่องการเกิด หรือไม่เกิดแถบ จำนวนแถบที่เกิดตลอดจนถึงขนาด ของแถบ ในการทำปฏิกิริยา RAPD-PCR นั้น จะใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นทำให้มี annealing temperatures ที่ต่ำ (36 - 40°C) จึงทำให้เกิด PCR product จำนวนมาก มีคุณสมบัติ ในการทำซ้ำต่ำ

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) เป็นเทคนิคปรับปรุงมาจากเทคนิค Microsatellite AFLP และ RAPD ปัจจุบันนิยมกันอย่าง กว้างขวาง โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์เพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอที่บริเวณระหว่าง Microsatellite 2 ตำแหน่ง ใช้ลำดับ Microsatellite เป็นไพรเมอร์ (SSR primer) โดยส่วนใหญ่จะมีความยาวประมาณ 16 - 25 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะเป็นแบบ unanchored ก็ได้ หรือจะเป็นไพรเมอร์ที่ถูกเติมด้วย 1 - 4 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่ 3' anchored หรือ เป็น 5' anchored ถ้าเติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ จะทำให้เกิดจำนวนแถบดีเอ็นเอ มากขึ้น และเกิดความแตกต่างมากขึ้นด้วย (highly polymorphic) ถ้าเติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ จะทำให้แถบที่เกิดมีความชัดเจนขึ้น เมื่อเทียบกับ 5' anchored ไพรเมอร์ (Reddy, Sarla and Siddiq, 2002) เป็นเทคนิคที่มี

ความคล้ายคลึงกับเทคนิค RAPD แต่ใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวมากกว่าจึงทำให้อุณหภูมิ annealing ที่ใช้สูงกว่าเพราะอุณหภูมิขึ้นกับ GC content ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 45 - 65 องศาเซลเซียส จึงมีความหลากหลายมากกว่าและมีความสามารถในการทำซ้ำดีกว่า (high reproducibility) ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ ง่าย รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายที่เราต้องศึกษาก่อน ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสีเพื่อติดฉลาก มีความสามารถในการทำซ้ำสูง

จากข้อมูลทางชีวโมเลกุลเบื้องต้น การทำการวิจัยในครั้งนี้ มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาในกลุ่ม Bagridae โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและแถบดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในสภาพ หลากรูป (polymorphic) บอกความแตกต่างของปลาในแต่ละชนิดได้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการระบุชนิดของปลาในวงศ์ Bagridae ให้มีความถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

การเก็บตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างปลาในวงศ์ Bagridae จากชาวประมงที่จับจากแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการคัดแยกเบื้องต้นว่าเป็นปลาคนละชนิดกัน (สืบสิน, 2527) ซึ่งประกอบไปด้วยปลาทั้งหมด 7 ชนิด คือ ปลาเก็ดเหลือง (*Hemibagrus nemurus*: HN), ปลากดคัง (*H. wyckioides*: HW), ปลาแขยงข้างลาย (*M. vittatus*: MV), ปลามังกร (อีกรัง) (*M. gulio*: MG), ปลาแขยงธง (*M. bocourti*: MB), ปลาแขยงหิน (*Pseudomystus siamensis*: PS) และปลาแขยงพม่า (*Mystus leucophasis*: ML) นำตัวอย่างปลาแต่ละชนิดมาตัดบริเวณปลายครีบทาด้านบนยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ขณะที่ปลา

ยังมีชีวิตอยู่ นำครีบทางที่ตัดล้างทำความสะอาดด้วย absolute ethanol เย็น จนกระทั่งไม่มีเมือกและเลือดติดอยู่ รักษาสภาพเนื้อเยื่อที่ตัดด้วยการแช่ใน absolute ethanol ให้ท่วมนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน และนำไปเก็บที่ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Proteinase K/ Phenol-Chloroform ตามวิธีการของ Kumla et al. (2012) ดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อครีบทางแต่ละชนิด (Genomic DNA) นำมาวัดปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจสอบคุณภาพ เริ่มจากการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบที่ค่าการเจือจาง (dilution factor) 50 - 100 เท่า นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu UV-160A) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 nm และ 280 nm ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปคำนวณหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ จากสมการที่ 1

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ($\mu\text{g/ml}$) = $A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor} \dots\dots\dots(1)$

ความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอสามารถประเมินได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm กับ 280 nm (A_{260}/A_{280}) ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ควรมีค่าประมาณ 1.8

นอกจากนี้ยังตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอซ้ำอีกครั้ง โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) นำ genomic DNA ที่ได้จากปลาแต่ละชนิด มาแยกบน 0.8 % agarose gel แล้วย้อมด้วย EtBr ($1 \mu\text{g/ml}$) ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสง UV

โดยใช้เครื่อง Gel-Doc TM 2000 (BioRad, USA) เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนและการแตกหักของ โมเลกุลดีเอ็นเอ เก็บดีเอ็นเอที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR

เจือจาง Genomic DNA ที่สกัดได้จาก ตัวอย่างปลาแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 20 ng/μl มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจหาลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค RAPD ไพรมเมอร์ที่ใช้ คือ OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-17, OPA-19, OPB-08 และ OPC-02 (Kumla et al., 2012) โดยใช้ส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์รวมทั้งหมด 20 μl ประกอบด้วยส่วนผสมต่างๆ ดังนี้ Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, USA) 10 μl, 1.5 mM MgCl₂, 1.6 μM Primer, Genomic DNA 20 ng 1 μl ปรับ ปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 20 μl แล้วนำไปเข้าเครื่อง PCR (Gene Amp® PCR system, 9700) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรม ควบคุมอุณหภูมิการทำงานดังนี้ pre denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส 2 นาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 44 รอบ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ แล้วค้างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

เทคนิค ISSR ไพรมเมอร์ที่ใช้คือ 814, 844A, 844B, 17899A, HB12, HB13 และ HB15 (Kumla et al., 2012) โดยใช้ส่วนผสม ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ รวม 20 μl ประกอบด้วย ส่วนผสมต่างๆ ดังนี้ Go Taq® Green Master

Mix (Promega, Madison, USA) 10 μl, 1.0 mM MgCl₂, 0.5 μM Primer, Genomic DNA 20 ng 1 μl ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 20 μl แล้วนำไปเข้าเครื่อง PCR (Gene Amp® PCR system, 9700) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิการทำงานดังนี้ pre denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 45 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 35 รอบ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ แล้วค้างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อสิ้นสุดการทำ PCR จากทั้งสองเทคนิค ให้นำ PCR product ที่ได้มาแยกตามขนาดบน 1.5 % agarose gel และย้อมด้วย EtBr (1 μg/ml) ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้ เครื่อง Gel-Doc TM 2000 (BioRad, USA) โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็นแลบดีเอ็นเอ มาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบขนาดของแลบดีเอ็นเอที่ได้

ผลการศึกษา

คุณภาพดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อครีบทองปลา ไนวงศ์ Bagridae ทั้ง 7 ชนิด พบว่า ปริมาณ ของดีเอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในช่วงระหว่าง 32 - 175 ng/μl และมีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1.7 - 2.0 (ตารางที่ 1) จากการตรวจสอบทั้ง ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอมีปริมาณเพียงพอ สำหรับทำการศึกษาและดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความ บริสุทธิ์ ไม่แตกหัก เหมาะสมสำหรับทำการศึกษา ต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากปลาในวงศ์ Bagridae จำนวน 7 ชนิด

ชนิดปลา	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)	ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A_{260}/A_{280})
ปลากดเหลือง (<i>Hemibagrus nemurus</i> : HN)	125.5	1.7
ปลากดคัง (<i>H. wyckioides</i> : HW)	32.5	1.9
ปลาแขยงข้างลาย (<i>M. vittatus</i> : MV)	180.0	1.8
ปลามังกร (อังก) (<i>M. gulio</i> : MG)	120.0	1.9
ปลาแขยงธง (<i>M. bocourti</i> : MB)	112.5	1.8
ปลากดพม่า (<i>Mystus leucophasis</i> : ML)	175.0	2
ปลาแขยงหิน (<i>Pseudomystus siamensis</i> : PS)	132.5	1.8

ผลการศึกษาสายพันธุดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR

จากการใช้ RAPD ไพรมเมอร์ทั้ง 7 แบบ ที่ใช้ทดสอบการสังเคราะห์ท่อนดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอ ต้นแบบของปลาในวงศ์ Bagridae ทั้ง 7 ชนิด พบว่า ไพรมเมอร์ OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-19, OPB-08 และ OPC-02 ทำให้เกิดการสังเคราะห์ท่อนดีเอ็นเอที่เห็นเป็นแถบดีเอ็นเอ ชัดเจน โดยแบ่งได้เป็นแถบสีเข้ม (major band) และแถบสีจาง (minor band) และสามารถสังเคราะห์ท่อนดีเอ็นเอจากตัวอย่างปลาทั้ง 7 ชนิดได้ รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรมเมอร์ทั้ง 6 แบบ อยู่ในสภาพหลากหลายรูป (polymorphic) ระหว่างปลา แต่ละชนิด การทำ PCR-RAPD โดยใช้ไพรมเมอร์ OPA-04, OPA-07, OPA-10 และ OPA-19 พบว่าตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของปลาแต่ละชนิด มีตำแหน่งที่ต่างกันทั้ง 7 ชนิดเมื่อเทียบกับแถบ

ดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker 100 bp ladder) (ภาพที่ 1 - 3) แต่เมื่อใช้ไพรมเมอร์ OPA-17, OPB-08, และ OPC-02 พบว่าสามารถสร้างแถบดีเอ็นเอ ที่มีตำแหน่งต่างกับปลาบางชนิดเท่านั้น เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 2 - 4) แถบ ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับปลาแต่ละชนิดที่ได้ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละไพรมเมอร์นั้น สามารถเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อช่วยในการแยก ความแตกต่างระหว่างปลาในวงศ์ Bagridae แต่ละชนิดได้ แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด มีขนาดประมาณ 300 - 3,000 bp (ภาพที่ 1 - 4)

จากการทดสอบสังเคราะห์ท่อนดีเอ็นเอจาก ดีเอ็นเอต้นแบบของปลาในวงศ์ Bagridae โดยใช้ ISSR ไพรมเมอร์ทั้ง 7 แบบ (814, 844A, 844B, 17899A, HB12, HB13 และ HB15) พบว่า การสังเคราะห์ท่อนดีเอ็นเอจากไพรมเมอร์ทั้งหมด ให้แถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้

ส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบเดียวกัน (monomorphic) ระหว่างปลาแต่ละชนิด จึงไม่สามารถนำไปใช้แยกความแตกต่างระหว่างปลาในวงศ์ Bagridae แต่ละชนิดได้ แต่ก็ยังมีไพรเมอร์บางส่วน รูปแบบแถบ ดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในสภาพหลากหลาย (polymorphic) ได้แก่ ไพรเมอร์ 814 17899A HB13 และ HB15 ที่สามารถนำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้แยกความแตกต่างระหว่างปลาในวงศ์ Bagridae บางชนิดได้ แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดมีขนาดประมาณ 250 - 3,000 bp (ภาพที่ 4 - 7)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง อยู่ระหว่าง 1.7 - 2.0 โดยดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์นั้น ควรมีค่า 1.8 ขึ้นไป (Sambrook et al., 1989; Sambrook and Russel, 2001) ไพรเมอร์ ที่นำมาใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในปลา ได้หลาย ๆ ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic band สูง และให้แถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับปลาแต่ละชนิด ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการจำแนกชนิดของปลาในวงศ์ Bagridae ได้ คือไพรเมอร์ OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-19, OPB-08 และ OPC-02 สอดคล้องกับการทดลองของ (Kumla et al., 2012) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากดเหลืองในประเทศไทยด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR พบว่า ไพรเมอร์ OPA-10 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 bp ที่จำเพาะกับปลากดเหลืองและแถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 bp ที่จำเพาะกับประชากรของปลากดเหลืองในจังหวัดสงขลา นอกจากนี้ยังพบว่ามี การพัฒนาการใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกชนิดของปลาชนิดต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย ได้แก่ ปลา Spanish barbel (Callejas and Ochando, 1998), ปลาในสกุล *Barbus* (Cyprinidae)

8 ชนิด (*Barbus bocagei* (Steindachner), *B. comizo* (Steindachner), *B. graellsii* (Steindachner), *B. guiraonis* (Steindachner), *B. sclateri* Günther, *B. microcephalus* Almaça, *B. haasi* Mertens and *B. meridionalis* Risso) ในคาบสมุทร Iberian (Callejas and Ochando, 2001) และปลาในกลุ่ม Mahseer 5 ชนิด (*Tor putitora*, *T. tor*, *T. khudree*, *T. mosalmahanadicus* และ *Neolissochilus hexagonolepis*) ในคาบสมุทรอินเดีย (Mohindra et al., 2007)

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลาในวงศ์ Bagridae โดยใช้เทคนิค ISSR ด้วยไพรเมอร์ 7 ชนิดนั้น เมื่อนำไปผ่านกระบวนการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิค PCR พบว่าให้แถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้ส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบเดียวกัน (monomorphic) แต่ก็ยังมีไพรเมอร์บางส่วนให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในสภาพหลากหลาย (polymorphic) ได้แก่ ไพรเมอร์ 814 17899A HB13 และ HB15 ที่สามารถนำไปใช้แยกความแตกต่างระหว่างปลาในวงศ์ Bagridae บางชนิดได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ยังไม่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ที่เราใช้ ทำให้เกิดการจับคู่เบสผิดพลาด (mismatch) ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ จึงเกิดแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่ชัดเจนมีลักษณะเป็นปื้น (smear) ทำให้การอ่านผลจากแถบดีเอ็นเอเป็นไปได้ยากขึ้น (Williams et al., 1990)

ผลจากการศึกษาค้างนี้ แสดงให้เห็นว่าเทคนิค RAPD สามารถนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในวงศ์ Bagridae ได้ เพราะให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic band สูง แถบดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งแตกต่างกันนั้น ยังบ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาแต่ละชนิดได้อย่างชัดเจน และแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับปลาในแต่ละชนิด

ที่ได้จากทั้งสองเทคนิคนั้นควรมีการศึกษาต่อไป เนื่องจากแถบดีเอ็นเอได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม จึงมีคุณสมบัติในการทำซ้ำต่ำ ซึ่งอาจจะให้ผลแตกต่างไปจากเดิมถ้ามีการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ดังนั้นเพื่อให้ผลที่มีความแน่นอนและแม่นยำมากยิ่งขึ้น ควรนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD และ ISSR ไปพัฒนาต่อโดยใช้เทคนิค Sequence-characterized amplified region; SCAR (Araneda et al., 2005) ซึ่งเป็นการใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะและให้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวที่จำเพาะกับลักษณะที่เราสนใจที่จะศึกษา นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการทำซ้ำสูงอีกด้วย

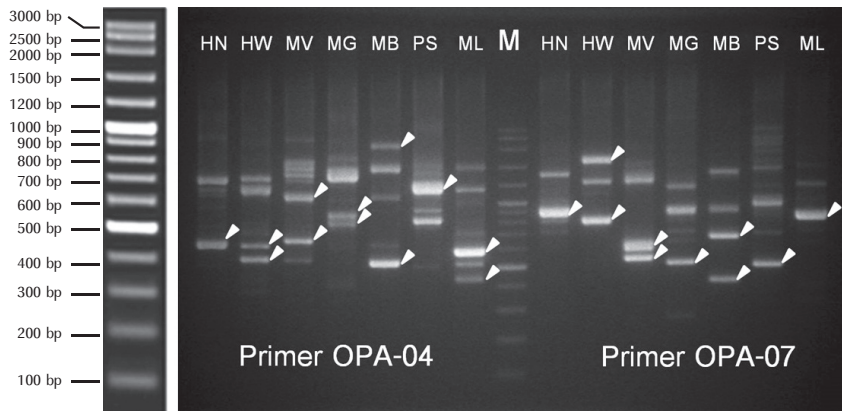
กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศ.ดร.นิสันต์ สัตยาภัย ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่คอยให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยในครั้งนี้

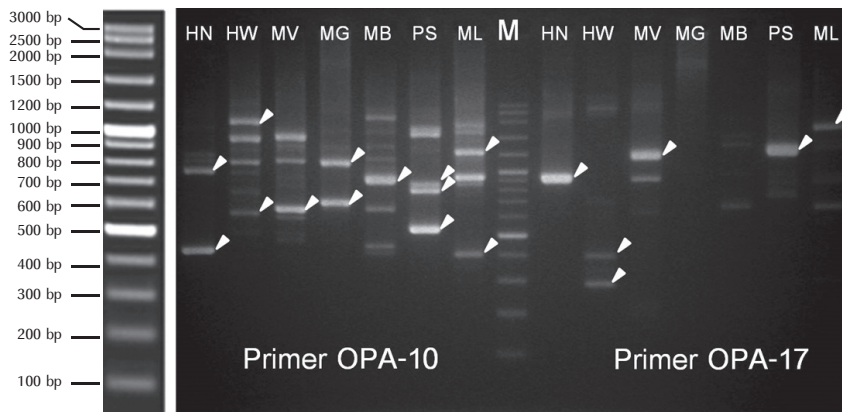
บรรณานุกรม

- ทศพล กระจำนงคารา. 2537. อนุกรมวิธานและชีววิทยาบางประการของปลาในอ่างเก็บน้ำเขื่อนรัชชประภา จังหวัดสุราษฎร์ธานี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ศาสวัต วรควาณินันต์. 2539. ชีววิทยาบางประการของปลากดเหลือง (*Mystus nemurus*). วิทยาศาสตร์การประมง. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 80 หน้า
- สุภาพ มงคลประสิทธิ์, สุรีย์ วิมลโลหการ และ ทวีศักดิ์ ทรงศิริกุล. (2530). ปลาเมืองไทย. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร, 113 หน้า.
- สืบสิน สนธิรัตน์. 2527. ชีววิทยาของปลา. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร, 185 หน้า.
- Araneda C., Neira R, Iturra P. (2005). Identification of a dominant SCAR marker associated with colour traits in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*. 247 : 67-73.
- Burgess, W.E. (1989). An Atlas of Fresh-water and Marine Catfish : A Preliminary Survey of the Siluriformes. T.F.H. Publication, Inc. New Jersey. 784 p.
- Callejas, C. and Ochando, M.D. (1998). Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *Fish. Bio*. 53 ; 208-215.
- Callejas, C. and Ochando, M.D. (2001). Molecular identification (RAPD) of the eight species of the genus *Barbus* (Cyprinidae) in the Iberian Peninsula. *Fish. Bio*. 59 ; 1589-1599.
- He YY, Liu P, Li J, Wang QY. (2009). Sequence characterized amplified regions (SCAR) reveal candidate markers linked to growth traits in the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Sci* 75. 1267-1274.
- Kumla, S., Doolgindachbaporn, S., Sudmoon, R. and Sattayasai, N. (2012) Genetic variation, population structure and identification of yellow catfish, *Mystus nemurus* (C&V) in Thailand using RAPD, ISSR and SCAR marker. *Mol. Bio. Re*. 39 : 5201-5210.

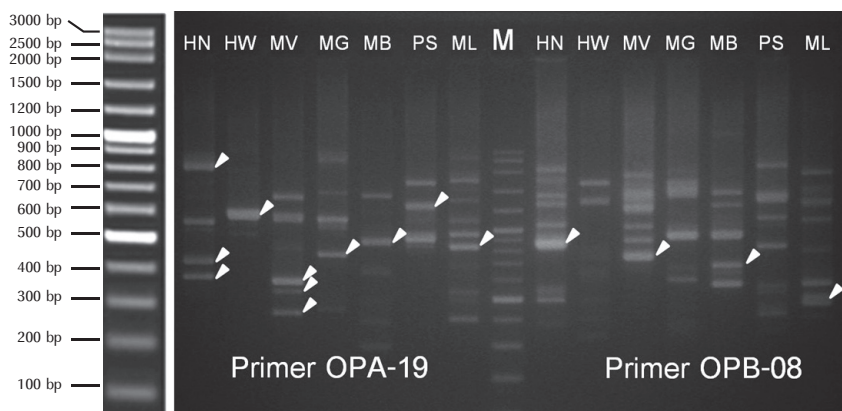
- Mohindra, V., Khare, P., Lal, K.K., Punia, P., Singh, R.K., Barman, A.S. and Lakra W.S. (2007). Molecular Discrimination of Five Mahseer Species from Indian Peninsula Using RAPD Analysis. *Acta. Zool. Sin.* 53(4) : 725-732.
- Reddy, M.P., Sarla, N. and Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128 : 9-17.
- Roberts, TR. (1994). Systematic revision of Asian bagrid catfishes of the genus *Mystus sensu strict*, with a new species from Thailand and Cambodia. *Ichthyol. Eeplor. Freshwater.* 5(3) : 241-256.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning a laboratory manual. 2nd ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook J, Russell DW. (2001). Molecular cloning a laboratory manual. 3rd ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smith, H.M. (1945). The Freshwater Fishes of Siam of Thailand. *Bull. U.S. Nat. Mus* 188. 622 p.
- Suvatti, C. (1981). Fishes of Thailand. Rungslip Printing Co., Ltd. Bangkok. 379 p
- Talwer, P.K. and Jhingran, A.G. (1991). Inland Fishes of Indian and Adjacent Contries, vol. 2. Oxford and IBH Publishing Co., Ltd., New Delhi. 615 p.
- Tianpei, M. (1991) Anatomy Relationship and Systematics of the Bagridae (Teleostei: Suluroidei) with a hypothesis of siluroid phylogeny, pp. 123-216. In R. Fricke (ed.). *Theses Zoologicae Volumn 17.* Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Welsh J, McClelland M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res.* 18 : 7213-7218.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18 : 6531-6535.



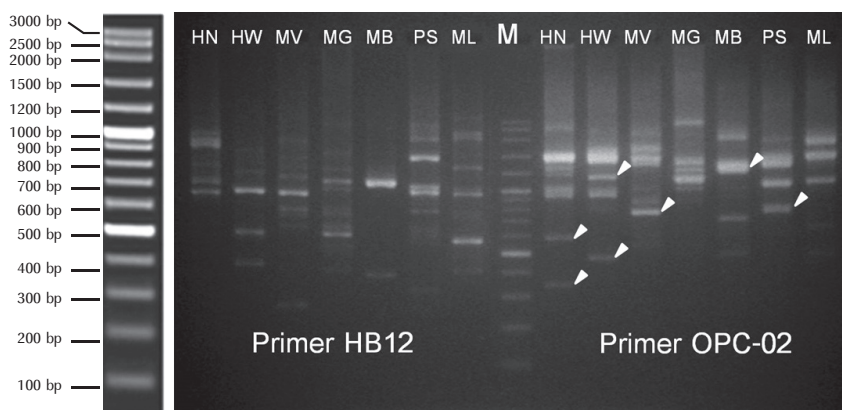
รูปที่ 1 รูปแบบลายพืตดีเอ็นเอของปลาในวงศ์ Bagridae ทั้ง 7 ชนิด จากการทํา PCR-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-04 และ OPA-07 (Lane M: marker 100 bp ladder) ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความจําเพาะกับปลาแต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอของปลาแต่ละชนิดกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานทางด้านซ้ายมือ



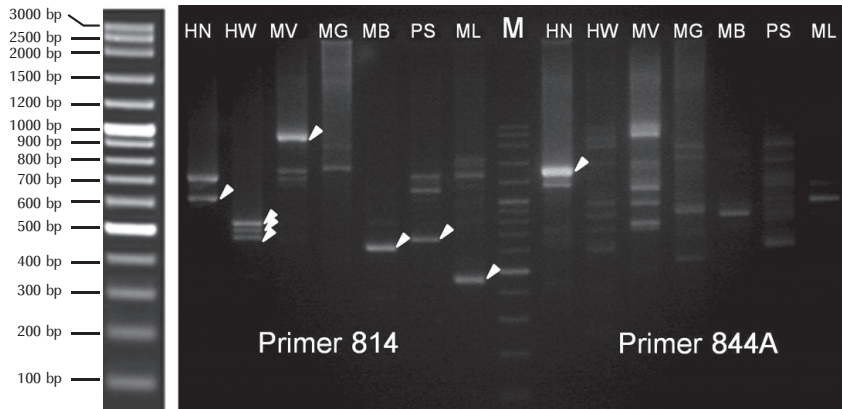
รูปที่ 2 รูปแบบลายพืตดีเอ็นเอของปลาในวงศ์ Bagridae ทั้ง 7 ชนิด จากการทํา PCR-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-10 และ OPA-17 (Lane M: marker 100 bp ladder) ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความจําเพาะกับปลาแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอของปลาแต่ละชนิดกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานทางด้านซ้ายมือ



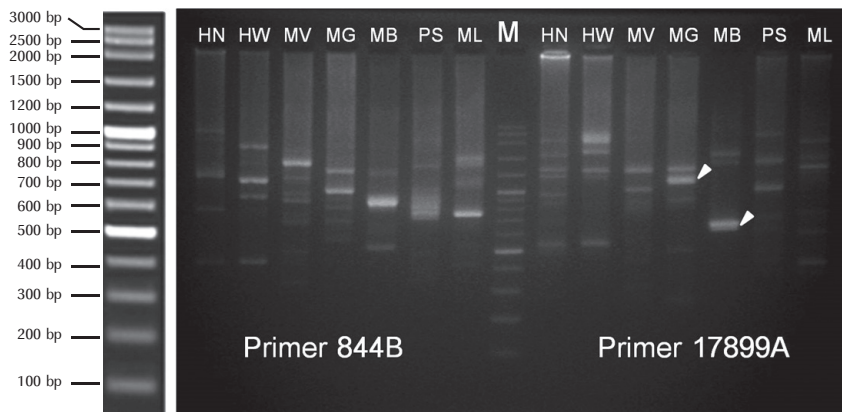
รูปที่ 3 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลาในวงศ์ Bagridae ทั้ง 7 ชนิด จากการทำ PCR-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-19 และ OPB-08 (Lane M: marker 100 bp ladder) ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับปลาแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอของปลาแต่ละชนิดกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานทางด้านซ้ายมือ



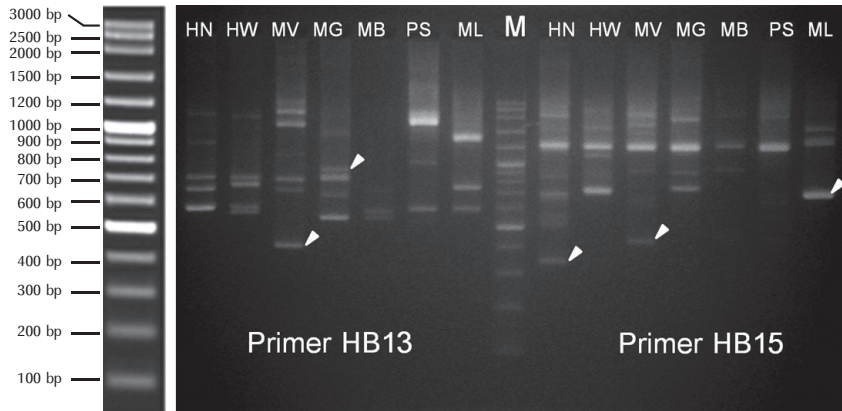
รูปที่ 4 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลาในวงศ์ Bagridae ทั้ง 7 ชนิด จากการทำ PCR-SSR และ PCR-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ HB12 และ OPC-02 (Lane M: marker 100 bp ladder) ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับปลาแต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอของปลาแต่ละชนิดกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานทางด้านซ้ายมือ



รูปที่ 5 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลาในวงศ์ Bagridae ทั้ง 7 ชนิด จากการทำ PCR-SSR โดยใช้ไพรเมอร์ 814 และ 844A (Lane M: marker 100 bp ladder) ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับปลาแต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอของปลาแต่ละชนิดกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานทางด้านซ้ายมือ



รูปที่ 6 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลาในวงศ์ Bagridae ทั้ง 7 ชนิด จากการทำ PCR-SSR โดยใช้ไพรเมอร์ 844B และ 17899A (Lane M: marker 100 bp ladder) ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับปลาแต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอของปลาแต่ละชนิดกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานทางด้านซ้ายมือ



รูปที่ 7 รูปแบบ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลาในวงศ์ Bagridae ทั้ง 7 ชนิด จากการทำ PCR-SSR โดยใช้ไพรเมอร์ HB13 และ HB15 (Lane M: marker 100 bp ladder) ลูกศร แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับปลาแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอของปลาแต่ละชนิดกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานทางด้านซ้ายมือ