



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“การจำแนกพันธุกรรมระหว่างประชากรปลาบึก
(*Pangasianodon gigas* Chevey) จากบ่อเลี้ยง”

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. อำนวย จรด้วง และคณะ

ธันวาคม 2550

สัญญาเลขที่ RDG4720001



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการ
“การจำแนกพันธุกรรมระหว่างประชากรปลาบึก (*Pangasianodon gigas* Chevey)
จากบ่อเลี้ยง”

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. อำนวย จรด้วง

นายอักรพงษ์ สวัสดิพงษ์

นายวิกรม รังสินธุ์

นายเดชา รอดกระรัง

สำนักประสานงานวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมเกษตร ปิษและสัตว์น้ำ

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ กองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว.) ที่สนับสนุนทุนวิจัยโครงการวิจัยนี้ นอกจากนั้นคณะผู้วิจัยยังได้รับการเอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างปลาบึกที่อยู่ในความดูแลของท่าน คณะผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบคุณท่านทั้งหลายที่มีรายชื่อข้างล่างนี้อย่างสูง คือ

คุณรังสรรค์ ทรวงชมพันธุ์	ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดลพบุรี
คุณสมหวัง พิมลบุตร	ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสุพรรณบุรี
คุณศักดิ์สิทธิ์ วิบูลสุข	ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสระแก้ว
คุณเข้มชาติ จิวประสาท	หัวหน้าสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดเชียงราย
นายคทาวุฒิ ปานบุญ	สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดเชียงราย
คุณภาณุวัตร กมฺพชาติ	นักวิชาการ ว.6 ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดลพบุรี
ดร.จรัส ไชยองค์การ	จรัสฟาร์ม จังหวัดเชียงราย

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.อุไรวรรณ อรัญวาสี ในการช่วยเหลือการวิเคราะห์ข้อมูลประชากรทางสถิติ สุดท้ายคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เผด็จศักดิ์ จารยะพันธุ์ และเจ้าหน้าที่สำนักประสานงานวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมเกษตร พืชและสัตว์น้ำ สกว. ที่ได้ให้ความสะดวกในการดำเนินการต่าง ๆ ตลอดเวลาของโครงการ

สรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

1. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas*., was determined. Firstly, all fragments of mtDNA were cloned to get some basic nucleotide sequences. And then, a long polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify three DNA fragments covering entire mt-genome. The long PCR products were then used as template for primer-walking sequencing. The contiguous overlapping segments of three fragments were confirmed by sequencing of PCR products obtained by species-specific primers. Alignment and comparison of all data revealed that the 16,533 bp-genome contains 37 mitochondrial genes (13 protein-coding genes, 2-ribosomal RNA genes, 22 transfer RNA genes) and control region as found in other bony fish, but seem to be a unique as those found in other catfish.

2. By means of complete mitochondrial genome of Mekong giant catfish under accession number AY672971 of GenBank, one can design PCR-primer indefinitely. This project has designed 4 pairs of PCR primers for amplifying mtDNA-fragments of gene *ND2*, *ND3 – ND4*, *Cytochrome b* + control region and control region. The PCR products obtained were 1,376, 2,356, 2,263 and 1000 bp, respectively.

3. The genetic variation of 161 fish collected from 8 different locations and a wild group was determined by using *ND2*-RFLP data. It was found that the genetic variability within population is seemingly low and found only in three populations; Kalasin, Saraburi and wild group. The constructed phylogenetic tree showed that all fish derived from 4 maternal lineages.

4. The nucleotide sequences of control region in length of 899 bp of 131 fish were also determined and used to classify their haplotypes. Nucleotide sequences of 131 fish produced 48 haplotypes. Consideration to relationship among haplotypes, it was found that the highly distinct haplotypes were only six nucleotides differences. It was assumed that all fish were derived from two populations, have separated for a long time. The genetic variability was determined and found that the percentage of polymorphism is only 5 %, nucleotide diversity within populations ranged from 0.0032 to 0.0104. AMOVA hierarchical analysis based on nucleotide differences revealed significant variation among populations ($p > 0.05$). The phylogenetic analyses using neighbor-joining method revealed 3 major clades, which composed of many maternal lineages. Even though, the genetic diversity of giant catfish is very low, the suitable technique could be used to measure variation among populations which will be useful for sustainable management.

บทคัดย่อ

1. ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอปลาบึก (*Pangasianodon gigas* – mtDNA) ได้ถูกสกัดจากตับปลาบึก และนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MboI* และนำไปต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* หลังจากนั้น recombinant plasmid ถูกนำไปโคลนใน *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ภายหลังคัดเลือก โคลนที่ได้รับชิ้นส่วนสอดแทรกของ mtDNA จะถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ ลำดับดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ 3 คู่เพื่อทำ Long PCR สำหรับ Long PCR product ที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ ลำดับดีเอ็นเอ โดยอาศัย primer walking sequencing ผลปรากฏว่า Long PCR products ที่ได้ครอบคลุม mtDNA ทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดแล้ว พบว่า complete mitochondrial DNA genome ของปลาบึกยาว 16,533 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วยยีนต่าง ๆ ทั้งหมด 37 ยีน (คือ 13 protein coding genes, 2 ribosomal RNA genes, 22 tRNA genes) และ control region เหมือนกับที่พบในปลา กระดุกเข็งอื่น ๆ ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดถูกนำไปฝากไว้ที่ GenBank ภายใต้อccession number AY672971

2. จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอปลาบึก ภายใต้อccession number AY672971 สามารถนำไปออกแบบไพรเมอร์ได้อย่างไม่มีขีดจำกัด โครงการนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์ไว้แล้ว 4 คู่ สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีน *ND2*, *ND3-ND4*, *Cytochrome b* และ บริเวณ control region ซึ่งจะได้ออก PCR product ขนาด 1376, 2356, 2263, และ 1000 bp ตามลำดับ

3. เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนปลาบึก จำนวน 161 ตัว ที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ รวม 8 แหล่ง และปลาธรรมชาติอีก 1 กลุ่ม โดยอาศัยข้อมูล *ND2* – RFLP พบว่า ความแปรปรวนภายในประชากรต่ำ (gene diversity) มีค่าระหว่าง 0.00-0.198 ซึ่งพบเพียงใน 3 ประชากรเท่านั้น คือ ประชากรกาฬสินธุ์ สระบุรี และประชากรธรรมชาติ ไม่พบความแตกต่างระหว่างประชากรอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อสร้าง phylogenetic tree ระหว่างปลาทั้งหมดพบว่ามี 4 กลุ่ม หรือ 4 maternal lineages เท่านั้น กล่าวคือ อาจมีจุดกำเนิดตั้งต้นมาจากตัวเมียเพียง 4 ตัวเท่านั้น

4. เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนระหว่างประชากรโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ control region พบว่าปลา 131 ตัวนั้นสามารถแบ่งได้เป็น 48 haplotype ซึ่งเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype พบว่า haplotype ที่ห่างที่สุดถึง 6 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งคาดว่าปลาบึกทั้งหมดนี้น่าจะมาจากประชากรหลัก 2 ประชากรที่แยกกันมานานแล้ว เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนทั้งหมดพบ percentage of polymorphism จะมีค่าเท่ากับ 5.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ค่า nucleotide diversity พบว่าภายในประชากรมีค่าระหว่าง 0.0032-0.0104. และเมื่อทดสอบความแปรปรวนระหว่างประชากร (nucleotide divergence) พบว่าประชากรเหล่านี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อนำค่า nucleotide divergence ไปสร้าง Neighbor joining (NJ) phylogenetic tree พบว่าปลาทั้งหมดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลัก (major clade) ซึ่งมาจากหลายสายพันธุ์แม่ (maternal lineages) จากผลการวิเคราะห์ครั้งนี้

นี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้เทคนิคที่ละเอียดขึ้นเราก็สามารถวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปลาบึกได้กว้างขวางมากขึ้น ข้อมูลเหล่านี้น่าจะเป็นประโยชน์เพื่อการวางแผนการใช้ปลาบึกอย่างยั่งยืนได้

Abstract

1. The mitochondrial DNA (mtDNA) of a Mekong giant catfish was extracted from liver and digested with *MboI* and ligated with *BamHI* digested pUC18. The recombinant plasmids were transferred to *E. coli* strain JM109. The presumably inserted bacterial clones were screened and sent to sequencing unit. The nucleotide sequences of inserted mtDNA fragments were used to design 3 pairs of primers for long PCR. The long PCR-products were sequenced by primer walking technique. All nucleotide sequences of long PCR products obtained, covered entire mitochondrial genome of giant catfish. It was found that mitochondrial genome of giant catfish is composed of 16,533 bp, which contains 37 genes (13 proteins- coding genes, 2 ribosomal RNA genes, 22 tRNA genes) and control region as those found in other bony fishes.

2. By means of complete mitochondrial genome of Mekong giant catfish under accession number AY672971 of GenBank, one can design PCR-primer indefinitely. This project has designed 4 pairs of PCR primers of amplifying mtDNA-fragments of gene *ND2*, *ND3 – ND4*, *Cytochrome b* + control region and control region. The PCR products obtained were 1,376, 2,356, 2,263 and 1000 bp, respectively.

3. The genetic variation of all fish collected from 8 different locations and a wild group was determined by using *ND2*-RFLP data. It was found that the genetic variability within population is seemingly low and found only in three populations; Kalasin, Saraburi and wild group. The constructed phylogenetic tree showed that all fish derived from 4 maternal lineages.

4. The nucleotide sequences of control region (899 bp) of 131 fish were also determined and used to define their haplotypes. Nucleotide sequences of 131 fish produced 48 haplotypes. Consideration to relationship among haplotypes, it was found that the highly distinct haplotypes were only six nucleotides differences. It was assumed that all fish were derived from two populations. The genetic variability was determined and found that the percentage of polymorphism is only 5 % , nucleotide diversity within populations ranged from 0.0032 to 0.0104. AMOVA hierarchical analysis showed significant variation among populations ($p > 0.05$). The neighbor joining (NJ) phylogenetic tree, based on nucleotide divergence between haplotypes, revealed 3 major clades which derived from different maternal lineages. Even though the genetic diversity of giant catfish is very low, the suitable technique could be used to measure variation among populations which would be useful for sustainable management.

สารบัญ

	หน้า
1. บทนำ	1
2. การสำรวจแนวคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
3. วิธีการวิจัย	5
4. ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	18
5. ข้อเสนอสรุป	51
6. ข้อเสนอแนะ	55
บรรณานุกรม	56
ภาคผนวก	61

รายการตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 1 สถิติการจับปลาบึกได้ระหว่างปี 2529- 37 และ 2547-49 (น.สพ. สยามโพสท์ ประจำวันี่ 27 พฤษภาคม 2549)	1
ตารางที่ 2 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างปลาบึก สัญลักษณ์ที่ใช้ และ จำนวนปลา	6
ตารางที่ 3 แสดงผลการสำรวจเอนไซม์ตัดจำเพาะและตำแหน่งตัดในยีนเป้าหมายด้วย	14
ตารางที่ 4 Location of genes in the mitochondrial genome of Mekong giant catfish (<i>Pangasianodon gigas</i>)	24
ตารางที่ 5 ผลการตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณยีน ND2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดจึงจะให้ รูปแบบการตัดที่แตกต่างกัน	27
ตารางที่ 6 แสดงขนาด Random fragment length polymorphism patterns ที่ได้จากการตัด ด้วย restriction endonuclease 5 ชนิดของยีน ND2, ND3 – ND4 และ Cytb-CR	33
ตารางที่ 7 แสดง haplotype ของปลาบึกทั้งหมดซึ่งได้จากการตัดยีน ND2 ด้วย restriction enzyme ชนิดต่างๆ	34
ตารางที่ 8 Haplotype frequency distribution among the samples (ND2 RFLP)	35
ตารางที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างประชากรจาก haplotype frequency	35
ตารางที่ 10 Nucleotide divergence (Nei and Li, 1979) ระหว่าง composite haplotype	36
ตารางที่ 11 แสดงค่า gene diversity ภายในประชากร (ตามเส้นทแยงมุม) และ ค่า genetic difference ระหว่างประชากร(ใต้เส้นทแยงมุม)	36
ตารางที่ 12 ND3_ND4 haplotype	39
ตารางที่ 13 Cytb-CR haplotype	40
ตารางที่ 14 แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ใน control region ที่แปรปรวน(variable sites)	44
ตารางที่ 15 แสดงจำนวนปลาบึก(N) จากสถานที่ต่างๆ จำนวน haplotype (Nh) ค่า haplotype diversity (<i>h</i>) และ ค่า nucleotide diversity(π)	47
ตารางที่ 16 แสดง nucleotide diversity ภายในประชากร(ตามเส้นทแยงมุม) และ nucleotide difference ระหว่างประชากร (ด้านล่างเส้นทแยงมุม)	47
ตารางที่ 17 แสดงค่า Fst ผลการทดสอบความแตกต่าง ระหว่างประชากรจากความแตกต่าง นิวคลีโอไทด์ (nucleotide difference)	48
ตารางที่ 18 แสดงผลการวิเคราะห์ AMOVA ความแปรปรวนระหว่างประชากรต่างๆจาก nucleotide diversity	48
ตารางที่ 19 Haplotype frequency distribution among the samples	49

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1. แสดงแผนผังไมโทคอนเดรียปลาบึกซึ่งและยีนต่างๆทั้งหมด โดยได้ระบุตำแหน่งของไพรเมอร์เพื่อเพิ่ม fragment A, B และ C และรวมทั้งตำแหน่งไพรเมอร์ของ overlapping fragment AB, BC และ CA ทั้ง 3 คู่	11
รูปที่ 2 (a) แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัด mtDNA ของปลาบึกด้วยเอนไซม์ <i>MboI</i> โดยแสดง DNA marker 1 kb ladder (M) และ แถบ mtDNA ของปลาบึกที่ถูกตัดแล้ว (mt) (b) แสดงขนาดของ plasmid ที่แยกสกัดได้จากโคลนต่างๆ เปรียบเทียบกับ plasmid pUC18 โดยแสดง DNA marker 1 kb ladder (M), pPGmt43 (a), pPGmt50 (b), pPGmt81 (c), pPGmt12 (d), pPGmt79 (e), pPGmt66(f), pPGmt78 (g), pPGmt40 (h), pPGmt03 (i), pPGmt37 (j), pPGmt86 (k), pPGmt70 (l), pPGmt83 (m), pPGmt58 (n), และ pPGmt87(o)	19
รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน pPGmt03, pPGmt37 และ pPGmt40 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำปฏิกิริยา Long PCR เมื่อเทียบเคียงจากไมโทคอนเดรียจีโนมของปลาส่วนใหญ่	20
รูปที่ 4 แสดงแถบ PCR product ที่ได้จากการทำ Long PCR เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA Marker	21
รูปที่ 5. แผนผัง แสดง mitochondrial genome ของปลาบึก	23
รูปที่ 6 ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน <i>ND2</i> , <i>ND3-ND4</i> และบริเวณรวม <i>Cyt b</i> และ control region (CR) เมื่อใช้ไพรเมอร์ P13 - P14, P15 - P16 และ P17 - P18	25
รูปที่ 7 ผลจากการใช้ไพรเมอร์คู่ P19 – P20 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ผลปรากฏว่าไม่มี non-specific band (รูปที่ 7ข) เหมือนรูปที่ 7 (ก)	26
รูปที่ 8 แสดงการตัดดีเอ็นเอของยีน <i>ND2</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ก) <i>DraI</i> ซึ่งตัดได้ 2 ขนาด คือ 825 bp และ 551 bp, (ข) <i>HhaI</i> ซึ่งตัดได้ 2 ขนาดคือ 1,024 bp และ 352 bp, และ (ค) <i>XbaI</i> ซึ่งตัดได้ 2 ขนาดคือ 1,208 bp และ 168 bp, แต่ละเอนไซม์บ่มนาน 18 ชั่วโมง ที่ 37°C แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอได้จากการตัดด้วย 2% agarose gel electrophoresis	28
รูปที่ 9 แสดงผลการตัดชิ้นดีเอ็นเอยีน <i>ND2</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ประกอบด้วย เอนไซม์ <i>HaeIII</i> , <i>TruII</i> , <i>AciI</i> , <i>DpnII</i> และ <i>TasI</i>	29
รูปที่ 10 แสดงผลการตัดชิ้นดีเอ็นเอยีน <i>ND3 – ND4</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ประกอบด้วยเอนไซม์ <i>AciI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>RsaI</i> , <i>TasI</i> และ <i>TruII</i>	30

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 11 แสดงผลการตัดดีเอ็นเอของยีน <i>Cytb</i> และ control region ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ประกอบด้วยเอนไซม์ <i>DpnII</i> , <i>HaeIII</i> , <i>AluI</i> , <i>RsaI</i> และ <i>TaqI</i>	31
รูปที่ 12 NJ tree คำนวณ genetic distance ด้วย Nei and Li (1979) ค่าเฉลี่ย genetic distance ของตัวอย่างทั้งหมด 163 เท่ากับ 0.00607	37
รูปที่ 13 Parsimony tree จาก <i>ND2</i> RFLP	38
รูปที่ 14 แสดง bubble spanning network ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype ต่าง ๆ โดยเส้นตัดขวางบนเส้นเชื่อมแสดงถึงจำนวน nucleotide substitution ที่แตกต่างกันระหว่าง plotype ที่เชื่อมโยงกัน	46
รูปที่ 15 Neighbor-joining tree ประเมินการจากค่า nucleotide divergence ของ mt-haplotype ที่รวบรวมได้จากแหล่งต่างๆทั้งหมด จำนวน 131 ตัว	50

1. บทนำ

ปลาบึก (*Pangasianodon gigas* Chevey) เป็นปลาน้ำจืดชนิดไม่มีเกล็ดที่ใหญ่ที่สุดในโลก มีชื่อสามัญว่า “Mekong giant catfish” หรือ “huge fish” มีขนาดโตเต็มที่มีความยาวประมาณ 3 เมตร หรือน้ำหนักตัวอาจถึง 250 – 300 กิโลกรัม (เสนห์, 2526) เป็นปลาน้ำจืดที่แพร่กระจายในกลุ่มแม่น้ำโขงและลุ่มน้ำสาขา เช่น แม่น้ำมูล แม่น้ำมหาสารคาม และแม่น้ำสงคราม (Hogan *et al.* 2004) เนื่องจากปลาบึกเป็นปลาที่มีเนื้อรสชาติดีเป็นที่นิยมของประชาชน จึงก่อให้เกิดการจับเป็นจำนวนมาก (กรมประมง, 2527) จึงมีจำนวนการจับลดลงอย่างรุนแรง ถ้าดูข้อมูลการจับได้ของปลาบึกที่บริเวณหาดไคร้ จ.เชียงราย ตั้งแต่ปี พ.ศ.2529 – 2537 (ตารางที่ 1) จะเห็นได้ว่าจำนวนการจับได้ลดลงอย่างรุนแรงซึ่งเป็นเหตุให้ปลาบึกถูกจัดว่าเป็นปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ หรือ critically endangered species (CITES, 2005)

ตารางที่ 1 สถิติการจับปลาบึกได้ระหว่างปี พ.ศ.2529- 37 และ พ.ศ. 2547-49 (นสพ. สยามโพสต์ ประจำวันที่ 27 พฤษภาคม 2549)

ปี พ.ศ.	จำนวนปลาที่จับได้(ตัว)	แหล่งที่มาของปลา			เพศ		หมายเหตุ
		ชมรม	ลาว	อื่นๆ	ผู้	เมีย	
2529	18	18	-	-	12	6	
2530	24	24	-	-	16	8	
2531	42	42	-	-	27	15	
2532	60	59	1	-	44	16	
2533	69	51	11	7	40	22	
2534	31	22	8	1	12	18	
2535	35	26	8	1	18	16	
2536	48	30	18	-	25	23	
2537	18	15	3	-	-	-	
2547	6	6	-	-	?	?	บันทึกจากข้อมูล
2548	3	2	1	-	?	?	ส่วนตัวที่ได้รับ
2549	1	1	-	-	?	?	ทราบจากข่าว

ด้วยเหตุผลความสำคัญของปลาบึก กรมประมงจึงได้ทำการศึกษาชีวประวัติ ทดลองเลี้ยงในบ่อ และประสบความสำเร็จในการผสมเทียมปลาบึกในปี พ.ศ.2526 (เสนห์, 2526) โดยได้ผสมเทียมปลาบึกพ่อแม่พันธุ์ที่จับได้จากแม่น้ำโขงและดำเนินการมาเรื่อย ๆ ตั้งแต่ปี พ.ศ.2526 ถึงปี พ.ศ.2542 ได้ลูกปลา

บึกเพื่อทำการเพาะเลี้ยงประมาณ 3 ล้านตัว และกรมประมงได้ส่งไปเลี้ยงตามสถานีประมงต่าง ๆ แหล่งน้ำธรรมชาติ และบ่อเลี้ยงของเอกชน ขณะนี้เวลาล่วงเลยมาแล้วประมาณ 20 ปีแล้วซึ่งปลาบึกเหล่านี้ (ถ้ายังมีชีวิตอยู่) ก็น่าจะเป็นพ่อแม่พันธุ์ได้แล้ว ทรัพยากรปลาบึกเหล่านี้เป็นทรัพยากรปลาบึกที่มีคุณค่ายิ่ง เพราะอาจใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ผลิตลูกเพื่อการเพาะเลี้ยงในอนาคตหรือผลิตลูกปลาปล่อยสู่แม่น้ำโขงตามธรรมชาติ การจัดการทรัพยากรเหล่านี้เพื่อการใช้อย่างยั่งยืนในอนาคต มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องรู้ข้อมูลทางชีววิทยาและพันธุกรรม ของปลาบึกที่มีอยู่ตามแหล่งเลี้ยงต่าง ๆ ที่จัดการได้ เพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนการผสมพันธุ์ในอนาคต และจัดการพันธุกรรมปลาบึกได้อย่างยั่งยืน

สำหรับปลาบึกเป็นปลาซึ่งเป็น endemic species พบเฉพาะในบริเวณลุ่มแม่น้ำโขงและแม่น้ำสาขาคือ ข้อมูลทางพันธุกรรมของปลาบึกที่ใช้เพื่อการจัดการทรัพยากรยังไม่มีเลย คือ ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ประชากรเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญ ในการศึกษาต้องใช้เครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) ที่เป็น nuclear DNA หรือ mtDNA ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 2 ชนิดก็ยังไม่ มี ดังนั้น ในการศึกษาจึงต้องพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมขึ้นมาก่อน โครงการวิจัยนี้ต้องการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด mtDNA markers ขึ้นมาก่อน ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์ดังต่อไปนี้

1. เพื่อการโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอทั้งหมดของปลาบึก
2. เพื่อพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะสำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณ (mtDNA fragment) หรือ mtDNA marker ของปลาบึกซึ่งมีความยาวมากกว่า 1 ยีน
3. เพื่อการจำแนกสตั๊กปลาบึกจากแหล่งเลี้ยงต่างๆ ด้วยการวิเคราะห์ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่เพิ่มปริมาณได้
4. เพื่อการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมปลาบึกที่ไม่ทราบประวัติตามแหล่งเลี้ยงต่างๆ ตามรูปแบบของ haplotype โดยอาศัยข้อมูลปลาที่ทราบประวัติแล้ว

2. การสำรวจแนวคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จุดประสงค์เบื้องต้นของการจัดการทางประมง (fishery management) คือการสอบสวนให้ทราบข้อมูลรายละเอียดของแหล่งพันธุ์ หรือ สต็อก (stock) ของปลาหรือสัตว์น้ำที่มีอยู่และสอบสวนให้ทราบว่าแหล่งพันธุ์เหล่านี้มีปฏิสัมพันธ์กับแหล่งพันธุ์และสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ อย่างไร (Ferris and Berg, 1987) ดังนั้นผู้จัดการทางประมงต้องดำเนินการศึกษาข้อมูลเบื้องต้น คือ ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรปลา กลุ่มหรือฝูง หรือ stock ของปลาชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ เพื่อที่ผ่านมาการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น ความแปรปรวนของอัลโลไซม์ (allozyme variation) ได้จากการวิเคราะห์ protein electrophoresis เช่นกรณี ในปลาแซลมอน (*Oncorhynchus* sp.) (Beacham *et al.*, 1995; Bartley and Gall, 1990) แต่วิธีการที่กล่าวแล้วนี้ต้องใช้เนื้อเยื่อที่มีความสดและคุณภาพสูง แต่ถึงแม้กระนั้นยังให้ผลที่คุณภาพต่ำ บางครั้งก็ให้ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ต่ำมาก เช่น ในปลา Tilapia (Cruz *et al.*, 1982)

ความก้าวหน้าทางเทคนิคชีววิทยาโมเลกุลตั้งแต่ปี ค.ศ.1980 เป็นต้นมา (Halliburton, 2004) เปิดโอกาสให้เราสามารถวิเคราะห์โมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA molecule) โดยตรงเพื่อวัดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปลา โดยวัดความแปรปรวนของลำดับดีเอ็นเอ ซึ่งอาจใช้การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอโดยตรง (direct DNA sequencing) หรือ วิธีการโดยอ้อม ซึ่งทางด้านการประมงเครื่องหมายทางพันธุกรรม (DNA marker) ที่ใช้มีอยู่หลายชนิด เช่น mitochondrial RFLP จาก mtDNA , genomic RFLP หรือ genomic oligonucleotide polymorphism จาก nuclear genome และเทคนิคอื่น ๆ (Hallerman and Beckmann, 1988)

ในช่วงแรกๆ การวิเคราะห์ ความแปรปรวนของดีเอ็นเอ (DNA variation) ได้เน้นไปที่ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA-mtDNA) เพื่อใช้วิเคราะห์ประชากรธรรมชาติ (Avisé, 1994) ทั้งนี้เพราะสามารถสกัด intact mtDNA ได้จากตับสด หรือ เนื้อเยื่ออื่นๆ ข้อดีของ mtDNA คือ เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก ถ่ายทอดผ่านทางแม่ (maternal inheritance) ไม่มีการรวมใหม่ (recombination) และมีอัตราการกลายพันธุ์เร็วกว่า nuclear gene ถึง 5 – 10 เท่า ดังนั้น การวิเคราะห์ mtDNA ช่วยให้เราสามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างชนิดและเพื่อการจำแนกสปีชีส์ได้ (Meyer, 1993 ; Ferris and Berg, 1998) การศึกษาช่วงต้นมักใช้ mtDNA ทั้งโมเลกุลมาใช้ศึกษา RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) อย่างกรณีในกลุ่มปลาแซลมอน (Berg and Ferris, 1984; Ginatulina, 1992; Carney *et al.*, 1997) ปลาเทราท์ (Palva and Palva, 1987; Overden *et al.*, 1993; Bembo *et al.*, 1994; Jones *et al.* 1996) ปลาคอด (Dahle, 1991) และปลาอื่นๆ เช่น ปลา common snook (*Antropomus undecimalis*) และ ปลาฉลาม (Shortfin mako, *Isurus oxyrinchus*) ซึ่งจากรายงานเหล่านี้พอจะสรุปได้ว่าความแปรปรวนในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial variation) โดยศึกษาจาก RFLP สามารถนำมาใช้ในการจำแนกกลุ่มหรือประชากรของปลาชนิดต่างๆ ได้ แต่การสกัด mtDNA

ต้องใช้เนื้อเยื่อสด คือ หัวใจ ตับ ไต และม้าม ซึ่งจะต้องฆ่าปลาตัวอย่าง ฆ่าใหม่ ๆ และวิธีการสกัดต้องใช้วิธี cesium chloride density gradient centrifugation ซึ่งเป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยากและเสียเวลามาก

แต่ภายหลังการพัฒนาการ polymerase chain reaction (PCR – Saiki *et al.*, 1998) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวนี้ช่วยให้การวิเคราะห์ mtDNA ได้ง่ายและสะดวกมากขึ้น ชิ้นส่วน specific mtDNA fragment อาจถูกเพิ่มปริมาณขึ้นโดยใช้ conserved primers (Kocher *et al.*, 1998) แต่ต้องอาศัยข้อมูล mtDNA ของสัตว์อื่นชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ก่อนแล้ว เพื่อนำเอาส่วนที่เป็น conserved sequences มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ แต่ข้อดีอีกประการหนึ่งคือ DNA template (mtDNA) ที่ใช้ไม่จำเป็นต้องได้จากเนื้อเยื่อสดอย่างกรณีสกัด mtDNA ทั้งโมเลกุล ซึ่งชิ้นส่วน mtDNA ที่เพิ่มปริมาณได้อาจนำไปวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอโดยตรง (direct DNA sequencing) (Fuji and Nishida, 1997; Gleeson *et al.*, 1999; Hoolihan *et al.*, 2006) หรือ RFLP analysis (Cronin *et al.*, 1993; Adam *et al.*, 1994; Carney *et al.* 1997)

การใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนจำเพาะในส่วน mtDNA สิ่งสำคัญคือ DNA template ซึ่งเป็น mtDNA และข้อมูลบางส่วนใน mtDNA เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ส่วน DNA template ส่วนใหญ่สกัดจาก total genomic DNA โดยใช้เนื้อเยื่อสดเช่นส่วนหัวใจ ตับ กล้ามเนื้อ ครีบกาว (Adams *et al.*, 1994; Tabata and Mizuta, 1997) ไข่ปลา (Withmore *et al.*, 1994) เนื้อเยื่อหุ้มเกล็ด (Whitmore *et al.*, 1992) ครีบกาว (Kochzids and Blohm, 2005) และเมื่อเร็ว ๆ นี้เอง มีการใช้เลือดปลา (Gleeson *et al.*, 1999) ข้อดีคือใช้เนื้อเยื่อปริมาณน้อย และบางครั้งไม่จำเป็นต้องฆ่าปลาตัวอย่าง ในกรณีของ endangered species ส่วนไพรเมอร์นั้นมักจะใช้ข้อมูล mtDNA sequences ของชนิดใกล้เคียงมาใช้ในการออกแบบ conserved primer (Kocher *et al.*, 1989) แต่ในกรณีที่ยังไม่มีข้อมูล mtDNA ของชนิดนั้นโดยตรง ก็ต้องพัฒนาข้อมูลเฉพาะชนิดนั้นขึ้นมาเอง ซึ่งมีรายงานการศึกษาอยู่มากมาย

สำหรับกรณีการศึกษาความแปรปรวนในชิ้นส่วน mtDNA บางส่วน โดยใช้ข้อมูลที่มีอยู่แล้วมาออกแบบไพรเมอร์ บางครั้งประสบปัญหา PCR product ที่ได้มีความแปรปรวนไม่มากพอที่จะตรวจสอบความแปรปรวนระหว่างประชากรได้ (Inoue *et al.*, 2000) หนทางแก้ที่ดีที่สุด ศึกษา complete mitochondrial genome ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ สำหรับ complete mtDNA genome ของปลาในแต่ช่วงแรกจะมีอยู่อย่างจำกัด เช่น loach (Tzeng *et al.*, 1992) ปลา carp (Chang *et al.*, 1994) ปลา trout (Zardoya *et al.*, 1995) ปลา cod (Johansen and Bakke, 1996) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเป็นปลามีเกล็ด สำหรับของปลาไม่มีเกล็ดหรือปลามีหนวด(catfish)มีเพียง 2 ชนิด คือ channel catfish (Waldbieser *et al.*, 2003) และปลากด (Pseudobagrus tokiensis , Saitoh *et al.*, 2003) สำหรับปลาบึกเป็นปลาที่เป็น endemic species พบเฉพาะในบริเวณลุ่มแม่น้ำโขงและแม่น้ำสาขาลำคั้งบิวโอไคต์ใน mtDNA ยังไม่มี ดังนั้นการจะใช้ข้อมูล mtDNA เป็นเครื่องมือในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรหรือความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกระทำการไม่สะดวกมากนัก ดังนั้นควรมีข้อมูลสมบูรณ์เบื้องต้น (complete mtDNA) ของปลาบึกเป็นการเฉพาะก่อน ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์ดังกล่าวไว้แล้ว

3. วิธีการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง Sigma 3K20
2. Thermal Cycler, Perkin Elmer GeneAmp[®] System 9600
3. Test tube heater, SHT Stuart Scientific
4. Vortex Genie
5. Horizontal electrophoresis apparatus
6. PCR Cabinet
7. Micropipette
8. Image documentation.UVP BioDoc-It TM System
9. Automated DNA Sequencer
10. Eppendorf tube, PCR tube and Tips
11. Computer program, “Oligo 1999-2002 v.9.11.4”

3.2 ชุดสกัดและสารเคมีต่างๆ

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอ, QIAamp[®] DNA Mini Kit(QIAGEN ,Germany)
2. ชุดทำบริสุทธิ์ PCR, QIAquick[®] PCR Purification Kit
3. High Fidelity PCR Enzyme Mix(Fermentas ,USA)
4. dNTP
5. Primers (KU-Vector)
6. สารเคมีเพื่อการเตรียมบัฟเฟอร์และสารละลายต่างๆ

3.3 ปลาบึกที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 ดับและเนื้อเยื่อปลาบึก ประมาณ 200 กรัม

3.3.2 การเก็บตัวอย่างปลาบึกจากแหล่งเลี้ยงและแยกสกัดดีเอ็นเอ ได้เดินทางไปเก็บตัวอย่างปลาบึกที่สถานีประมงน้ำจืดกาฬสินธุ์ ได้ตัวอย่างทั้งหมด 57 ตัว ซึ่งปลาบึกจากสถานีนี้ไม่มีการฝังไมโครชิพ ทั้งนี้เพราะสถานีประมงได้ฝังไมโครชิพไว้แล้ว จึงเพียงอ่านรหัสแล้วบันทึกข้อมูล

ส่วนที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดอุดรธานีมีปลาบึกขนาดค่อนข้างเล็ก ขนาดประมาณ 6-8 กิโลกรัม ได้เก็บตัวอย่างและฝังไมโครชิพให้กับทางสถานีจำนวน 20 ตัว

สำหรับที่ศูนย์วิจัยและทดสอบพันธุ์ปทุมธานีได้เก็บตัวอย่างและฝังไมโครชิฟปลาบึกไว้ 30 ตัว แต่เป็นปลาขนาดประมาณ 3-5 กิโลกรัม ซึ่งข้อมูลเบื้องต้น เป็นปลาที่ได้รับจากกรมประมงในปี พ.ศ.2538 แต่ไม่มีประวัติอย่างใดเลย

ส่วนฟาร์มปลาเอกชน ได้ไปเก็บตัวอย่างปลาบึกที่ฟาร์มเอกชนในจังหวัดลพบุรี สถานีประมงสระแก้ว และฟาร์มเอกชนเชียงรายได้ปลาบึกทั้งหมด 14 ตัว 27 ตัว และ 20 ตัว ตามลำดับ แต่ในฟาร์มเหล่านี้ไม่มีการฝังไมโครชิฟ (ยกเว้นฟาร์มเอกชน คือ จรัลฟาร์ม จากเชียงราย) ทั้งนี้เพราะเจ้าของฟาร์มไม่ต้องการและไม่อาจะรับประกันได้ว่าปลาเหล่านี้เมื่อไร จึงเกิดความไม่มั่นใจว่าจะกลับคืนไปเก็บตัวอย่างซ้ำได้หรือไม่ ถ้าตัวอย่างที่เก็บได้ไม่ดีพอ สถานที่เก็บและจำนวนตัวอย่างปลาแสดงไว้ใน ตารางที่ 2

การเก็บตัวอย่างปลาบึกครั้งนี้ได้เก็บเนื้อเยื่อบริเวณปลายครีบไขมันหรือปลายครีบหางขนาดประมาณ 0.5 ซม. ซึ่งทำให้ปลาได้รับบาดเจ็บเพียงเล็กน้อย แต่ก่อนปล่อยลงน้ำก็ได้ทายาฆ่าเชื้อที่รอยแผล ส่วนครีบปลาที่ตัดแล้วก็นำไปแช่น้ำแข็งและนำเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปแยกสกัดดีเอ็นเอ

นอกจากนั้นในปี พ.ศ. 2548 เมื่อได้ทราบว่ามีการจับปลาบึกธรรมชาติได้ที่บริเวณหาดไคร้ อำเภอยางชุมน้อย จังหวัดศรีสะเกษ จึงได้เดินทางไปเก็บตัวอย่างส่วนกล้ามเนื้อปลาบึกธรรมชาติได้ทั้ง 3 ตัว

ตัวอย่างปลาบึกทั้งหมดนำมาเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (-20C) ที่ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างปลาบึก สัญลักษณ์ที่ใช้ และ จำนวนปลา

สถานที่เก็บตัวอย่าง	สัญลักษณ์ที่ใช้	จำนวนปลา(ตัว)
1. สถานีประมงกาฬสินธุ์	E	57
2. สถานีประมงเชียงราย	CS	50
3. สถานีประมงสระแก้ว	SK	27
4. ศูนย์วิจัยประมงแห่งชาติ (NIFI)	AY	30
5. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดอุดรธานี	US	20
6. ศูนย์พัฒนาและทดสอบพันธุ์ประมงบุรีรัมย์	BR	30
7. จรัลฟาร์ม เชียงราย	CS	20
8. ฟาร์มปลาเอกชนในลพบุรีและสิงห์บุรี	LRL,LRD, SB	65
9. ปลาบึกธรรมชาติ	WG หรือ CR4801-4803	3

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอทั้งหมดของปลาบึก

เพื่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอทั้งหมดของปลาบึก ต้องดำเนินการปฏิบัติการวิจัย 3 ขั้นตอน คือ

1. การแยกสกัดและการโคลนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอจากตับของปลาบึก
2. การออกแบบไพรเมอร์และการทำ Long PCR
3. การส่ง PCR product ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีวิธีการวิจัยดังต่อไปนี้

3.4.1.1 การแยกสกัดและการโคลนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

การสกัดไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอใช้วิธีการสกัดตามรายงานของ Sangthong and Jondeung (2003) โดยใช้ตับปลาบึกหนักประมาณ 5 กรัม บดในสารละลายบัฟเฟอร์ TEK (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 15% KCL, pH 7.5) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสแตกต่างกันเป็นสองชั้นโดยใช้สารละลาย 15% sucrose-TEK ผลจากการปั่นเหวี่ยงจะได้ mitochondria pellet และหลังจากนั้นทำให้ pellet ที่ได้แตกออกด้วยสารละลาย 18% SDS ซึ่งจะได้ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอที่ได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วย phenol-chloroform ตกตะกอนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วด้วย ethanol แล้วละลายใน TE buffer ปริมาตร 50 μ l เติมสารละลายเอนไซม์ RNase A บ่มข้ามคืนที่ 37 °C แล้วเก็บที่ -20°C เพื่อใช้สำหรับดำเนินการวิจัยในขั้นต่อไป

3.4.1.2 การโคลน mtDNA ปลาบึกโดยใช้ดีเอ็นเอพาหะ pUC18

ตัด mtDNA ปลาบึก (ความเข้มข้น 1.75 μ g/ μ l) ปริมาตร 10 μ l ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo* I และตัดพลาสมิด pUC18 (ความเข้มข้น 500 μ g/ μ l) ปริมาตร 2 μ l ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI โดยเตรียมให้ทั้งสองปฏิกิริยามีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 μ l จากนั้นจึงเชื่อมต่อดีเอ็นเอทั้งสองชนิดที่ตัดแล้วเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) ระหว่าง mtDNA และ pUC18 โดยนำ mtDNA ที่ตัดแล้วปริมาตร 2 μ l และ pUC18 ที่ตัดแล้ว 3 μ l ผสมรวมกันในหลอดขนาด 1.5 μ l และเติมสารละลาย T_4 DNA ligase buffer (10X) ปริมาตร 2 μ l เติม 5 mM ATP 1 μ l และ เอนไซม์ T_4 DNA ligase (6,000 Weiss unit/ml) 1 μ l ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง สุดท้ายจะได้ดีเอ็นเอสายผสมระหว่าง mtDNA ปลาบึกกับ pUC18

ดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จะถูกถ่ายฝากเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 ที่ผ่านการเตรียมให้เป็นคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell) ด้วยวิธีการถ่ายฝากแบบ heat shock โดยการนำดีเอ็นเอสายผสม ปริมาตร 10 μ l ผสมกับคอมพีเทนต์เซลล์ปริมาตร 50 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วแช่น้ำแข็งไว้ 30 นาที แล้วนำไปผ่านความร้อน 42 องศาเซลเซียสทันที (heat shock) โดยบ่มไว้นาน 1 นาที 30 วินาที หลังจากนั้น

จะนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที จากนั้นเติมอาหารสูตร LB (บ่มให้มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 500 μL แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ในขณะที่บ่มเข้าเบาๆ

หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียที่ได้นำไปเกลี่ยให้ทั่วบนผิวอาหารแข็งสูตร LB ที่ใช้เป็น selective medium โดยในอาหารจะมียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, X-gal 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ และ IPTG 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

คัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มีสีขาวจาก selective medium มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนและสกัด พลาสมิด เพื่อตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่เปลี่ยนไปจากขนาดของ pUC 18 ปกติ เพื่อเตรียมสำหรับการนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นสอดแทรก

3.4.1.3 การออกแบบไพรเมอร์และการทำ Long PCR

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอปลาบึกที่ได้จากการโคลน pPGmt03, pPGmt 37, pPGmt 40, pPGmt 70 และ pPGmt 80 นำมาใช้เป็นข้อมูลเพื่อออกแบบไพรเมอร์เพื่อการทำ Long PCR โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ "Oligo v.9.11.4" ผลปรากฏว่าได้ไพรเมอร์เพื่อการดังกล่าวแล้วจำนวน 3 คู่คือ

คู่ที่ 1 P5 (H 1,472) 5'-CCGAACCTTAGTTATAGCTGGTTGC-3'

P6 (H 5,269) 5'-CCTAGCTGTAACTAGGAGTTTGT-3'

เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *16s rRNA* ถึงบริเวณกลุ่มยีน *tRNA* ที่เรียกว่า WANCY region ซึ่งจะได้ PCR product ยาวประมาณ 4 กิโลเบส PCR product ชิ้นนี้ให้ชื่อว่า "A- fragment"

คู่ที่ 2 P7 (H 5,243) 5'-CCTACAAACTCCTAGTTAACAGC-3'

P10(H 11,914) 5'-TGGTTCCTAAGACCAACGGATG-3'

เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากบริเวณ WANCY ถึงบริเวณยีน ND4 มีขนาด PCR product ประมาณ 6.2 กิโลเบส PCR product ชิ้นนี้ให้ชื่อว่า "B- fragment" และ

คู่ที่ 3 P8 (H 11,888) 5'-TAGTTCATCCGTTGGTCTTAGG-3'

P12(H 1,491) 5'-CCAGCTATAACTAAGTTCGGTAGG-3'

เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน ND4 ไปถึงยีน *16s rRNA* ซึ่งจะได้ PCR product ยาวประมาณ 6.0 กิโลเบส PCR product ชิ้นนี้ให้ชื่อว่า "C- fragment"

ถ้าเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมดก็เท่ากับเราสามารถเพิ่มปริมาณไมโทคอนเดรียจีโนมได้ทั้งหมด ประมาณ 16-17 kb

เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวข้างบนไปทดลองทำปฏิกิริยา Long PCR ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer thermal cycle model 9600 โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 30 รอบ สำหรับปฏิกิริยาปริมาตร 50 μL อันประกอบด้วย sterilized distilled water 30.5 μL , 10xLA PCR buffer II (Mg^{2+} Plus) (Takara Bio

Inc.), 2.5 mM dNTP mixture 8 μ l, 10 pmol Primer1 2 μ l, 10 pmol Primer2 2 μ l, DNA template 2 μ l และ 2.5 units/ μ l Takara LA taqTM 0.5 μ l โดยใช้ thermal cycle profile ดังนี้คือ

Initial denaturation	94 °C	1	min
Denaturation	94 °C	20	sec
Annealing	55 °C	30	sec
Elongation	68 °C	7	min
Final elongation	72 °C	10	min

3.4.1.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product

นำ fragment A, B และ C ซึ่งเป็น PCR product ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยวิธี Primer walking sequencing โดยใช้วิธี dye-labeled terminator sequencing ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (automatic DNA sequencer) ของบริษัท Applied Biosystem Model ABI 3100 และ ABI3730XL ซึ่งดำเนินการโดยหน่วยบริการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ (คือ BSU และ Macrogen Inc. KOREA)

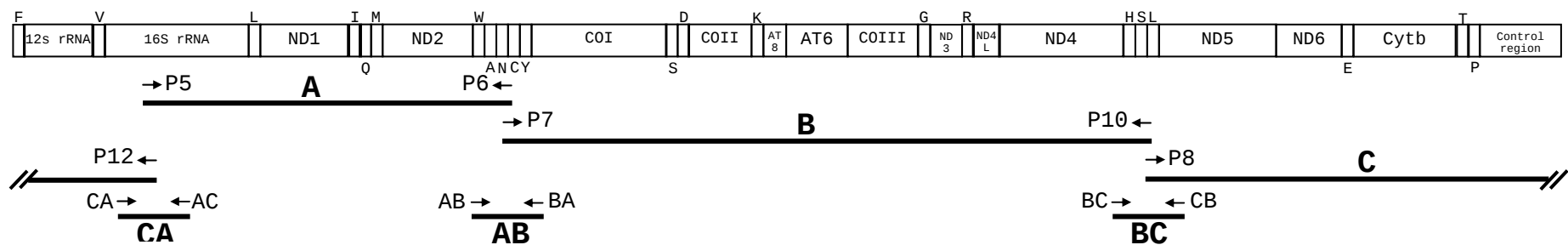
สำหรับวิธีการ Primer walking sequencing มีวิธีการโดยสรุปคือ นำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ครั้งแรก โดยการใช้ PCR primer จากปลายขวาและซ้าย เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ดังกล่าวไปออกแบบไพรเมอร์คู่ถัดไปเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่อยู่ลึกเข้าไปเรื่อยๆ ดำเนินการซ้ำๆ ไปจนกระทั่งลำดับนิวคลีโอไทด์จากปลายซ้ายและขวา ทับกันบริเวณส่วนกลางของชิ้นส่วนจึงยุติการวิเคราะห์ หลังจากนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนต่อของชิ้น A , B และ C ซึ่งเรียกว่า overlapping AB , -BC และ -CA หลังจากนั้นจึงสามารถสร้าง contig sequences ของ complete mitochondrial genome ของปลาบึก ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ได้แสดงไว้ข้างล่างนี้

AB	TAGGCACTTAGCGCCCTACT	Overlapping AB
BA	AGCGCGTGATCGTCACAGG	
BC	AGGATAATAGTTCATCCGTTGGTC	Overlapping BC
CB	TTGGCGGTCGGCTCGACC	
CA	GTACCGCAAGGGAACGCTG	Overlapping CA
AC	TGGCTGCTTTTAGGCCAC	

สำหรับอักษรย่อชื่อไพรเมอร์ที่เพื่อการวิเคราะห์ส่วนต่อเชื่อมนั้น บ่งถึงทิศทางและตำแหน่งของไพรเมอร์ เช่น AB เท่ากับไพรเมอร์อยู่บนชิ้น A วิ่งไปหาชิ้น B และ CA คือ ไพรเมอร์บนชิ้น C วิ่งไปหา

ชั้น A ส่วนไพรเมอร์อื่นๆเข้าใจได้ในทำนองเดียวกัน แผนผังแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ต่างๆได้แสดงไว้ใน รูปที่ 1

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดทั้งสายแล้ว จึงนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสอบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Clustal W (Thompson *et al.*,1994) เพื่อทราบว่าท่อนดีเอ็นเอที่เราได้ลำดับแล้วว่าเป็นส่วนของยีนอะไรในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอและสุดท้ายก็วิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ทั้งหมด โดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank



รูปที่ 1. แสดงแผนผังไมโทคอนเดรียปลาบึกซึ่งและยืนต่างๆทั้งหมด โดยได้ระบุตำแหน่งของไพรเมอร์เพื่อเพิ่ม fragment A, B และ C และรวมทั้งตำแหน่งไพรเมอร์ของ overlapping fragment AB, BC และ CA ทั้ง 3 คู่

3.4.2. การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณและการทดสอบประสิทธิภาพ

3.4.2.1 การแยกสกัดดีเอ็นเอ total DNA จากปลายครีบบลัดตัวอย่างเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) จะใช้ชุดสำเร็จ DNA purification kit (QIAampR Mini Kit, Qiagen, Germany) ซึ่งจะใช้เวลาเพียงเล็กน้อยและได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์สูง

3.4.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณ

ใช้ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของปลาบึก (AY762971) ซึ่งได้กำหนดขึ้นต่าง ๆ ทั้งหมดแล้ว จึงได้นำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ทางปลายขวาและซ้ายของยีนที่กำหนด คือ ยีน *ND2*, *ND3/ND4* และบริเวณ *Cytochrome b* + control region มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ 3 คู่ เพื่อใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 3 บริเวณ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ "Oligo v. 6.0"

ไพรเมอร์แต่ละคู่มีลำดับดังนี้ คือ

(ก) ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *ND2* คือ

P13(H 3,902); 5'-AAAGAAGGGACTCGAACCCAT-3'

P14(H 5,208); 5'-AATTAAAGTGTCTGGGTTGCATTC-3'

ซึ่งจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *ND2* และรวมส่วนปลายทั้งสองข้างยาวประมาณ 1,304 คู่เบส

(ข) ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *ND3/ND4* คือ

P15 (H 9,512); 5'-CACTTCGTAGACGTCGTGTGAT-3'

P16 (H 11,863); 5'-GCCATGGAGTTTAACCATGGG-3'

ซึ่งจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *ND3-ND4* และส่วนปลายทั้งสองข้างยาวประมาณ 2,352 คู่เบส

(ค) ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมยีน *Cytochrome b* และ control region คือ

P17 (H 14,232); 5'-CCCCAACCAAGCCCACC-3'

P18 (H 148); 5'-GGCATTCTCACAGGGATGCG-5'

ซึ่งจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่กล่าวแล้ว ยาวประมาณ 2,450 คู่เบส

เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองได้ผลตามที่คาดหมาย แต่เกิดปัญหากับกรณีไพรเมอร์คู่ที่ 3 ทั้งนี้เพราะเกิดการเพิ่มปริมาณ non-specific band ขึ้นมาด้วย ซึ่งเมื่อทำ optimization PCR condition มีผลเพียงลดความเข้มข้นของ non-specific band ให้จางลงไปได้บ้างแต่ไม่หมดไป จึงได้ออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณรวม *Cytochrome b* + control region คือ

P19 (H 14,312); 5'-ACTAATGACTTGAAAACCCACCG-3'

P20 (H 41); 5'-TAACATCTTCAGTGTTATGCTTTG-3'

ซึ่งควรเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 2,263 คู่เบส (ดังรูปที่ 2)

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีการ polymerase chain reaction (PCR) นั้นส่วนผสมขององค์ประกอบต่างๆ มีดังต่อไปนี้คือ

1. PCR buffer	5.0 μ l
2. 25 mM $MgCl_2$	5.0 μ l
3. 2.5 mM dNTPmix	4.0 μ l
4. Primer 1	2.0 μ l
5. Primer 2	2.0 μ l
6. High Fidelity Taq	0.5 μ l
7. DNA template	2.0 μ l
8. H_2O	<u>29.5</u> μ l
Total reaction	50.0 μ l

ซึ่งมี thermal profile ดังต่อไปนี้

Initial denaturation	94 °C	1 นาที
Denaturation	94 °C	20 วินาที
Annealing	54 °C	30 วินาที
Elongation	68 °C	2:45 นาที
และ Final elongation	68 °C	10 นาที

3.4.3 การคัดเลือกและสำรวจตำแหน่งตัด (restriction site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

3.4.3.1 การคัดเลือกเอนไซม์

จากการที่เรารู้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *ND2*, *ND3-ND4* และบริเวณยีน *Cytochrome b* + control region จึงนำเอาลำดับของทั้ง 3 บริเวณไปวิเคราะห์ตำแหน่งตัด (restriction site) ของเอนไซม์ restriction endonuclease ชนิดต่าง ๆ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์จาก <http://seqtool.sdsc.edu/cgi/bwgc> และ <http://searchluncher.bcm.tmc.edu/cgi/seq-util.pl> สุดท้ายคอมพิวเตอร์จะรายงานออกมาเป็นรายชื่อเอนไซม์และจำนวนชิ้น (fragment) ที่คาดว่าจะตัดได้ จึงดำเนินการทดลองใช้เอนไซม์ โดยพิจารณาจากประเภทของเอนไซม์ว่าเป็น 4-cutter หรือ 6-cutter จำนวนและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้เพราะจะส่งผลต่อวิธีการตรวจสอบภายหลังการตัด สำหรับเอนไซม์ที่คัดเลือกไว้สำหรับตัดยีนเป้าหมายมีดังนี้ ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผลการสำรวจเอนไซม์ตัดจำเพาะและตำแหน่งตัดในยีนเป้าหมายด้วย

ยีนเป้าหมาย	เอนไซม์ตัดจำเพาะ	วิธีการตรวจสอบ		จำนวนชิ้นที่คาดว่าจะได้	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (bp)
		Agarose gel	PAGE		
ND2 (1,376 bp)	<i>DraI</i>	✓		2	551, 625
	<i>HhaI</i>	✓		2	352, 1024
	<i>XbaI</i>	✓		2	168, 1,208
	<i>AciI</i>		✓	5	165, 225, 246, 365, 375
	<i>HaeIII</i>		✓	8	10, 54, 52, 111, 127, 267, 285, 240
ND3 - ND4 (2,352 bp)	<i>TruII</i>		✓	11	4, 10, 24, 38, 39, 49, 83, 139, 147, 403, 440
	<i>DpnII</i>		✓	7	4, 42, 63, 94, 195, 213, 765
	<i>TasI</i>		✓	8	41, 53, 94, 108, 132, 231, 259, 458
	<i>AciI</i>		✓	11	4, 9, 77, 78, 104, 120, 237, 299, 393, 407, 624
	<i>DpnII</i>		✓	7	37, 101, 138, 268, 345, 345, 1118
	<i>HaeIII</i>		✓	10	27, 31, 50, 51, 141, 206, 217, 316, 406, 907
	<i>RsaI</i>		✓	7	29, 83, 86, 372, 489, 561, 732
	<i>TasI</i>		✓	12	15, 18, 21, 24, 35, 36, 42, 66, 78, 90, 108, 207
	<i>TruII</i>		✓	14	12, 19, 26, 37, 39, 51, 66, 113, 119, 214, 384, 414, 421, 437
Cytb - CR (3,263 bp)	<i>AluI</i>		✓	9	9, 13, 31, 102, 154, 282, 496, 543, 633
	<i>DpnI</i>		✓	5	141, 175, 340, 713, 894
	<i>HaeIII</i>		✓	5	203, 222, 248, 441, 1,141
	<i>RsaI</i>		✓	15	20, 24, 25, 34, 44, 64, 105, 108, 170, 197, 204, 245, 254, 380, 386
	<i>TaqI</i>		✓	5	98, 111, 159, 923, 972

และจะใช้เอนไซม์เหล่านี้มาทดลองตัด PCR product ของทั้ง 3 ชิ้น

3.4.3.2 การทดลองหาสภาวะเหมาะสม (optimal condition) และการทดลองตัดชิ้นดีเอ็นเอ เป้าหมาย

ทั้งนี้เพราะว่าเอนไซม์แต่ละชนิดมีบัฟเฟอร์และองค์ประกอบอื่นๆที่ใช้ รวมทั้งระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้บ่มแตกต่างกัน จึงต้องหาสภาวะเหมาะสมสูงสุดของเอนไซม์แต่ละชนิด จึงนำเอนไซม์ที่คัดเลือกไว้มาทดลองหาสภาวะเหมาะสม (optimal condition) สำหรับการตัดชิ้นดีเอ็นเอในเป้าหมาย คือ *ND2*, *ND3-ND4* และ *Cytb-CR* ซึ่งมีขนาด 1,376 คู่เบส , 2,352 คู่เบส , และ 2,263 คู่เบส ตามลำดับ และทดสอบผลการตัดว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอตามที่โปรแกรมคอมพิวเตอร์แสดงไว้หรือไม่

3.4.3.3 การทดลองจำแนก haplotype ของปลาบึกจากประชากรกฟสนธิ์และอุดรธานี

เมื่อใช้เอนไซม์ *DraI*, *HindIII* และ *XbaI* ตัด PCR product ที่ได้จากตัวอย่างปลาบึกจากสถานีวิจัยประมงกฟสนธิ์จำนวน 15 ตัว และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดอุดรธานีจำนวน 12 ตัว ผลปรากฏว่าปลาจากกฟสนธิ์และอุดรธานีให้ผลทาง haplotype เหมือนกัน ไม่มีปลาตัวใดให้ haplotype ที่แตกต่าง (รูปที่ 4.7a , b และ c) เมื่อนำจำนวนตำแหน่งตัดรวมทั้ง 3 เอนไซม์แล้วเท่ากับ 3 ตำแหน่ง ซึ่งโดยทฤษฎีแล้ว การวิเคราะห์ RFLP ก็เพื่อให้ทราบว่าเบสในตำแหน่งตัดจำเพาะ (restriction site) มีการเปลี่ยนแปลงหรือเกิดการกลายพันธุ์หรือไม่ กล่าวคือ ถ้าเบสตัวใดตัวหนึ่งเปลี่ยนไปเอนไซม์ก็จะตัดไม่ได้ แต่จากการใช้เอนไซม์ *DraI*, *HindIII* และ *XbaI* ซึ่งเป็นเอนไซม์ประเภท 6-cutter ตัดดีเอ็นเอในเป้าหมาย *ND2* ได้ 2 ชิ้นทั้งหมด ดังนั้นตำแหน่งตัดที่เราวิเคราะห์ได้เพียง 3 ตำแหน่ง เท่านั้น ดังนั้นจึงคาดว่าจะเป็นการยากที่จะพบตำแหน่งที่กลายพันธุ์ไปที่จะให้ haplotype แปรกออกไป ดังนั้นจึงเปลี่ยนเอนไซม์ใหม่ทั้งหมด โดยคาดว่าจะเปลี่ยนเป็นเอนไซม์ 4-cutter ทั้งนี้ก็เพื่อเพิ่มจำนวนตำแหน่งตัดใน PCR product เพื่อค้นหา haplotype แปรกเพิ่มขึ้น แต่ก็ต้องใช้เวลามากกว่าเมื่อต้องวิ่งชิ้นดีเอ็นเอใน denaturing polyacrylamide gel

จากตารางที่ 3 พอจะประเมินได้ว่า เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะก็จะได้ตำแหน่งตัดทั้ง 3 ยีนรวมกันประมาณ 129 ตำแหน่ง

ซึ่งเอนไซม์ที่คัดเลือกไว้อาจเปลี่ยนแปลง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสำเร็จของการทดลองตัดเบื้องต้นว่าจะประสบผลสำเร็จในการตัดหรือไม่

3.4.4 การจำแนก haplotype ของปลาบึกจาก 3 ประชากรและปลาบึกไม่ทราบประวัติ

ในการจำแนก haplotype ของปลาบึกจะต้องนำ genomic DNA ปลาบึกแต่ละตัวจากประชากรต่างๆ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ยีน *ND2*, *ND3/ND4* และ บริเวณ *Cytochrome b* + control region หลังจากนั้นจึงนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วย restriction enzyme ที่คัดเลือกไว้แล้วนำไปวิ่งใน polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบผลของการตัด เพื่อจำแนก haplotype ของปลาบึกแต่ละตัว

3.4.4.1 การจำแนก haplotype ของปลาบึกโดยอาศัยบริเวณยีน *ND2*

ใช้ genomic DNA ของปลาบึกจากสถานีประมงกาฬสินธุ์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดบุรีรัมย์และอุดรธานี และ ปลาบึกที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ จำนวน 163 ตัว มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *ND2* และนำไปตัดด้วยเอนไซม์ *AciI*, *DpnII*, *HaeIII* *TasI* และ *TruI* แต่ก็มีปัญหาสำหรับประชากรบุรีรัมย์ที่ไม่ได้ผลจากการตัดด้วยเอนไซม์ *DpnII* และ *HaeIII* ดังนั้นทำให้ข้อมูลจากประชากรไม่สมบูรณ์ และต้องตัดทิ้งไปเมื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูล สำหรับการจำแนก haplotype ของปลาบึกจากยีน *ND2* นั้นดำเนินการเสร็จสมบูรณ์แล้ว

3.4.4.2 การจำแนก haplotype ของปลาบึกโดยอาศัยบริเวณยีน *ND3-ND4* และ บริเวณยีน *Cytochrome b* + control region

ในกรณีการจำแนก haplotype ด้วยบริเวณยีน *ND3-ND4* และ *Cytochrome b* + control region ทำสำเร็จเรียบร้อยแล้วเฉพาะกรณีประชากรจากสถานีประมงกาฬสินธุ์เท่านั้น ด้วยเหตุที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากประชากรอื่นๆได้ตามแผน จึงไม่นำมาเสนอในที่นี้

3.4.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ control region

เนื่องด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของชิ้นยาวคือ *ND3-ND4* และ *Cytb/control region* ไม่ประสบผลสำเร็จในประชากรอื่น ๆ (ได้เฉพาะกาฬสินธุ์) ดังนั้นจึงเปลี่ยนแผนดำเนินการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในบริเวณ control region เพิ่มเติมจากจุดประสงค์เดิม ซึ่งบริเวณ control region ซึ่งมีขนาด 899 คู่เบส และเป็นบริเวณที่มักนำมาใช้ในการจำแนกประชากร ทั้งนี้เพราะเป็นบริเวณที่มีได้กำหนดยีนใด ๆ แต่ทำหน้าที่ในเรื่องการเพิ่มตัวเองของ mtDNA (Meyer, 1993) และด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงก็จะเป็นการเพิ่มลักษณะ (characters) ของแต่ละตัวอย่าง (ปลาบึกแต่ละตัว) จึงควรให้ความละเอียดมากขึ้นในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic variation) ระหว่างปลาแต่ละตัวละเอียดขึ้น ในการนี้จึงได้ออกแบบไพรเมอร์อีก 1 คู่คือ

pgCRF (H 15,621); 5'-CCAAAGCTAGGATTCTCAGCT-3'

pgCRR (H 33); 5'-TCAGTGTTATGCTTTGGTTTAAGC-3'

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งมีบริเวณ control region รวมอยู่ด้วย ซึ่งปรากฏว่าเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 1000 bp

แต่เมื่อใช้ PCR-primer คู่นี้ไปใช้เป็น sequencing primer ปรากฏว่าเมื่อนำผลวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอมาสร้างเป็น contig sequence ปรากฏว่าได้บริเวณ control region ที่ขาดไปประมาณ 100 bp ดังนั้นจึงออกแบบ sequencing primer คู่ใหม่ซึ่งอยู่ภายในส่วนของ PCR product (internal sequencing primers) ไพรเมอร์ดังกล่าวคือ

SQF (H 15,757); 5'-TAAACATTGACAAACCTATTATTG-3'

SQR (H 16,401); 5'-GGGGTTTGTCTCGTGC GA-3'

ซึ่งผลปรากฏว่าเมื่อนำเอาผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product จากปลาบึกแต่ละตัว (ทั้งสองด้าน) มาทำ contig sequence ผลปรากฏว่าครอบคลุมบริเวณ control region ทั้งหมด ดังนั้น ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาบึกทุกตัวจึงได้จากการใช้ sequencing primer คู่นี้

3.4.6 การวิเคราะห์ข้อมูล haplotype ของปลาบึก

ข้อมูล RFLP ของยีน *ND2* ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ haplotype distribution ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ภายในและระหว่างประชากรและรวมทั้งการแบ่งความแปรปรวนเหล่านี้ออกเป็นส่วนต่างๆ ด้วยการวิเคราะห์ AMOVA (analysis of molecular variance) ด้วยโปรแกรม ARLEQUIN version 3.0 (Excoffier, *et al.*, 2005)

ส่วนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ control region จะถูกนำมาเปรียบเทียบระหว่างกัน (alignment) โดยใช้โปรแกรม CLUSTALW version 1.8 (Thompson *et al.*, 1994) การจำแนกหลังจากนั้นจึงใช้โปรแกรม DnaSP v 4.10 (Rozas *et al.*, 2003) ใช้ในการจำแนก haplotype ของปลาแต่ละตัว nucleotide diversity และ nucleotide divergence นอกจากนั้น ยังใช้โปรแกรม MEGA version 3 (Kumar *et al.*, 2004) เพื่อการวิเคราะห์ number of pairwise difference (TS, TV และ TS+TV) จาก haplotype ทั้งหมด เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการทำ Model test (nucleotide substitution model) ด้วยโปรแกรม PAUP4v.10 (Swofford, 2002) ซึ่งยังใช้เพื่อคำนวณ genetic distance ระหว่าง haplotype เพื่อใช้ในการสร้าง NJ phylogenetic tree และทำ bootstrap test ในแต่ละ phylogenetic tree ดังกล่าวแล้ว

4. ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

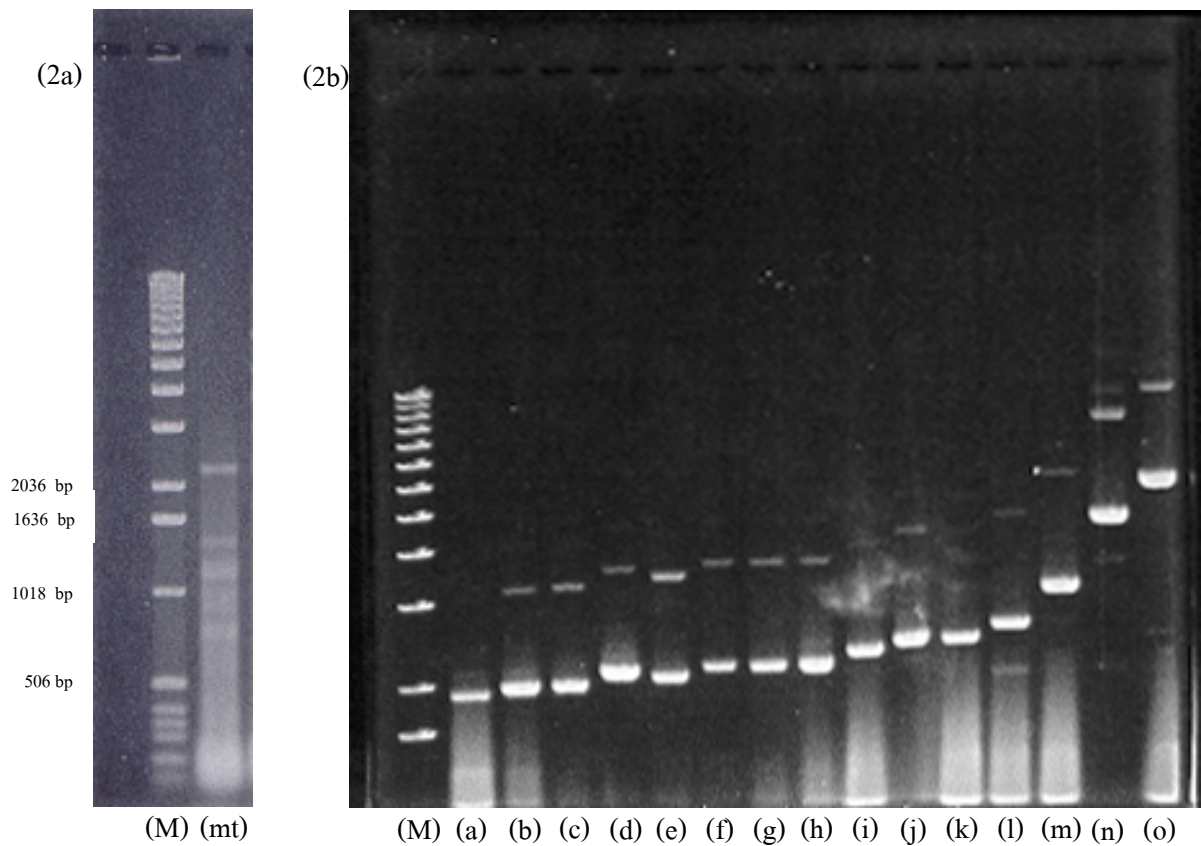
4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของปลาบึก

4.1.1 ผลการโคลน mtDNA ปลาบึกโดยใช้ดีเอ็นเอพาหะ pUC18

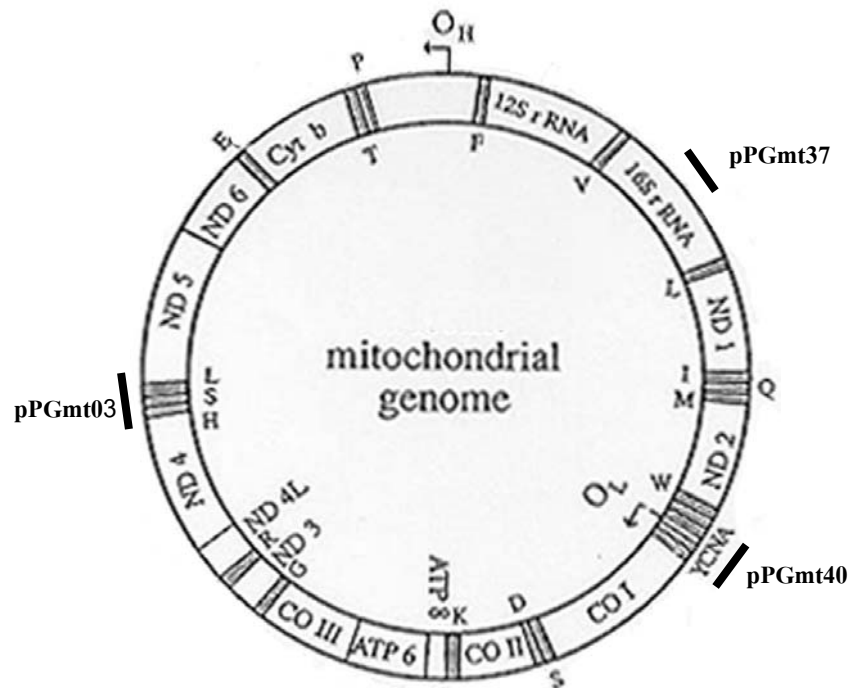
จากการนำเอา recombinant plasmid ซึ่งเกิดจากการรวมของชิ้นส่วน mtDNA ปลาบึกและ pUC18 แล้วถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 และนำไปเพาะเลี้ยงบน selective media จากการคัดเลือกเฉพาะโคโลนีแบคทีเรียสีขาวจำนวนประมาณ 100 โคลน และนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สำหรับการแยกสกัด recombinant plasmid เพื่อเปรียบเทียบขนาดของ พลาสมิดที่ได้จากโคโลนีสีขาวของแบคทีเรีย *E. coli* กับขนาดของพลาสมิด pUC18 พบว่าพลาสมิดที่ได้เกือบทั้งหมดมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของพลาสมิด pUC18 และพลาสมิดเหล่านั้นก็มีขนาดแตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังแสดงตัวอย่างใน รูปที่ 2b จากการส่ง recombinant plasmid ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นสอดแทรก (inserted) จากกลุ่มที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยเลือกโคลน pPGmt03, pPGmt37, pPGmt40, pPGmt 70 และ pPGmt83 ส่งไปการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการ (BSU) เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จึงนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น mtDNA ที่สอดแทรกในโคลนต่างๆ เป็นดังนี้ (รูปที่ 3)

- pPGmt03 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณปลาย 3' ของยีน *ND4* ถึงปลาย 5' ของยีน *ND5*
- pPGmt37 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *16s rRNA*
- pPGmt40 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของกลุ่มยีน tRNA ใน WANCY region
- pPGmt70 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีน *ATPase8* และ *ATPase6*
- pPGmt83 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น mtDNA ชิ้นเล็กๆ จากบางส่วนของยีน *ND3*, *ND5* และ *Cytb* มาเชื่อมต่อกัน

จึงเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลน pPGmt03, pPGmt37 และ pPGmt40 นำไปออกแบบไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา Long PCR ต่อไป



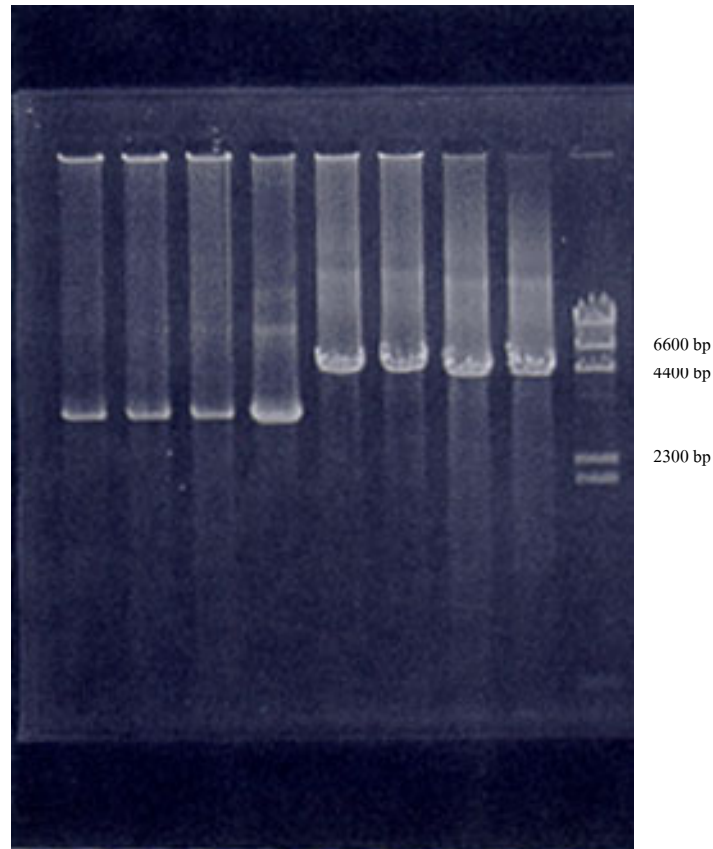
รูปที่ 2 (a) แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัด mtDNA ของปลาบึกด้วยเอนไซม์ *MboI* โดยแสดง DNA marker 1 kb ladder (M) และ แถบ mtDNA ของปลาบึกที่ถูกตัดแล้ว (mt) (b) แสดงขนาดของ plasmid ที่แยกสกัดได้จากโคลนต่างๆ เปรียบเทียบกับ plasmid pUC18 โดยแสดง DNA marker 1 kb ladder (M), pPGmt43 (a), pPGmt50 (b), pPGmt81 (c), pPGmt12 (d), pPGmt79 (e), pPGmt66(f), pPGmt78 (g), pPGmt40 (h), pPGmt03 (i), pPGmt37 (j), pPGmt86 (k), pPGmt70 (l), pPGmt83 (m), pPGmt58 (n), และ pPGmt87(o)



รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน pPGmt03, pPGmt37 และ pPGmt40 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำปฏิกิริยา Long PCR เมื่อเทียบกับจีโนมไมโทคอนเดรียของปลาส่วนใหญ่

4.1.2 ผลของการทำ Long PCR

ด้วยสภาพการทดลองที่กล่าวแล้ว คือ ใช้ไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไมโทคอนเดรียปลาได้ 3 ชิ้น โดยให้ชื่อว่าเป็น fragment A, B และ C มีขนาด 4.0, 6.2 และ 6.0 kb ตามลำดับ (ดังรูปที่ 4) ขั้นตอนต่อไปคือส่ง PCR product เหล่านี้ไปวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอและพิสูจน์ว่าชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเหล่านี้ว่าอยู่ในส่วนไหนของ ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของปลา โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank



รูปที่ 4 แสดงแถบ PCR product ที่ได้จากการทำ Long PCR เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA marker(M)

4.1.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ fragment A, B และ C จากปลายของแต่ละสายได้ผลดังต่อไปนี้

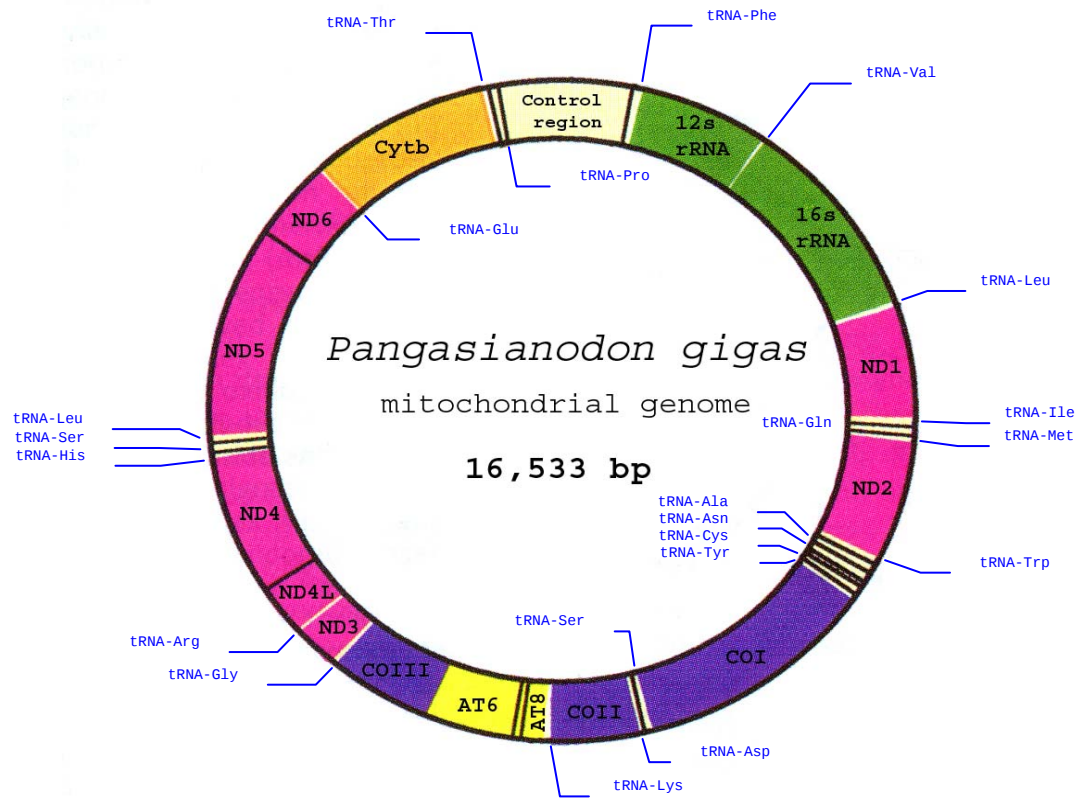
การวิเคราะห์ลำดับของ Fragment A ได้ดำเนินการจากปลายซ้ายและจากปลายขวา ได้ความยาวรวม 3,765 นิวคลีโอไทด์ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่าจากปลายซ้ายครอบคลุมบางส่วนของ *16s rRNA* และ ยีน ND1 ส่วนจากปลายขวาจะครอบคลุมบางส่วนของ WANCY region ยีน ND2 และยีน ND1 บางส่วน

สำหรับการวิเคราะห์ลำดับของ Fragment B จากปลายขวาและซ้ายได้ความยาวรวม 6,623 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งครอบคลุมของ WANCY region บางส่วนของ *COI*, *COII* ของยีน *ATPase* 8 บางส่วน ยีน ND3 บางส่วน ยีน ND4L และยีน ND4

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment C เมื่อรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากปลายซ้ายและขวาได้ความยาว 6,559 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งครอบคลุมยีน ND4 บางส่วน, ND5, ND6, *Cytb* บางส่วน, control region, *12s rRNA* และยีน *16s rRNA* บางส่วน สำหรับ Fragment C คาดว่าจะยาวประมาณ 6,600 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นคาดว่าจะเหลืออีกประมาณ 100 นิวคลีโอไทด์เท่านั้น

จากการนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งในส่วน of fragment A, B, C และนิวคลีโอไทด์ในส่วน of ส่วนต่อเชื่อม (overlapping AB, -BC และ overlapping CA) มาสร้าง contig sequence ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอทั้งหมดและพบว่ามีความยาวทั้งหมดเท่ากับ 16,533 นิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนต่าง ๆ ในไมโทคอนเดรียพบว่าไมโทคอนเดรียของปลาบึกขนาด 16,533 นิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยยีนควบคุมการสร้างโปรตีน 13 ชนิด ทีอาร์เอ็นเอ(tRNA) 22 ชนิด ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) 2 ชนิด และบริเวณควบคุม (control region) ซึ่งมีโครงสร้างเหมือนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของปลากระดุกแข็งอื่นๆทั่วไป รายละเอียดดังในรูปที่ 5 และตารางที่ 4 และได้นำข้อมูลทั้งหมดไปฝากไว้ที่ GenBank ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อวันที่ 24 กันยายน 2547 และ GenBank ได้เปิดโอกาสให้นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกเข้าไปใช้ได้ ตั้งแต่วันที่ 10 ตุลาคม 2547 ภายใต้ accession number AY762971 และ NC_006382

สำหรับผลการวิเคราะห์รายละเอียดของลำดับไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอทั้งหมดของปลาบึก และรายละเอียดอื่น ๆ ขอให้ดูในเอกสารแนบท้าย



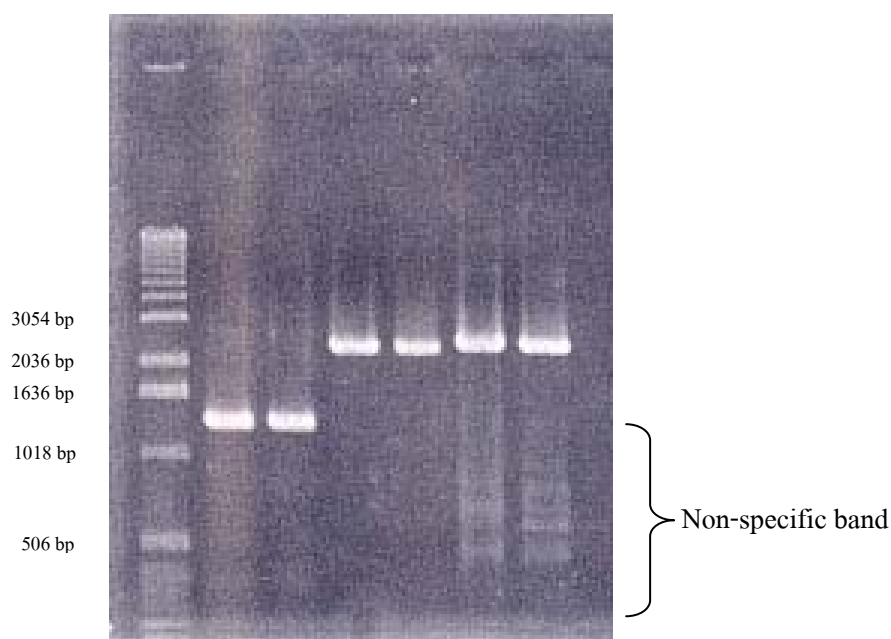
รูปที่ 5. แผนผัง แสดง mitochondrial genome ของปลาน้ำจืด

ตารางที่ 4 Location of genes in the mitochondrial genome of Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*)

Feature	From	to	Size(bp)	Possible codon	
				Start	Stop
1. tRNA-Phe	1	70	70		
2. 12S ribosomal RNA	71	1,029	759		
3. tRNA-Val	1,030	1,101	72		
4. 16S ribosomal RNA	1,102	2,775	1,674		
5. tRNA-Leu	2,776	2,850	75		
6. ND1	2,851	3,825	975	ATG	TAA
7. tRNA-Ile	3,827	3,898	72		
8. tRNA-Gln	3,898	3,968	71 (L)		
9. tRNA-Met	3,967	4,035	69		
10. ND2	4,038	5,081	1,044	ATG	TA_
11. tRNA-Trp	5,080	5,150	71		
12. tRNA-Ala	5,153	5,221	69 (L)		
13. tRNA-Asn	5,223	5,295	73 (L)		
14. tRNA-Cys	5,326	5,392	67 (L)		
15. tRNA-Tyr	5,395	5,464	70 (L)		
16. COI	5,466	7,016	1,551	GTG	TAA
17. tRNA-Ser	7,018	7,086	69 (L)		
18. tRNA-Asp	7,092	7,164	73		
19. COII	7,179	7,869	691	ATG	T_
20. tRNA-Lys	7,870	7,943	74		
21. ATPase8	7,945	8,112	169	ATG	TAA
22. ATPase6	8,103	8,786	684	ATG	TA_
23. COIII	8,786	9,570	785	ATG	TA_
24. tRNA-Gly	9,570	9,642	73		
25. ND3	9,643	9,993	351	ATG	TAG
26. tRNA-Arg	9,992	10,062	71		
27. ND4L	10,063	10,359	297	ATG	TAA
28. ND4	10,353	11,733	1,380	ATG	T_
29. tRNA-His	11,734	11,803	70		
30. tRNA-Ser	11,804	11,870	67		
31. tRNA-Leu	11,873	11,944	72		
32. ND5	11,945	13,771	1,327	ATG	TAA
33. ND6	13,768	14,286	519 (L)	ATG	TAG
34. tRNA-Glu	14,287	14,355	69 (L)		
35. Cyt b	14,357	15,494	1,138	ATG	T_
36. tRNA-Thr	15,495	15,566	72		
37. tRNA-Pro	15,565	15,634	70 (L)		
control region	15,635	16,533	899		

4.2. การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณและการทดสอบประสิทธิภาพ

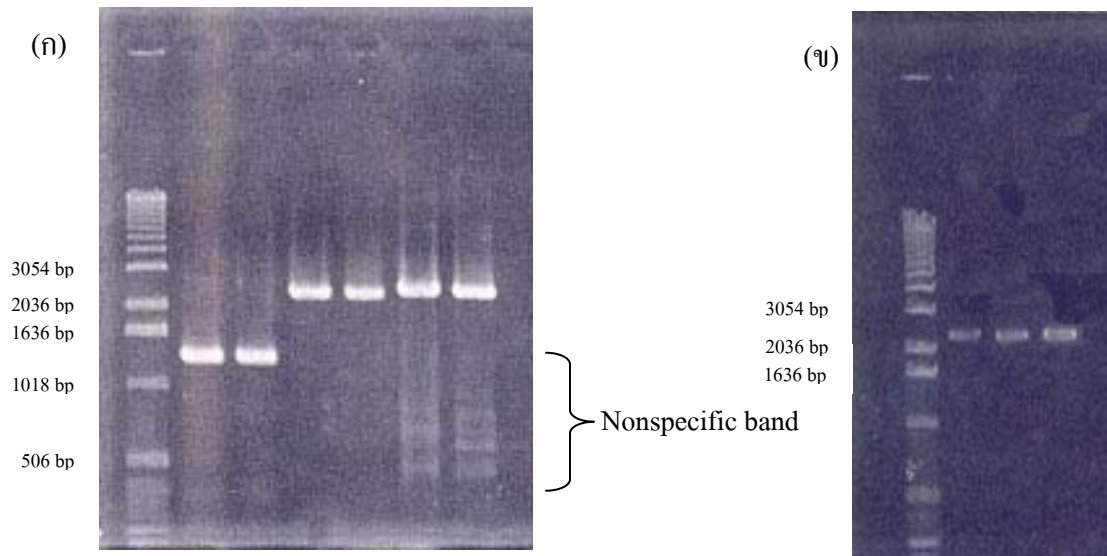
สำหรับการทดลองใช้การออกแบบไพรเมอร์ P13 – P14 เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *ND2* , P15 – P16 สำหรับยีน *ND3-ND4* และ P17-P18 สำหรับยีน *Cytochrome b* + control region และการทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ผลการเพิ่มปริมาณ *ND2* , *ND3-ND4* และ



รูปที่ 6 ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *ND2*, *ND3-ND4* และบริเวณรวม *Cyt b* และ control region (CR) เมื่อใช้ไพรเมอร์ P13 - P14, P15 - P16 และ P17 - P18

บริเวณ *Cytochrome b* + control region ได้ขนาดประมาณ 1,300, 2,300 และ 2,400 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 7) แต่เกิดปัญหากับกรณีไพรเมอร์คู่ที่ 3 ทั้งนี้เพราะเกิดการเพิ่มปริมาณ nonspecific band ขึ้นมาด้วย ซึ่งเมื่อทำ optimization PCR condition มีผลเพียงลดความเข้มข้นของ non-specific band ให้จางลงไปได้บ้าง แต่ไม่หมดไป จึงได้ออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณรวม *Cytochrome b* + control region คือ ไพรเมอร์ P19 และ P20

เมื่อนำไพรเมอร์คู่ใหม่ P19 – P20 ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองก็สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,200 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งไม่มี nonspecific band ปรากฏขึ้นเลย (รูปที่ 6) ซึ่งจะนำไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อการศึกษาจำแนก haplotype ปลายีกตัวอย่างต่อไป



รูปที่ 7 ผลจากการใช้ไพรเมอร์คู่ P19 – P20 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ผลปรากฏว่าไม่มี non-specific band (รูปที่ 7ข) เหมือนรูปที่ 7 (ก)

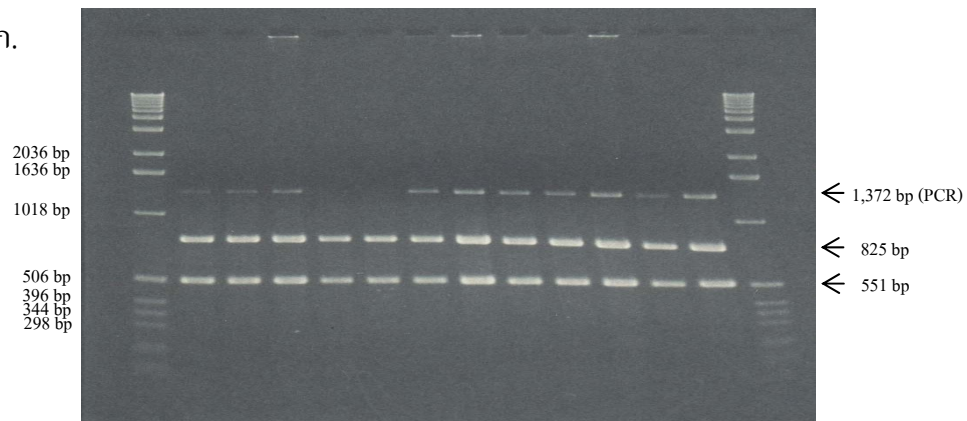
4.3 ผลการสำรวจเอนไซม์ตัดจำเพาะและตำแหน่งตัด

เมื่อใช้ restriction enzyme ที่คัดเลือกไว้มาทดลองตัด PCR product ขึ้น *ND2*, *ND3* – *ND4* และ *Cytb* – CR ผลแสดงไว้ดังรูปที่ 8 ถึง รูปที่ 11 และสรุปผลการคัดเลือกเอนไซม์ไว้ใน ตารางที่ 5 บริเวณ ละ 5 ชนิด

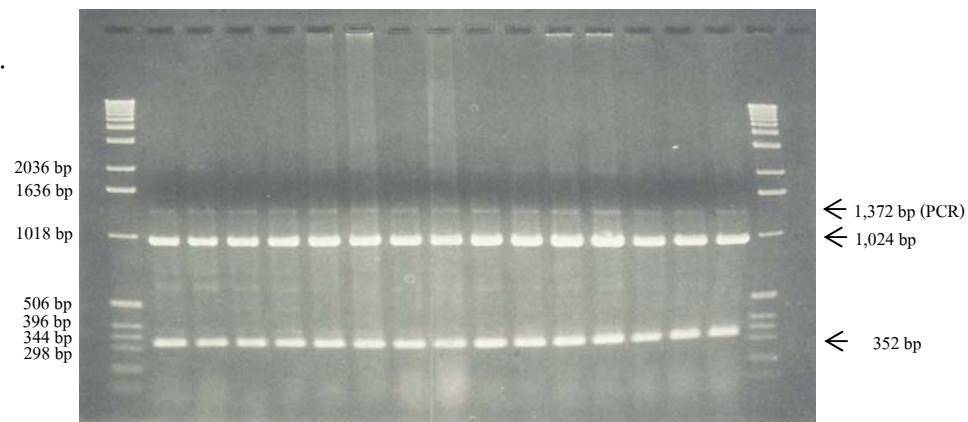
ตารางที่ 5 ผลการตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณยีน *ND2* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดจึงจะให้รูปแบบการตัดที่แตกต่างกัน

ยีนเป้าหมาย	เอนไซม์ตัดจำเพาะ	จำนวนชิ้นที่ได้	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (bp)
<i>ND2</i> (1,376 bp)	<i>AciI</i>	4	420, 360, 330, 250
	<i>HaeIII</i>	5	400, 380, 130, 100, 85
	<i>TruI</i>	4	450, 410, 170, 130
	<i>DpnII</i>	5	750, 210, 190, 100, 80
	<i>TasI</i>	6	460, 270, 240, 140, 120, 100
<i>ND3 - ND4</i> (2,352 bp)	<i>AciI</i>	7	620, 400, 300, 240, 120, 105, 80
	<i>DpnI</i>	4	310, 250, 140, 110
	<i>HaeIII</i>	5	350, 280, 210, 200, 140
	<i>TasI</i>	8	490, 460, 340, 330, 210, 110, 90, 80
	<i>TruI</i>	4	380, 210, 120, 110
<i>Cytb - CR</i> (3,263 bp)	<i>AhlI</i>	4	500, 280, 190, 100
	<i>HaeIII</i>	4	550, 300, 220, 200
	<i>TaqI</i>	3	159, 111, 98
	<i>RsaI</i>	6	390, 250, 240, 200, 170, 110
	<i>DpnII</i>	3	300, 180, 140

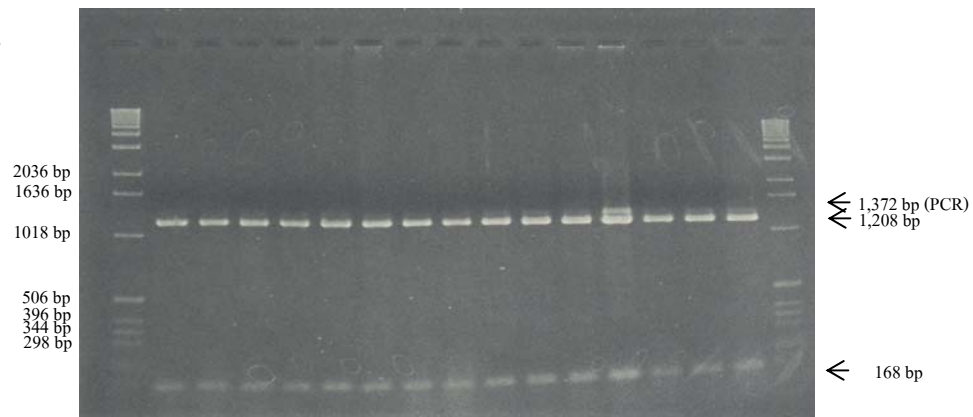
ก.



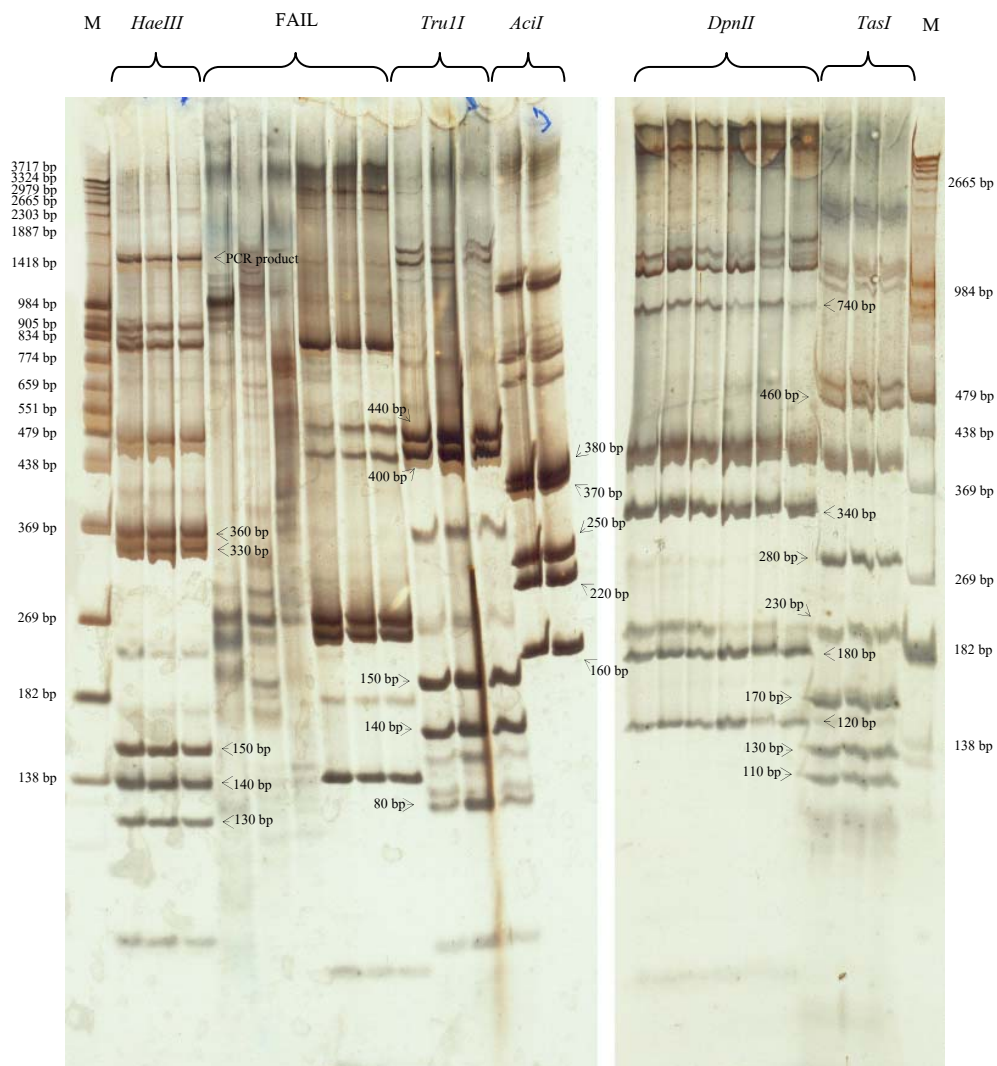
ข.



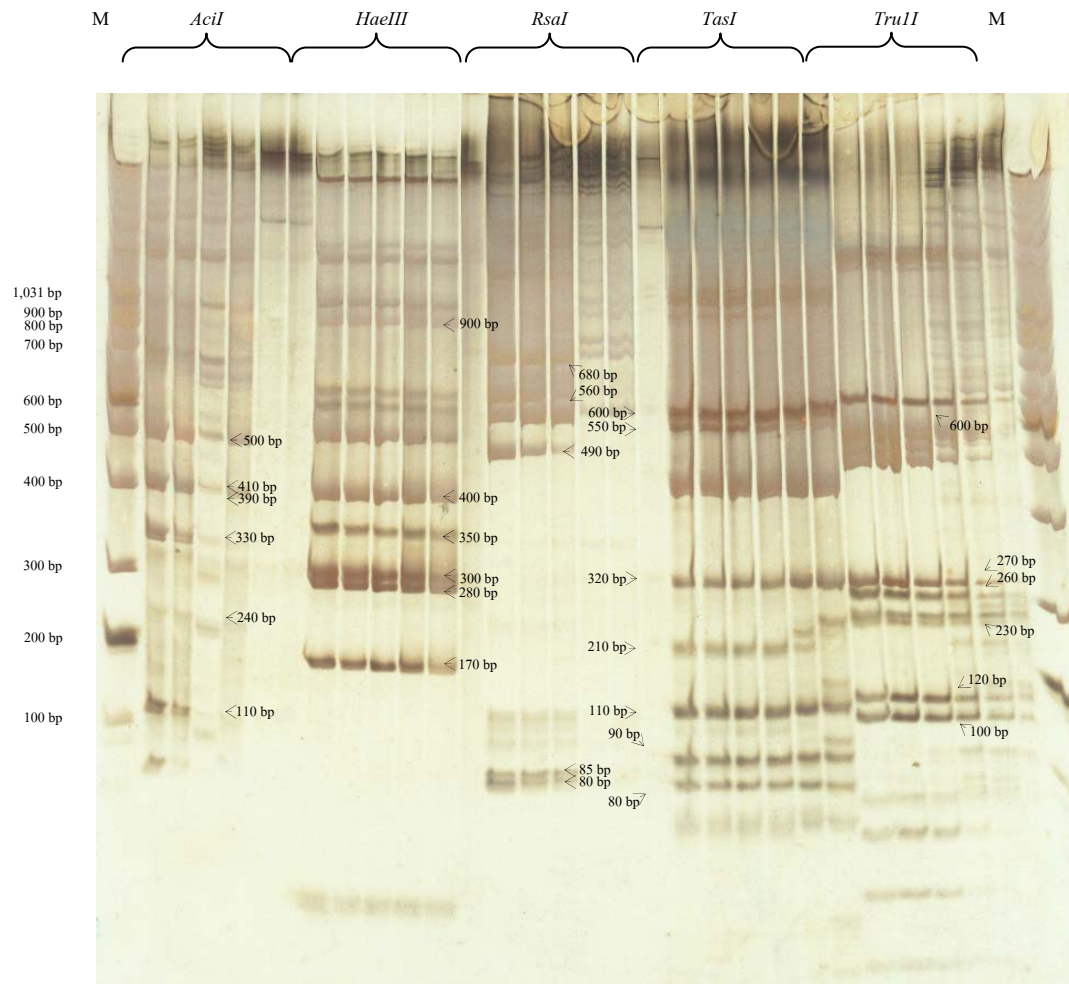
ค.



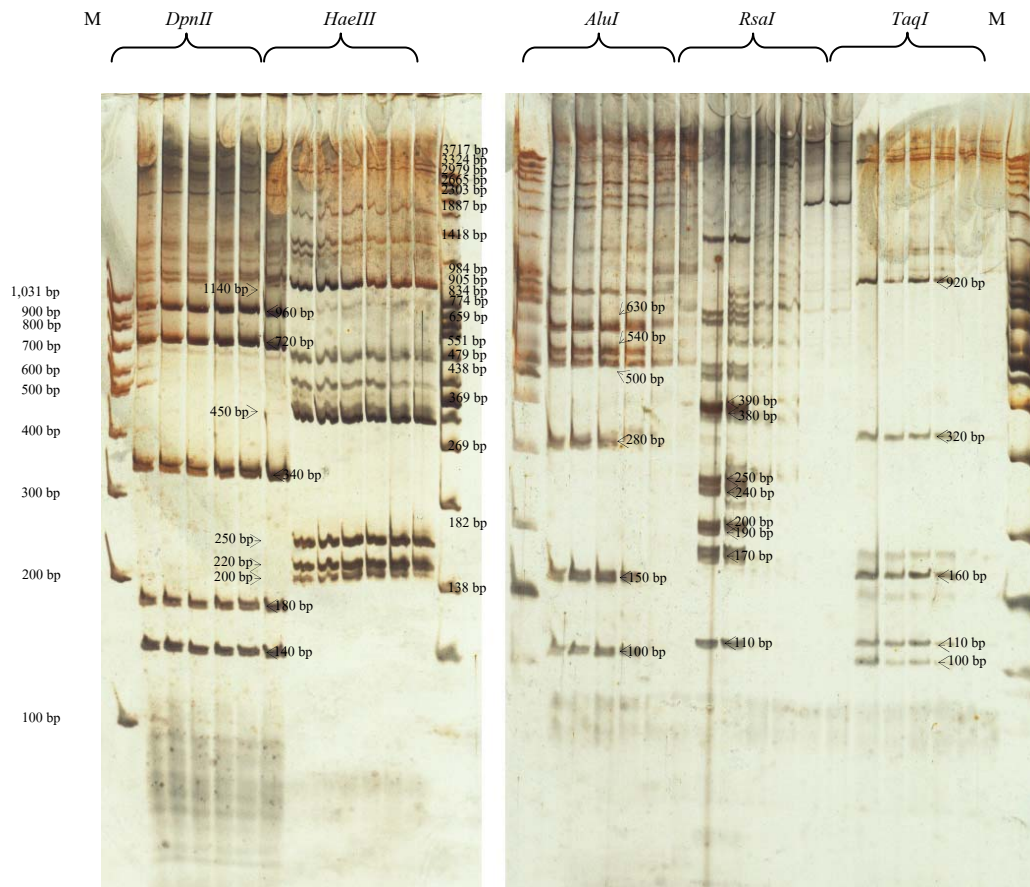
รูปที่ 8 แสดงการตัดดีเอ็นเอของยีน *ND2* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ก) *DraI* ซึ่งตัดได้ 2 ขนาดคือ 825 bp และ 551 bp, (ข) *HhaI* ซึ่งตัดได้ 2 ขนาดคือ 1,024 bp และ 352 bp, และ (ค) *XbaI* ซึ่งตัดได้ 2 ขนาดคือ 1,208 bp และ 168 bp, แต่ละเอนไซม์บ่มนาน 18 ชั่วโมง ที่ 37°C แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วย 2% agarose gel electrophoresis



รูปที่ 9 แสดงผลการตัดชิ้นดีเอ็นเอยีน *ND2* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ประกอบด้วยเอนไซม์ *HaeIII*, *TruII*, *AciI*, *DpnII* และ *TasI* แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย polyacrylamide gel electrophoresis



รูปที่ 10 แสดงผลการตัดชิ้นดีเอ็นเอยีน *ND3 – ND4* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ประกอบด้วย เอนไซม์ *Acil*, *HaeIII*, *RsaI*, *TasI* และ *TruII* แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย polyacrylamide gel electrophoresis



รูปที่ 11 แสดงผลการตัดดีเอ็นเอของยีน *Cytb* และ control region ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ประกอบด้วยเอนไซม์ *DpnII*, *HaeIII*, *AluI*, *RsaI* และ *Taq I* แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย polyacrylamide gel electrophoresis

4.4 การจำแนก haplotype ของปลาบึกจาก 3 ประชากรและปลาบึกไม่ทราบประวัติ

4.4.1 การจำแนก haplotype ของปลาบึกโดยอาศัยบริเวณยีน *ND2*

ผลการตัด *ND2* ด้วยเอนไซม์ที่คัดเลือกไว้ 5 เอนไซม์ แต่ละเอนไซม์จะให้ restriction fragment pattern ที่แตกต่างกันดังแสดงไว้ใน ตารางที่ 6 และสามารถจำแนก haplotype ปลาบึก 163 ตัว ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7 แต่ก็มีปัญหาสำหรับประชากรบุรีรัมย์ที่ไม่ได้ผลจากการตัดด้วยเอนไซม์ *DpnII* และ *HaeIII* ดังนั้นทำให้ข้อมูลจากประชากรไม่สมบูรณ์ และต้องตัดทิ้งไปเมื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูล สำหรับการจำแนก haplotype ของปลาบึกจากยีน *ND2* นั้นดำเนินการเสร็จสมบูรณ์แล้ว

ชิ้นดีเอ็นเอยีน *ND2* ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ขนาดประมาณ 1376 นิวคลีโอไทด์ PCR product ที่ได้ถูกนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ประเภท 4 cutter คือ *Acid I*, *DpnII*, *HaeIII*, *TasI* และ *TruI* ซึ่งรูปแบบของ restriction fragment pattern ได้แสดงไว้ดังตารางที่ 5 ส่วน haplotype ของปลา 163 ตัว ได้จากการนำเอา fragment length pattern ของแต่ละเอนไซม์มารวมกันเป็น composite haplotype ดังแสดงไว้ในตารางที่ 7 ซึ่งเมื่อรวมทุกประชากรแล้วสามารถจำแนก haplotype ของปลา 163 ตัวได้เพียง 4 haplotype เท่านั้น ความแตกต่างระหว่าง haplotype พบเพียงใน 3 ประชากรเท่านั้น (ตารางที่ 8) คือ ประชากรกาฬสินธุ์มี 3 haplotype ส่วนประชากรสิงห์บุรี (SB) และประชากรธรรมชาติมีเพียง 2 haplotype เท่านั้น แต่เมื่อเปรียบเทียบกับปลา amago salmon ซึ่งมีเพียง 6 haplotype จากปลาทั้งหมด 403 ตัว เมื่อวิเคราะห์จาก PCR-RFLP ของ D-loop และ *ND2* (Kawamura, *et al.*, 2006) เมื่อวิเคราะห์ haplotype distribution (ตารางที่ 8) และวิเคราะห์ AMOVA พบว่าความแตกต่างระหว่างประชากรไม่มีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9) เหตุผลอาจเนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่เลือก (*ND2*) มีความแปรปรวนในตำแหน่งตัด (restriction site) น้อย ผลการวิเคราะห์ nucleotide divergence ระหว่าง haplotype ทั้ง 4 พบว่าจะมีอยู่ระหว่าง 0.0097 ถึง 0.1931 (ตารางที่ 10) ซึ่ง divergence ต่ำที่สุดคือระหว่าง AAAAA และ BAAAA ส่วนสูงสุดระหว่าง BAAAA และ CBBCB แต่มีจำนวนอยู่เพียง 3 ตัวเท่านั้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่า 2 composite haplotype ทั้งสองอยู่ห่างกัน เมื่อใช้ค่า genetic distance มาสร้างเป็น NJ tree (ดังรูปที่ 12) เมื่อพิจารณาค่า gene diversity (ตารางที่ 10) ซึ่งมีค่าระหว่าง 0.000-0.667 แต่ค่า gene diversity ของปลาธรรมชาติ(WG) มีค่า 0.667 แต่ได้จากปลาเพียง 3 ตัวเท่านั้น ดังนั้นค่า gene diversity ที่น่าเชื่อถือ คือ 0.000-0.198 ซึ่งก็ใกล้เคียงกับของปลา amago salmon ซึ่งเป็นปลา ชนิด endangered fish .ในประเทศญี่ปุ่น มีค่า sequence divergence เท่ากับ 0.19 (Kawamura, *et al.*, 2006) ค่าที่ได้โดยเฉลี่ยต่ำกว่าของปลา burbot (*Lota lota*) ในในบริเวณโคลัมเบีย ซึ่งเมื่อคำนวณจาก RFLP ของยีน *ND1*, *ND2* และ *ND5/6* พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.0065 – 0.1572 (Paragamiar *et al.*, 1999) และปลา chihook salmon (Adams *et al.* 1994) ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.024 – 0.0085 ซึ่งสะท้อนให้เห็นการแบ่งกลุ่มของปลาอย่างไม่ชัดเจน สำหรับกรณีปลาบึกจึงมีความแปรปรวนอยู่ใน 3 ประชากรเท่านั้น สำหรับในประชากรธรรมชาติ (WG) ซึ่งมีอยู่เพียง 3 ตัว ค่า gene diversity สูงเกินเหตุ ซึ่งเป็นเรื่องไม่น่าเชื่อถือ (เพราะจำนวนน้อย) เมื่อพิจารณาจากค่า genetic divergence (ความแปรปรวนระหว่างประชากร (ตารางที่ 11) พบว่า 3 ประชากรคือ กาฬสินธุ์ (E) สิงห์บุรี และปลาธรรมชาติ ที่แตกต่างจากประชากรอื่น ค่าที่ได้ระหว่าง 0.039 – 0.193 ซึ่งสอดคล้องกับกรณีของปลา Chinook salmon ในอะลาสกา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจำนวน haplotype ของปลาจากแหล่งต่างๆ แตกต่างกันอย่างไม่ชัดเจน ซึ่งกรณีการประยุกต์ใช้บริเวณยีน *ND2* น่าจะเป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนในปลาบึกต่ำ จึงควรเลือกยีนอื่นศึกษา เมื่อนำเอาข้อมูล *ND2*-RFLP ไปสร้าง phylogenetic tree (รูปที่ 12 และ 13) ระหว่างประชากรพบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มหลักเท่านั้นซึ่งแสดงแหล่งที่ว่ามี 4 สายพันธุ์แม่ (maternal lineage) เท่านั้น

ตารางที่ 6 แสดงขนาด Random fragment length polymorphism patterns ที่ได้จากการตัดด้วย restriction endonuclease 5 ชนิดของชิ้น *ND2*, *ND3 – ND4* และ *Cytb-CR*

ชิ้นเป้าหมาย	restriction enzyme	haplotype	haplotype pattern	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (bp)
<i>ND2</i> (1,376 bp)	<i>AciI</i>	A	0010101001	250 330 360 420
		B	1110001001	90 210 250 360 420
		C	0011010010	250 300 350 410
	<i>DpnII</i>	A	10101100001	80 100 190 210 750
		B	01010110010	95 180 210 330 500
	<i>HaeIII</i>	A	1111011	90 100 110 280 290 450
		B	1110101	90 100 110 320 450
	<i>TasI</i>	A	11010010101	100 120 140 240 270 460
		B	00101001101	125 150 250 270 460
		C	10100100011	100 125 230 280 460
	<i>TruII</i>	A	111000011	85, 116, 143, 399, 436
		B	000111100	210 320 340 400
<i>ND3 - ND4</i> (2,352 bp)	<i>AciI</i>	A	1111111	80 100 120 240 300 400 620
	<i>DpnII</i>	A	11111	100 140 240 350 1100
	<i>HaeIII</i>	A	111111	140 200 220 310 400 900
	<i>TasI</i>	A	11111111	80 90 110 200 320 370 460 490
	<i>TruII</i>	A	111111	110 120 210 380 420 430
<i>Cytb - CR</i> (3,263 bp)	<i>AluI</i>	A	111111	100 150 280 500 540 630
	<i>DpnII</i>	A	11111	140 170 340 710 890
	<i>HaeIII</i>	A	11111	200 220 250 450 1100
	<i>RsaI</i>	A	111111111	100 110 170 190 200 240 250 380 390
	<i>TaqI</i>	A	11111	98 111 159 923 972

ตารางที่ 7 แสดง haplotype ของปลาบึกทั้งหมดซึ่งได้จากการตัดยีน *ND2* ด้วย restriction enzyme ชนิดต่างๆ

ปลาบึก	แหล่งเก็บตัวอย่าง	haplotype	ปลาบึก	แหล่งเก็บตัวอย่าง	haplotype	ปลาบึก	แหล่งเก็บตัวอย่าง	haplotype	ปลาบึก	แหล่งเก็บตัวอย่าง	haplotype
E1502	กาฬสินธุ์	AAAAA	E1610	กาฬสินธุ์	AAAAA	LRD05	ลพบุรี2	AAAAA	BR28	บุรีรัมย์	A - - AA
E1503	“	AAABA	E1612	“	AAAAA	LRD06	“	AAAAA	BR29	“	A - - AA
E1504	“	AAAAA	E1613	“	AAAAA	CF03	จรัลฟาร์ม	AAAAA	BR30	“	A - - AA
E1505	“	AAABA	E1614	“	AAAAA	CF06	“	AAAAA	SB01	สิงห์บุรี	AAAAA
E1506	“	AAAAA	E1615	“	AAAAA	CF07	“	AAAAA	SB02	“	AAAAA
E1507	“	AAAAA	E1620	“	AAAAA	CF08	“	AAAAA	SB03	“	AAAAA
E1508	“	AAABA	E16x1	“	AAAAA	CF09	“	AAAAA	SB04	“	AAAAA
E1509	“	AAAAA	E16x2	“	AAAAA	CF10	“	AAAAA	SB05	“	AAAAA
E1510	“	AAAAA	E16x3	“	AAAAA	CF12	“	AAAAA	SB06	“	AAAAA
E1511	“	AAAAA	E133	“	AAAAA	CF18	“	AAAAA	SB07	“	AAAAA
E1513	“	AAAAA	E134	“	AAAAA	CF19	“	AAAAA	SB08	“	AAAAA
E1514	“	AAAAA	E135	“	BAAAA	CF20	“	AAAAA	SB09	“	AAAAA
E1515	“	AAAAA	E136	“	AAAAA	Br01	บุรีรัมย์	A - - AA	SB10	“	AAAAA
E1516	“	AAABA	E137	“	AAAAA	BR02	“	A - - AA	SB11	“	AAAAA
E1517	“	AAAAA	E138	“	AAAAA	BR03	“	A - - AA	SB12	“	AAAAA
US01	อุดรธานี	AAAAA	E139	“	AAAAA	BR04	“	A - - AA	SB13	“	AAAAA
US04	“	AAAAA	E1310	“	AAAAA	BR07	“	A - - AA	SB15	“	AAAAA
US07	“	AAAAA	E141	“	AAAAA	BR08	“	A - - AA	4801	ธรรมชาติ	AAAAA
US08	“	AAAAA	E142	“	AAAAA	BR09	“	A - - AA	4802	“	BAAAA
US09	“	AAAAA	E143	“	AAAAA	BR10	“	A - - AA	4803	“	AAAAA
US11	“	AAAAA	E144	“	AAAAA	BR11	“	A - - AA	CS09	เข็ญราย	AAAAA
US12	“	AAAAA	E145	“	AAAAA	BR12	“	A - - AA	CS11	“	AAAAA
US13	“	AAAAA	E146	“	AAAAA	BR13	“	A - - AA	CS25	“	AAAAA
US14	“	AAAAA	E147	“	AAAAA	BR15	“	A - - AA	CS30	“	AAAAA
US15	“	AAAAA	E148	“	AAAAA	BR16	“	A - - AA	CS35	“	AAAAA
US18	“	AAAAA	LRL02	“	AAAAA	BR17	“	A - - AA	CS36	“	AAAAA
US19	“	AAAAA	LRL04	“	AAAAA	BR18	“	A - - AA	LF02	สถานีลพบุรี	CBBCB
E161	กาฬสินธุ์	AAAAA	LRL06	“	AAAAA	BR19	“	A - - AA	LF03	“	CBBCB
E162	“	AAAAA	LRL10	“	AAAAA	BR20	“	A - - AA	LF04	“	AAAAA
E165	“	AAAAA	LRL11	“	AAAAA	BR21	“	A - - AA	LF12	“	AAAAA
E166	“	AAAAA	LRD01	ลพบุรี2	AAAAA	BR24	“	A - - AA	LF13	“	AAAAA
E167	“	AAAAA	LRD02	“	AAAAA	BR25	“	A - - AA			
E168	“	AAAAA	LRD03	“	AAAAA	BR26	“	A - - AA			
E169	“	AAAAA	LRD04	“	AAAAA	BR27	“	A - - AA			

ตารางที่ 8 Haplotype frequency distribution among the samples (ND2 RFLP)

	Sampling area								
	AY	Br	CF	CS	E	LRL/D	SB	US	WG
Haplotype	(30)	(25)	(10)	(6)	(47)	(11)	(19)	(12)	(3)
AAAAA	30	25	10	6	42	11	17	12	2
BAAAA					1				1
AAABA					4				
CBBCB							2		

ตารางที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างประชากรจาก haplotype frequency

Source of variation	d.f.	Sum of square	Variance components	Percentage of variation
Among Populations	7	16.833	0.13416	26.91
Within populations	123	44.816	0.49852	73.09
Total	130	61.679		
Fixatin Index	Fst:	0.26912		

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

ตารางที่ 10 Nucleotide divergence (Nei and Li, 1979) ระหว่าง composite haplotype

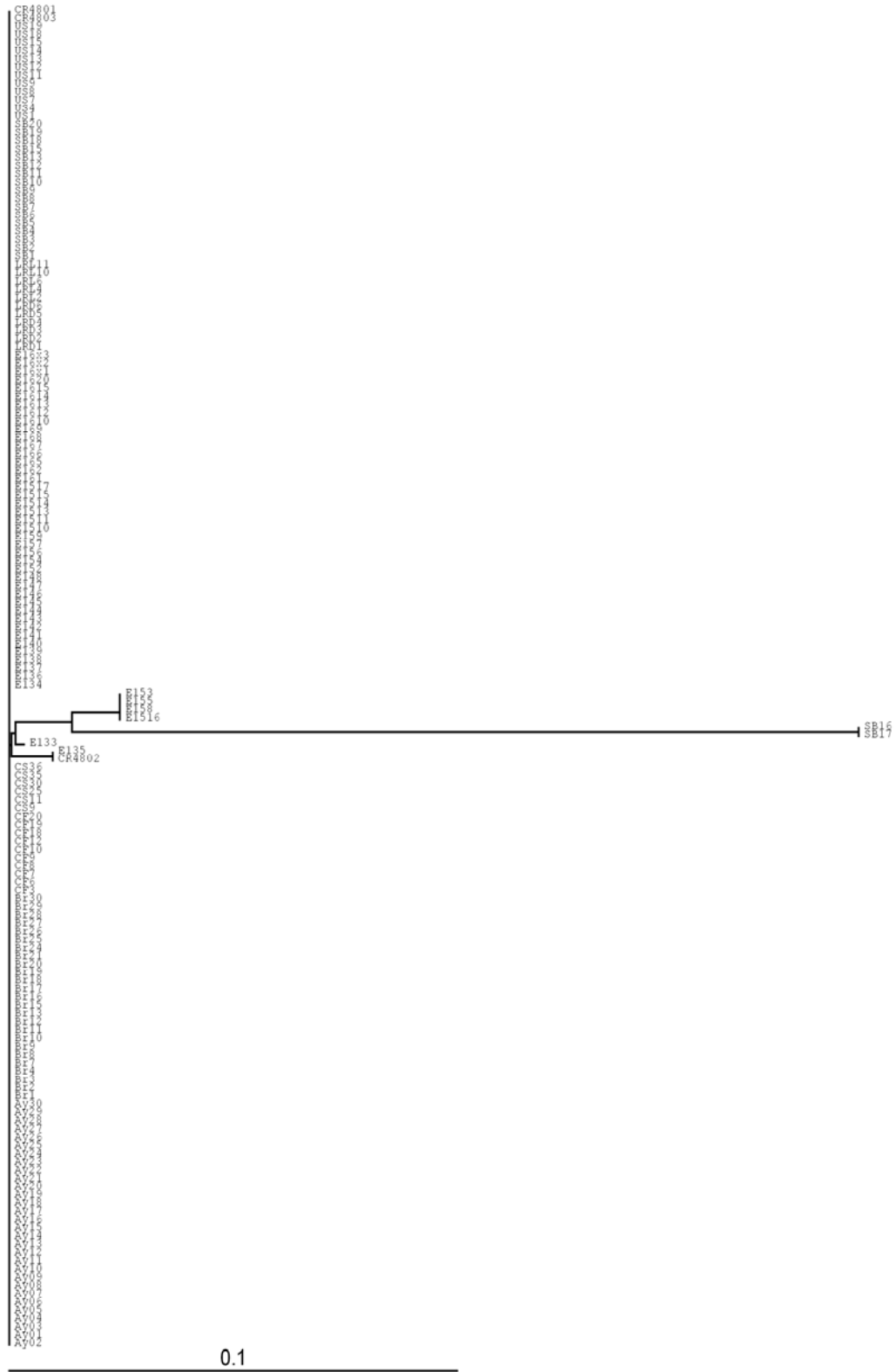
	AAAAA	BAAAA	AAABA	CBBCB
AAAAA				
BAAAA	0.0097			
AAABA	0.0247	0.0357		
CBBCB	0.1896	0.1931	0.1860	

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

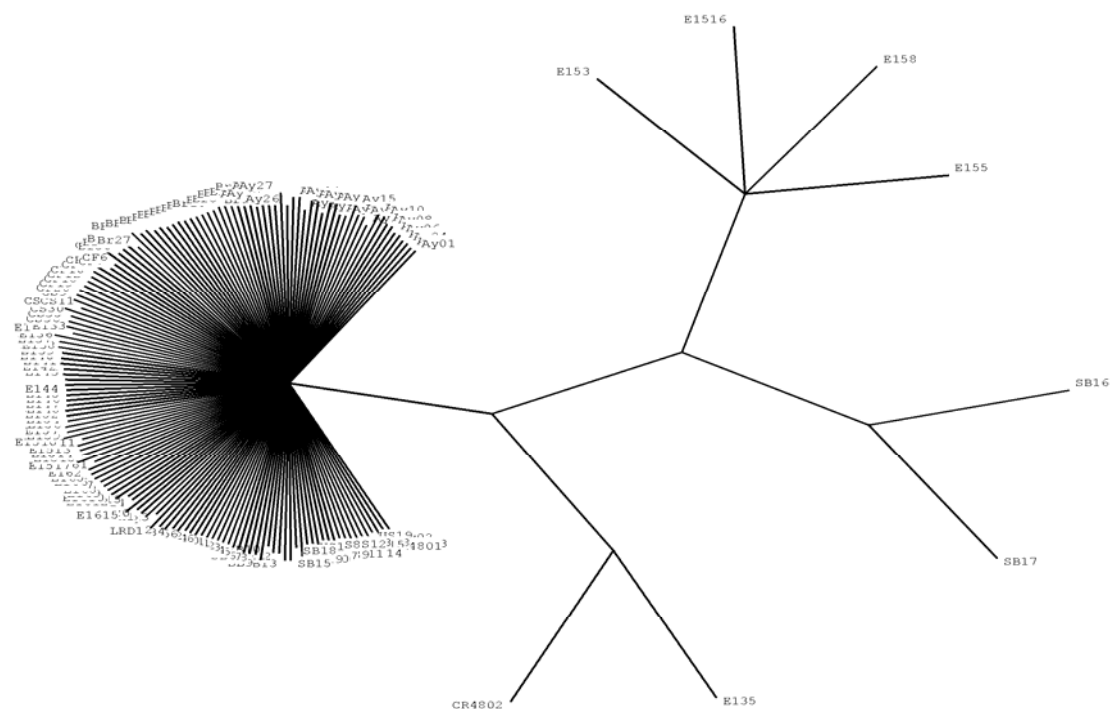
ตารางที่ 11 แสดงค่า gene diversity ภายในประชากร (ตามเส้นทแยงมุม) และ ค่า genetic difference ระหว่างประชากร(ใต้เส้นทแยงมุม)

	AY	Br	CF	CS	E	LR	SB	US	WG
AY	0.000								
Br	0.000	0.000							
CF	0.000	0.000	0.000						
CS	0.000	0.000	0.000	0.000					
E	0.039	0.039	0.039	0.039	0.198				
LR	0.000	0.000	0.000	0.000	0.039	0.000			
SB	0.193	0.193	0.193	0.193	0.156	0.193	0.198		
US	0.000	0.000	0.000	0.000	0.039	0.000	0.193	0.000	
WG	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.004	0.000	0.123	0.000	0.667

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$



รูปที่ 12 NJ tree คำนวณ genetic distance ด้วย Nei and Li (1979) ค่าเฉลี่ย genetic distance ของตัวอย่างทั้งหมด 163 เท่ากับ 0.00607



รูปที่ 13 Parsimony tree จาก *ND2* RFLP

4.4.2 การจำแนก haplotype ของปลาบึกโดยอาศัยบริเวณยีน *ND3 – ND4* และ *Cytb* + control region

เนื่องด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนยีน *ND3 – ND4* และ *Cytb* – Control region ประสบผลสำเร็จเฉพาะในส่วนของการหาลำดับ (E) และ อพยพ (AY) ซึ่งอาจเป็นเพราะว่า ลำดับดีเอ็นเอชิ้นดังกล่าวอาจยาวเกินไป ดังนั้นจึงไม่นำข้อมูลของ 2 ประชากรที่กล่าวแล้ว มาใช้ในการคำนวณต่างๆ แต่ haplotype ของปลาบึกที่จำแนกได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 12 และ ตารางที่ 13 ตามลำดับ

ตารางที่ 12 *ND3-ND4* haplotype

No.	sample	haplotype	No.	sample	haplotype
1	AY01	AAAAA	33	E135	AAAAA
2	AY02	AAAAA	34	E136	AAAAA
3	AY03	AAAAA	35	E136	AAAAA
4	AY04	AAAAA	36	E137	AAAAA
5	AY05	AAAAA	37	E137	AAAAA
6	AY06	AAAAA	38	E138	AAAAA
7	AY07	AAAAA	39	E139	AAAAA
8	AY08	AAAAA	40	E1310	AAAAA
9	AY09	AAAAA	41	E141	AAAAA
10	AY10	AAAAA	42	E143	AAAAA
11	AY11	AAAAA	43	E146	AAAAA
12	AY12	AAAAA	44	E147	AAAAA
13	AY13	AAAAA	45	E148	AAAAA
14	AY14	AAAAA	46	E1411	AAAAA
15	AY15	AAAAA	47	E153	AAAAA
16	AY16	AAAAA	48	E155	AAAAA
17	AY17	AAAAA	49	E156	AAAAA
18	AY18	AAAAA	50	E157	AAAAA
19	AY19	AAAAA	51	E158	AAAAA
20	AY20	AAAAA	52	E159	AAAAA
21	AY21	AAAAA	53	E1510	AAAAA
22	AY22	AAAAA	54	E1514	AAAAA
23	AY23	AAAAA	55	E1515	AAAAA
24	AY24	AAAAA	56	E1516	AAAAA
25	AY25	AAAAA	57	E1517	AAAAA
26	AY26	AAAAA	58	E161	AAAAA
27	AY27	AAAAA	59	E16x1	AAAAA
28	AY28	AAAAA	60	E162	AAAAA
29	AY29	AAAAA	61	E16x2	AAAAA
30	AY30	AAAAA	62	E166	AAAAA
31	E134	AAAAA	63	E167	AAAAA
32	E135	AAAAA	64	E168	AAAAA

ตารางที่ 13 *Cytb-CR* haplotype

No.	Sample	haplotype	No.	Sample	haplotype
1	AY01	AAAAA	27	AY27	AAAAA
2	AY02	AAAAA	28	AY28	AAAAA
3	AY03	AAAAA	29	AY29	AAAAA
4	AY04	AAAAA	30	AY30	AAAAA
5	AY05	AAAAA	31	E136	AAAAA
6	AY06	AAAAA	32	E137	AAAAA
7	AY07	AAAAA	33	E138	AAAAA
8	AY08	AAAAA	34	E139	AAAAA
9	AY09	AAAAA	35	E1310	AAAAA
10	AY10	AAAAA	36	E141	AAAAA
11	AY11	AAAAA	37	E142	AAAAA
12	AY12	AAAAA	38	E143	AAAAA
13	AY13	AAAAA	39	E146	AAAAA
14	AY14	AAAAA	40	E147	AAAAA
15	AY15	AAAAA	41	E148	AAAAA
16	AY16	AAAAA	42	E1410	AAAAA
17	AY17	AAAAA	43	E1411	AAAAA
18	AY18	AAAAA	44	E152	AAAAA
19	AY19	AAAAA	45	E154	AAAAA
20	AY20	AAAAA	46	E155	AAAAA
21	AY21	AAAAA	47	E1511	AAAAA
22	AY22	AAAAA	48	E1513	AAAAA
23	AY23	AAAAA	49	E1514	AAAAA
24	AY24	AAAAA	50	E1515	AAAAA
25	AY25	AAAAA	51	E1516	AAAAA
26	AY26	AAAAA	52	E1517	AAAAA

4.5 การจำแนก haplotype ปลาบึกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอบริเวณ control region

ดีเอ็นเอปลาบึกจากแหล่งต่างๆ จำนวน 131 ตัว ถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ control region ผลปรากฏว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ control region (D-loop) ได้ ผลปรากฏว่าบริเวณ control region ยาว 899 นิวคลีโอไทด์ ผลการเปรียบเทียบความแปรปรวนระหว่างลำดับทั้งหมดได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 14 nucleotide composition ประกอบด้วย A = 33.0 %, C = 22.3%, G = 13.8 % และ T = 30.9 % และความแปรปรวนอันเกิดจาก transition เป็นส่วนใหญ่ (TS:TV = 6.885) โดยนับ polymorphic site ได้ 45 ตำแหน่ง (5.00%) จากทั้งหมด 131 ตัวอย่าง เมื่อจำแนก haplotype ทั้งหมดได้ 48 haplotype ส่วนค่า haplotype diversity ของปลาจากประชากรต่างๆแปรปรวนตั้งแต่ 0.549 ในประชากรบุรีรัมย์ (BR) ถึง 1.000 ในประชากรปลาธรรมชาติ แต่ก็มีเพียง 3 ตัวและมี 3 haplotype ซึ่งมีจำนวนน้อยเกินไป ดังนั้น ค่า haplotype diversity ควรอยู่ระหว่าง 0.549 - 0.945 โดยค่าเฉลี่ยของทั้งหมด เท่ากับ 0.9484 (ตารางที่ 15) เมื่อจัดกลุ่มประชากรปลาบึกออกเป็น 8 กลุ่มโดยให้ปลาธรรมชาติ (WG) และปลาจำนวนน้อยเป็นกลุ่มรวม (M = miscellaneous) แล้วคำนวณค่า nucleotide diversity (π) ภายในประชากรมีค่าอยู่ระหว่าง 0.0032 ถึง 0.0104 ในประชากรอยุธยาและกลุ่มรวมและในประชากรธรรมชาติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.0079 (ตารางที่ 14) แสดงว่าประชากรธรรมชาติถึงแม้จะมีอยู่เพียง 3 ตัวก็มีค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบค่า haplotype diversity และ nucleotide divergence (D_{xy}) ระหว่างประชากร (F_{st}) (ตารางที่ 16 และ 17) พบว่ามีความแปรปรวนระหว่างประชากรอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) แสดงว่าในแต่ละประชากรเหล่านี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ เพียงแต่บางประชากรอาจจะมีจำนวนน้อยเกินไป

ค่า nucleotide diversity (π) ที่ได้นี้สูงกว่าของปลาบึกธรรมชาติที่ Na-Nakorn *et al.* (2006) รายงานไว้ว่า haplotype diversity และ nucleotide diversity มีค่า 0.350 และ 0.0009 ตามลำดับเมื่อประมาณการจากลำดับ 16S rRNA แต่ค่าที่คำนวณได้นี้มีค่าใกล้เคียงกับ endangered Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) ซึ่งมีค่า h และ π เท่ากับ 0.949 และ 0.011 (Zhang, *et al.*, 2003) แต่ค่า π ของปลาบึกที่คำนวณนี้สอดคล้องกับปลา Tasmania mudfish (*Galaxias (Neochanna) cleaveri*) ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.0027 – 0.0116 ในนิวซีแลนด์ (Gleeson *et al.*, 1999) ซึ่งปลาดังกล่าวนี้อยู่ในบริเวณที่มีลักษณะพิเศษทางธรณีวิทยา (geological condition) แต่น้อยกว่าในปลาธรรมชาติอื่นๆ เช่น ในปลาไหลญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*) (Ishikawa *et al.*, 2001) ซึ่งมีค่าระหว่าง 0.0107 – 0.0163 ปลา narrow-barred spanish meckerel (*Scomberomorus commerson*) (Hoolihan *et al.*, 2006) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยที่ 0.025 และปลาไน (*Cyprinus carpio*) เพาะเลี้ยงในเวียดนาม ซึ่งมีค่า π อยู่ระหว่าง 0.01 – 0.92 (Thai *et al.*, 2006) ซึ่งปลา 2 ชนิดแรกเป็นธรรมชาติ ส่วนชนิดหลังเป็นปลาเพาะเลี้ยงก็ยังมีค่า nucleotide diversity สูงกว่าของปลาบึกที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงปลาบึกซึ่งกระจายอยู่เพียงบริเวณแม่น้ำโขงและแม่น้ำสาขา (Hogan *et al.*, 2004) และปลาบึกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นลูกปลาบึกที่ได้จากเพาะปลาพ่อ-แม่พันธุ์สมบูรณ์เพศชายและจับได้บริเวณ อ.เชียงของ ไม่ใช่ประชากรธรรมชาติที่แท้จริง จึงทำให้ค่า

nucleotide diversity มีค่าค่อนข้างต่ำและปลาบึกที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่แล้วไม่มีข้อมูลบันทึกไว้ได้จากการผสมพันธุ์ในป่าและจากพ่อแม่คู่ไหนบ้าง

ตารางที่ 19 แสดง การกระจายของ haplotype แบบต่างๆในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งตัวอย่างปลาแต่ละตัวมี haplotype ใดก็สามารถทราบได้จากตารางนี้ ความแตกต่างระหว่าง haplotype สูงสุดอยู่ที่ 6 นิวคลีโอไทด์ คือ ระหว่าง haplotype g43(LRD3) และ g26(E135) ความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype แสดงไว้ใน Bubble diagram of minimum spanning tree(รูปที่ 15)ซึ่งเทียบกับกรณี the most parsimonious network อื่นๆ ซึ่งให้เห็นว่า haplotype ทั้งหมดจัดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม (cluster) ซึ่งห่างกันถึง 6 นิวคลีโอไทด์ (ซึ่งเท่ากับ 0.6674 % ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ control region) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่าง haplotype g26 และ g43 เป็นตัวแทนของปลา 2 ประชากรที่แยกกันอยู่นานแล้ว ตามข้อสมมติฐานของ Hogan *et al.* (2004) ว่าประชากรปลาบึกน่าจะมียู 2 คือ ประชากรปลาหลวงพระบางและประชากรในทะเลสาบเขมร แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า haplotype g17(CS14) และ g20(CS22) ต่างกันก็ห่างกัน 6 นิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกัน แต่ haplotype ของปลาทั้งสองตัวหลังนี้ ได้วิวัฒนาการจาก haplotype g26 และจะเป็นตัวแทนของปลาในกลุ่มใดไม่อาจทราบได้ ในเมื่อปลาบึกที่เลี้ยงในประเทศไทยไม่มีพันธุ์ประวัติ (pedigree) ที่จะบอกแหล่งที่มาของพ่อแม่พันธุ์จึงมีอาจคาดเดาได้

เมื่อวิเคราะห์ analysis of molecular variance (AMOVA) ด้วยโปรแกรม AREQUIN version 3.0 เพื่อทดสอบความแปรปรวนของ nucleotide diversity พบว่าแต่ละประชากรมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 17 และ 18) ซึ่งพบว่าความแปรปรวนภายในประชากร 47.48 % และระหว่างประชากรมีเพียง 52.52 % เมื่อพิจารณาควบคู่กับการกระจายของ haplotype ในตารางที่ 19 จะเห็นว่าการกระจายของ haplotype ส่วนใหญ่น่าจะมาจากปลาของสถานีประมงเชียงรายมีถึง 10 haplotype (จากปลาทั้งหมด 14 ตัว) และปลาจากสถานีประมงกาฬสินธุ์มี 13 haplotype (จากปลา 40 ตัว) ซึ่งปลาจาก 2 ประชากร(สถานี)นี้มีความหลากหลายของ haplotype สูงสุด

เมื่อนำเอาค่า nucleotide divergence ระหว่าง mt-haplotype ของปลาบึกทั้ง 131 ตัว มาสร้าง Neighbor joining (NJ) phylogenetic tree (รูปที่ 16) พบว่าปลาทั้งหมดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลัก(major clade) โดยกลุ่มแรก(ด้านล่าง) มีปลาบึก 2 ตัว คือ AY1 และ AY15 ซึ่งตามประวัติเป็นปลารุ่น F2 จึงอาจเป็นไปได้ว่า ปลาทั้ง 2 ตัวมาจากแม่รุ่นแรก(ลูก F1)ตัวเดียวกันซึ่งได้รับมานานแล้ว ส่วนกลุ่มที่สอง(ด้านบน) ซึ่งเป็นกลุ่มอันประกอบด้วยทุกประชากรบุรีรัมย์ซึ่งมาจาก 1 สายพันธุ์แม่ (maternal lineage) ที่น่าสนใจ คือ กลุ่มสุดท้าย ซึ่งประกอบด้วยมาจากหลายสายพันธุ์แม่ ซึ่งรวมทั้งปลาธรรมชาติ 3 ตัว(CR 4801-4803) อยู่ในกลุ่มนี้ด้วย ความเป็นไปได้ปลา 3 ตัวจากธรรมชาติอาจเป็นลูกปลารุ่นแรกๆที่กรมประมงปล่อยลงสู่แม่น้ำโขงโตเต็มที่ถึงวัยผสมพันธุ์ จึงเดินทางกลับมาวางไข่ที่บริเวณอำเภอเชียงของหรือเป็นปลาธรรมชาติที่เป็นปลารุ่นเดียวกับแม่ปลาที่เคยจับได้มาก่อนแล้ว ถึงอย่างไรก็ตาม ปลาที่ศึกษาทั้งจากส่วนของกรมประมงและความเอื้อเฟื้อจากหลายสายพันธุ์แม่(maternal lineage)

การจะวางแผนการผสมพันธุ์ในอนาคตจะต้องคำนึงสายพันธุ์แม่ที่น่าเสนอไว้นี้ เพื่อหลีกเลี่ยงการผสมเลือดชิด (inbreeding) อันจะก่อให้เกิดความล้มเหลวทางพันธุกรรม (genetic erosion) สำหรับกรณีที่แต่ละสถานีประมงจะดำเนินการผสมพันธุ์ระหว่างปลาภายในสถานีก็จะสร้างพันธุ์ปลาที่ผสมเลือดชิดเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เพราะเกือบทุกสถานีได้รับลูกปลาจากแม่เดียวกัน เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นสถานีประมงเชียงราย (CS) และสถานีประมงกาฬสินธุ์ (E) ที่มีปลาจากหลายสายพันธุ์แม่ (maternal lineage- รูปที่ 15) และมีจำนวน haplotype แตกต่างกันมาก (ตารางที่ 19) ซึ่งจากข้อมูลที่ได้รับมา สถานีประมงเชียงรายเป็นแหล่งรวมลูกปลาบึกสถานที่แรกที่ประสบผลสำเร็จในการผสมปลาจากอำเภอเชียงของ ปลาบึกในประชากรทั้ง 2 นี้ น่าสนใจ ควรจัดการปลาบึกเหล่านี้ไว้ผสมพันธุ์เพื่อเป็น captive breeding stock ในการดำเนินการดังกล่าว ผลการวิจัยครั้งนี้แนะนำได้ไม่มากนัก ทั้งนี้เพราะ ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอถ่ายทอดผ่านทางแม่ฝ่ายเดียว (maternally inherited) ดังนั้นต้องคำนวณหา effective female population size (N_{ef}) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร $\theta = 2N_{ef}v$ เมื่อ $v = m\mu$ (Zhang *et al.*, 2003) และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลแม่พันธุ์ที่วางไข่ในละปี (N_f) ซึ่งข้อมูลที่กล่าวแล้วยังไม่มี และอีกประการหนึ่งโครงการวิจัยนี้ไม่ได้วางแผนไว้ จึงไม่อาจประมาณการ effective female population size (N_{ef}) ได้ แต่ถึงอย่างไรก็ตามแนวทางนั้นพอมีอยู่ Sripairoj *et al.* (2006) ได้ศึกษาปลาบึกโดยใช้ microsatellite markers และได้เสนอหนทางจัดการทางพันธุกรรมปลาบึกไว้ว่า จะต้องมีการผสมพันธุ์ (N_e = effective population size) อย่างน้อย 100 ตัวในแต่ละชั่วอายุ (generation) ในการจะรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาบึกให้คงอยู่มากกว่า 90 % เป็นระยะเวลา 4 ชั่วอายุ ซึ่งก็เป็นเรื่องยากอยู่มากในการจะหาผสมปลาบึกที่ พันธุกรรมที่หลากหลายดังกล่าวได้ ดังนั้นผู้วิจัยใครขอเสนอให้กรมประมงวางแผนความร่วมมือระหว่างสถานีประมงต่างๆ ให้สร้าง captive breeding stock ร่วมกันในอนาคต จากปลาที่มาจากสถานีประมงต่างๆ แต่จะต้องให้ความสนใจในรายละเอียดของข้อมูลพันธุกรรมให้มากเพื่อจะได้รักษาทรัพยากรพันธุกรรมให้อยู่ยั่งยืน ซึ่งทางโครงการจะส่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ กลับคืนไปให้สถานีประมงที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพราะปลาบึกที่ร่วมในการศึกษาครั้งนี้ได้ฝังไมโครชิปไว้แล้วจึงบอกได้ว่าปลาดังกล่าวนี้มี haplotype (genotype) อะไรบ้าง

ตารางที่ 14 แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ใน control region ที่แปรปรวน(variable sites)

		Nucleotide positions
		111111111111223333444455555666666666777788
		669122245567889591348344616889014456789455845
Sample	haplotype	490901386928275830456649049565984939195778349
AY1	g01	GTCTCATGCCCTCCCCGCCGTACCAATTTGTCCGGTTCCGAGA
AY2	g02	A.T....A.T.....G..G.C.C.....
AY3	g03	AC.....G.....
AY4	g02	A.T....A.T.....G..G.C.C.....
AY6	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY7	g05	A.T....A.T.....G..G.C.C.....C.....
AY8	g02	A.T....A.T.....G..G.C.C.....
AY9	g02	A.T....A.T.....G..G.C.C.....
AY10	g02	A.T....A.T.....G..G.C.C.....
AY11	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY12	g02	A.T....A.T.....G..G.C.C.....
AY13	g02	A.T....A.T.....G..G.C.C.....
AY14	g02	A.T....A.T.....G..G.C.C.....
AY15	g01	
AY16	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY17	g06	A.....A.T.T...T.....G..G.CCC.....
AY18	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY19	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY20	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY21	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY22	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY23	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY24	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY25	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY26	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY27	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY28	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY29	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
AY30	g04	A.....A.T....T.....G..G.CCC.....
BR1	g07	A.....A.....A.G.T..C.CC...AA....G..
BR3	g08	C.....G..
BR4	g08	C.....G..
BR7	g08	C.....G..
BR8	g08	C.....G..
BR9	g08	C.....G..
BR10	g08	C.....G..
BR11	g08	C.....G..
BR12	g08	C.....G..
BR13	g08	C.....G..
BR15	g09	A.T....A.T.....G..G.C.CC....C...G..
BR16	g09	A.T....A.T.....G..G.C.CC....C...G..
BR17	g08	C.....G..
BR18	g08	C.....G..
BR20	g10	A.....A.T.....A.G....C.CC.....G..
BR24	g08	C.....G..
BR25	g11	A.....A.T....T..T...G..G.C.CC.....G..
BR29	g09	A.T....A.T.....G..G.C.CC....C...G..
CS8	g15	A.....T..A....G.....C.....A..A...
CS9	g16	A.....A.....TA.G....C.CC...A.....G..
CS11	g16	A.....A.....TA.G....C.CC...A.....G..
CS14	g17	A.....A.T....TT...A.G..G.C.CC.C.TA..A..A.C.
CS16	g18	A.....T..A....G.....C.....A..A...
CS17	g19	A.....A.....A.G.T..C.CC...A.....A...
CS22	g20	A.....A.T....T..T...G..G.C.CC.C.....A.C.
CS25	g21	A.....T.....G.....C.....
CS26	g22	A.....T..A....G.....C.....A..A...
CS30	g21	A.....T.....G.....C.....
CS32	g23	A.....GT.....C.....A..A...
CS35	g21	A.....T.....G.....C.....
CS36	g24	A.T....A.T....A....G..G.C.CC.....A...
CS38	g15	A.....T..A....G.....C.....A..A...
E131	g25	A.....A.....A.G.T..C.CC...A.....
E134	g25	A.....A.....A.G.T..C.CC...A.....
E135	g26	A.....A.T.....A.G....C.CC.....
E136	g25	A.....A.....A.G.T..C.CC...A.....
E137	g25	A.....A.....A.G.T..C.CC...A.....

ตารางที่ 15 แสดงจำนวนปลาบึก(N) จากสถานที่ต่างๆ จำนวน haplotype (Nh) ค่า haplotype diversity (h) และ ค่า nucleotide diversity(π)

Sample	N	Nh	h	π
AY	29	6	0.6330	0.0032
BR	18	5	0.5490	0.0050
CS	14	10	0.9451	0.0085
E	40	13	0.7782	0.0041
SB	10	5	0.7556	0.0042
US	8	10	0.6071	0.0036
WG	3	3	1.0000	0.0104
M	9	5	0.8611	0.0032
Total	131	48	0.9484	0.0079

ตารางที่ 16 แสดง nucleotide diversity ภายในประชากร(ตามเส้นทแยงมุม) และ nucleotide difference ระหว่างประชากร (ด้านล่างเส้นทแยงมุม)

Sample	AY	BR	CS	E	SB	US	WG	M
AY	0.0032							
BR	0.0097	0.0050						
CS	0.0104	0.0094	0.0085					
E	0.0085	0.0086	0.0091	0.0041				
SB	0.0102	0.0061	0.0080	0.0090	0.0042			
US	0.0054	0.0077	0.0085	0.0074	0.0077	0.0036		
WG	0.0074	0.0093	0.0094	0.0087	0.0084	0.0077	0.0104	
M	0.0106	0.0064	0.0082	0.0094	0.0050	0.0075	0.0093	0.0032

* = Significant NS = Non-significant

ตารางที่ 17 แสดงค่า Fst ผลการทดสอบความแตกต่าง ระหว่างประชากรจากความแตกต่างนิวคลีโอไทด์ (nucleotide difference)

	AY	BR	CS	E	SB	US	WG	M
AY	-							
BR	0.591 [*]	-						
CS	0.487 [*]	0.292 [*]	-					
E	0.565 [*]	0.481 [*]	0.354 [*]	-				
SB	0.652 [*]	0.233 [*]	0.191 [*]	0.537 [*]	-			
US	0.382 [*]	0.422 [*]	0.251 [*]	0.462 [*]	0.484 [*]	-		
WG	0.318 [*]	0.298 ^{NS}	0.022 ^{NS}	0.355 [*]	0.262 ^{NS}	0.422 [*]	-	
M	0.697 [*]	0.341 [*]	0.258 [*]	0.587 [*]	0.250 [*]	0.550 [*]	0.341 [*]	-

* = Significant NS = Non-significant

ตารางที่ 18 แสดงผลการวิเคราะห์ AMOVA ความแปรปรวนระหว่างประชากรต่างๆจาก nucleotide diversity

Source of variation	d.f.	Sum of square	Variance components	Percentage of variation
Among Populations	7	213.131	1.86629 Va	47.48
Within populations	123	253.902	2.06424 Vb	52.52
Total	130	467.033	3.93053	

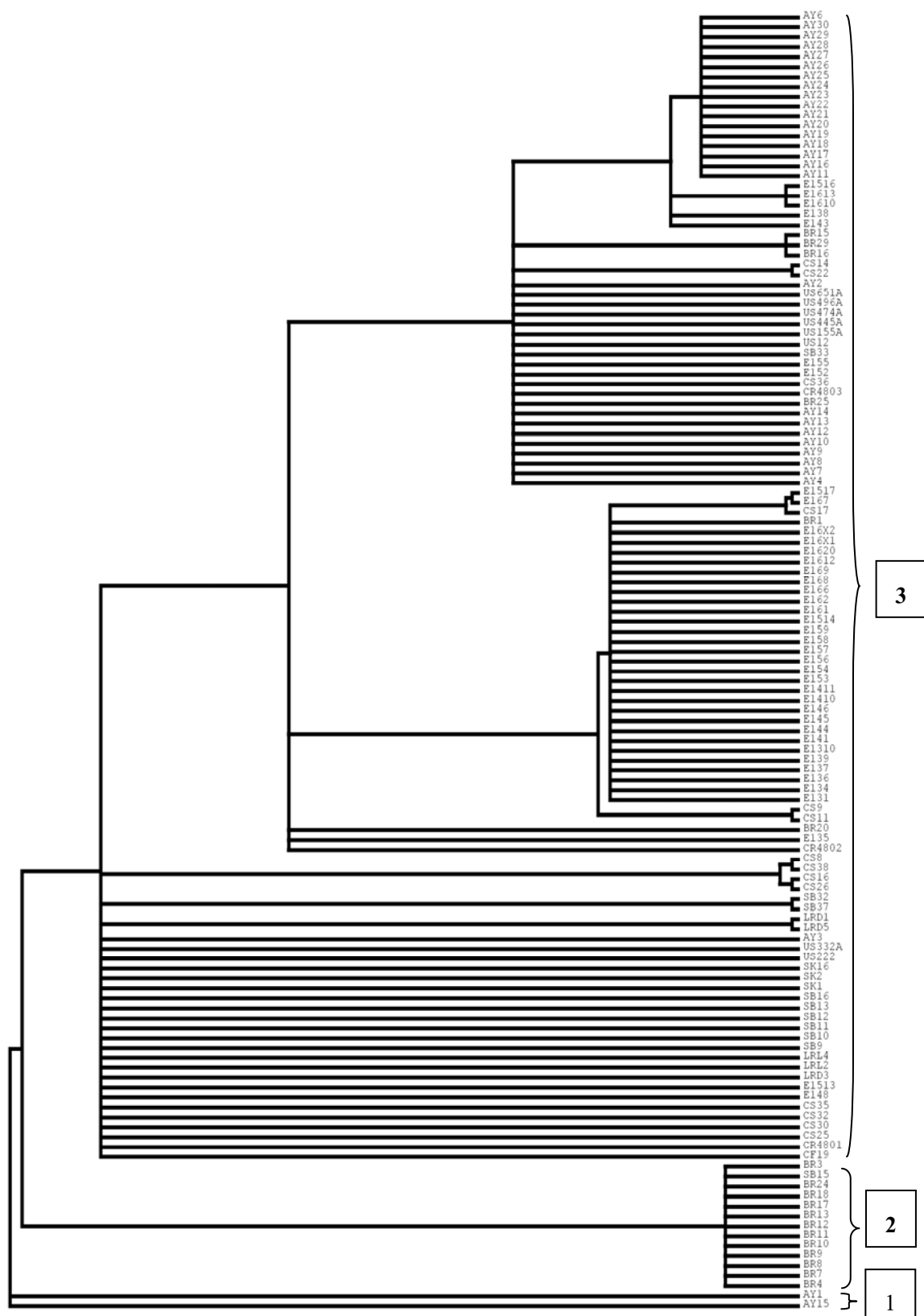
Fixation Index Fst: 0.47482

Significance tests (1023 permutations)

Va and FST :P(rand. value > obs. value) = 0.00000
P(rand. value = obs. value) = 0.00000
P(rand. value >= obs. value) = 0.00000+0.00000

ตารางที่ 19 Haplotype frequency distribution among the samples

Haplotype:	Sampling location (Number of samples)							
	AY (n = 29)	BR (n = 18)	WG (n = 3)	CS (n = 14)	E (n = 40)	SB (n = 10)	US (n = 8)	M (n = 9)
g01	2							
g02	8							
g03	1							
g04	16							
g05	1							
g06	1							
g07		1						
g08		12				1		
g09		3						
g10		1						
g11		1						
g12			1					
g13			1					
g14			1					
g15				2				
g16				2				
g17				1				
g18				1				
g19				1				
g20				1				
g21				3				
g22				1				
g23				1				
g24				1				
g25					15			
g26					1			
g27					2			
g28					1			
g29					1			
g30					1			
g31					12			
g32					1			
g33					1			
g34					1			
g35					1			
g36					1			
g37					2			
g38						5		
g39						1		
g40						2		
g41						1		
g42							5	
g43							2	2
g44							1	
g45								3
g46								1
g47								1
g48								2



รูปที่ 15 Neighbor-joining tree ประมาณการจากค่า nucleotide divergence ของ mt-haplotype ที่รวบรวมได้จากแหล่งต่างๆทั้งหมด จำนวน 131 ตัว

5. ข้อสรุป

1. การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของไมโทคอนเดรียของปลาบึก พบว่าขนาด 16,533 นิวคลีโอไทด์ อันประกอบด้วยยีนควบคุมการสร้างโปรตีน 13 ชนิด ทีอาร์เอ็นเอ(tRNA) 22 ชนิด ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) 2 ชนิด และบริเวณควบคุม (control region) ซึ่งมีโครงสร้างเหมือนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของปลากระดูกแข็งอื่นๆทั่วไป ข้อมูลในไมโทคอนเดรียสามารถใช้ในการวิเคราะห์เชิงวิวัฒนาการ เช่น กำหนดตำแหน่งเชิงวิวัฒนาการของปลาบึก (*P. gigas*) และเพื่อสืบค้นความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาวงศ์อื่นๆ ในอันดับไซลูริฟอร์ม (Order Siluriformes)

2. ได้ดำเนินการออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 3 คู่ คือ P13 – P14 เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับยีน *ND2* , P15 – P16 สำหรับยีน *ND3-ND4* และ P17-P18 สำหรับยีน *Cytochrome b* + control region และการทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *ND2* , *ND3-ND4* และยีน *Cytochrome b* + control region ได้ขนาดประมาณ 1,300, 2,300 และ 2,400 คู่เบส ตามลำดับ แต่เกิดปัญหากับกรณีไพรเมอร์คู่ที่ 3 ทั้งนี้เพราะเกิดการเพิ่มปริมาณ nonspecific band ขึ้นมาด้วย ซึ่งเมื่อทำ optimization PCR condition มีผลเพียงลดความเข้มข้นของ non-specific band ให้จางลงไปได้บ้าง แต่ไม่หมดไป จึงได้ออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่ คือ ไพรเมอร์ P19 และ P20 เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณรวม *Cytochrome b* + control region และเมื่อนำไพรเมอร์คู่ใหม่ P19 – P20 ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองก็สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,200 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งไม่มี nonspecific band ปรากฏขึ้นเลย ซึ่งได้นำไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อการศึกษาจำแนก haplotype ปลาบึกตัวอย่าง

3. ในการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างปลาบึกจากแหล่งเลี้ยงต่างๆ คือ สถานีประมงกาฬสินธุ์ เชียงราย สระแก้ว ศูนย์วิจัยประมงแห่งชาติ อุดรฯ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดอุดรธานี ศูนย์พัฒนาและทดสอบพันธุ์ประมงบุรีรัมย์ และ ฟาร์มปลาเอกชน คือ จรัลฟาร์ม เชียงราย และฟาร์มปลาเอกชนในลพบุรีและสิงห์บุรี และรวมทั้งปลาบึกที่รวบรวมได้ในฤดูกาล จำนวน 3 ตัว รวมทั้งหมด 302 ตัว นำมาจำแนกทางพันธุกรรม

4. ในการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมปลาบึกที่ไม่ทราบประวัติตามแหล่งเลี้ยงต่างๆ ตามรูปแบบของ haplotype ได้ดำเนินการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูล PCR-RFLP ของยีน *ND2* และ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ control region โดยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

4.1 กรณี PCR-RFLP ของยีน *ND2* ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *ND2* โดยวิธี PCR ได้ PCR product ขนาดประมาณ 1,376 bp PCR product ที่ได้ถูกนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ประเภท 4 cutter คือ *AciI*, *DpnII*, *HaeIII*, *TasI* และ *TruII* และนำเอา fragment length pattern ของแต่ละเอนไซม์มารวมกันเป็น composite haplotype ของปลาบึกแต่ละตัว ซึ่งเมื่อรวมทุกประชากรแล้วสามารถจำแนก haplotype ของปลา 163 ตัว แต่จำแนกได้เพียง 4 haplotype เท่านั้น

ความแตกต่างระหว่าง haplotype พบเพียงใน 3 ประชากรเท่านั้นคือ ประชากรกาฬสินธุ์มี 3 haplotype ส่วนประชากรสิงห์บุรี (SB) และ ประชากรธรรมชาติมี 2 haplotype เท่านั้น เมื่อวิเคราะห์ haplotype frequency และวิเคราะห์ AMOVA พบว่าไม่มีประชากรใดที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เหตุผลอาจเนื่องจากขึ้นดีเอ็นเอที่เลือก (ND2) มีความแปรปรวนในตำแหน่งตัด (restriction site) น้อย ผลการวิเคราะห์ค่า gene diversity พบว่ามีค่าระหว่าง 0.000-0.0667 แต่ค่า gene diversity ของปลาธรรมชาติ (WG) มีค่า 0.667 ซึ่งได้จากปลาเพียง 3 ตัวเท่านั้น ดังนั้นค่า gene diversity ที่น่าเชื่อถือ คือ 0.000-0.198 แต่ผลการวิเคราะห์ nucleotide divergence ระหว่าง haplotype ทั้ง 4 พบว่าจะมีอยู่ระหว่าง 0.0097 ถึง 0.1931 และค่า nucleotide divergence ค่าที่สุดคือ ระหว่าง AAAAA และ BAAAA ส่วนสูงสุดระหว่าง BAAAA และ CBBCB แต่มีจำนวนอยู่เพียง 3 ตัวเท่านั้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่า 2 composite haplotype ทั้งสองอยู่ห่างกัน เมื่อใช้ค่า genetic distance มาสร้างเป็น phylogenetic (NJ) tree ระหว่างประชากร พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มหลักเท่านั้นซึ่งแสดงแหล่งที่มา 4 สายพันธุ์แม่ (maternal lineage) เท่านั้น

4.2 กรณีการจำแนกประชากรโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ control region ดีเอ็นเอปลาบึกจากแหล่งต่างๆ จำนวน 131 ตัว ถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ control region ผลปรากฏว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ control region (D-loop) ได้ ผลปรากฏว่าบริเวณ control region มีความยาว 899 นิวคลีโอไทด์ ผลการเปรียบเทียบความแปรปรวนระหว่างลำดับทั้งหมดพบว่า nucleotide composition ประกอบด้วย A = 33.0 %, C = 22.3%, G = 13.8 % และ T = 30.9 % และความแปรปรวนอันเกิดจาก transition เป็นส่วนใหญ่ (TS:TV = 6.885) โดยนับ polymorphic site ได้ 45 ตำแหน่ง (5.00%) จากทั้งหมด 131 ตัวอย่าง เมื่อจำแนก haplotype ทั้งหมดได้ 48 haplotype ส่วนค่า haplotype diversity ของปลาจากประชากรต่าง ๆ แปรปรวนตั้งแต่ 0.549 ในประชากรบุรีรัมย์ (BR) ถึง 1.000 ในประชากรปลาธรรมชาติ แต่ก็มีเพียง 3 ตัวและมี 3 haplotype ซึ่งมีจำนวนน้อยเกินไป ค่า haplotype diversity ควรอยู่ระหว่าง 0.549 - 0.945 โดยค่าเฉลี่ยของทั้งหมด เท่ากับ 0.9484 เมื่อจัดกลุ่มประชากรปลาบึกออกเป็น 8 กลุ่ม โดยให้ปลาธรรมชาติ (WG) และปลาจากแหล่งต่างๆที่มีจำนวนน้อยรวมเป็นกลุ่ม M (M = miscellaneous) แล้วคำนวณค่า nucleotide diversity (π) พบว่าภายในประชากรมีค่าอยู่ระหว่าง 0.0032 ถึง 0.0104 ในประชากรอยุธยาและกลุ่มรวมและในประชากรธรรมชาติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.0079 แสดงว่าประชากรธรรมชาติถึงแม้จะมีอยู่เพียง 3 ตัวก็มีค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบค่า haplotype diversity และ nucleotide divergence (Dxy) ระหว่างประชากร (Fst) พบว่ามีความแปรปรวนระหว่างประชากรอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) แสดงว่าในแต่ละประชากรเหล่านี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ เพียงแต่บางประชากรอาจจะมีจำนวนน้อยเกินไป

ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงปลาบึกซึ่งกระจายอยู่เพียงบริเวณแม่น้ำโขงและแม่น้ำสาข (Hogan *et al.*, 2004) และปลาบึกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นลูกปลาบึกที่ได้จากเพาะปลาพ่อ-แม่พันธุ์สมบูรณ์เพศชายและจับได้บริเวณ อำเภอยางชุมน้อย จังหวัดศรีสะเกษเท่านั้น ไม่ใช่ประชากรปลาธรรมชาติที่แท้จริง จึงทำ

ให้ค่า nucleotide diversity มีค่าค่อนข้างต่ำและปลาบึกที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่แล้วไม่มีข้อมูลบันทึกไว้ได้จากการผสมพันธุ์ในปีใดและจากพ่อแม่คู่ไหนบ้าง

การกระจายของ haplotype แบบต่างๆในกลุ่มตัวอย่าง ความแตกต่างระหว่าง haplotype สูงสุดอยู่ที่ 6 นิวคลีโอไทด์ คือ ระหว่าง haplotype g43(LRD3) และ g26(E135) ความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype แสดงไว้ใน Bubble diagram of minimum spanning tree ซึ่งเทียบได้กับกรณี most parsimonious network อื่นๆ ซึ่งให้เห็นว่า haplotype ทั้งหลายจัดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม (cluster) ซึ่งห่างกันถึง 6 นิวคลีโอไทด์ (ซึ่งเท่ากับ 0.6674 % ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ control region) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่าง haplotype g26 และ g43 เป็นตัวแทนของปลา 2 ประชากรที่แยกกันอยู่กันมานานแล้ว ตามข้อสมมติฐานของ Hogan *et al.* (2004) ว่าประชากรปลาบึกน่าจะมียู 2 คือ ประชากรปลาหลวงพระบาง และประชากรในทะเลสาบเขมร แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า haplotype g17(CS14) และ g20(CS22) ต่างกันก็ห่างกัน 6 นิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกัน แต่ haplotype ของปลาทั้งสองตัวหลังนี้ ได้วิวัฒนาการจาก haplotype g26 และจะเป็นตัวแทนของปลากลุ่มใดไม่อาจทราบได้ ในเมื่อปลาบึกที่เลี้ยงในประเทศไทยไม่มีพันธุ์ประวัติ (pedigree) ที่จะบอกแหล่งที่มาของพ่อแม่พันธุ์จึงมีอาจคาดเดาได้

เมื่อวิเคราะห์ analysis of molecular variance (AMOVA) ด้วยโปรแกรม AREQUIN version 3.0 เพื่อทดสอบความแปรปรวนของ nucleotide diversity พบว่าแต่ละประชากรมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งพบว่าความแปรปรวนภายในประชากร 47.48 % และระหว่างประชากรมีเพียง 52.52 % เมื่อพิจารณาควบคู่กับการกระจายของ haplotype ในตารางที่ 19 จะเห็นว่าการกระจายของ haplotype ส่วนใหญ่น่าจะมาจากปลาของสถานีประมงเขียงรายมีถึง 10 haplotype (จากปลาทั้งหมด 14 ตัว) และปลาจากสถานีประมงกาฬสินธุ์มี 13 haplotype (จากปลา 40 ตัว) ซึ่งแสดงว่าปลาจาก 2 ประชากร(สถานี)นี้มีความหลากหลายของ haplotype สูงสุด

เมื่อนำเอาค่า nucleotide divergence ระหว่าง mt-haplotype ของปลาบึกทั้ง 131 ตัว มาสร้าง Neighbor joining(NJ) phylogenetic tree พบว่าปลาทั้งหมดแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มหลัก(major clade) เช่นเดียวกับการจำแนกโดยใช้ ND2 โดยกลุ่มแรก(ด้านล่าง) มีปลาบึก 2 ตัว คือ AY1 และ AY15 ซึ่งตามประวัติเป็นปลารุ่น F2 จึงอาจเป็นไปได้ว่า ปลาทั้ง 2 ตัวมาจากแม่รุ่นแรก(ลูก F1) ตัวเดียวกันซึ่งได้รับมานานแล้ว ส่วนกลุ่มที่สอง(ด้านบน) ซึ่งเป็นกลุ่มใหญ่อันประกอบด้วยทุกประชากร แต่คาดว่ามาจาก 3 สายพันธุ์แม่(maternal lineage) ที่น่าสนใจ ปลาธรรมชาติ 3 ตัว(CR 4801-4803) อยู่ในกลุ่มข้างบนด้วยกรณีนี้ ความเป็นไปได้ปลา 3 ตัวจากธรรมชาติอาจเป็นลูกปลารุ่นแรกๆที่กรมประมงปล่อยลงสู่แม่น้ำโขงโตเต็มที่ถึงวัยผสมพันธุ์ จึงเดินทางกลับมาวางไข่ที่บริเวณอำเภอเขียงของ หรือเป็นปลาธรรมชาติที่เป็นปลารุ่นเดียวกับแม่ปลาที่เคยจับได้มาก่อนแล้ว ถึงอย่างไรก็ตาม ปลาที่ศึกษาทั้งจากส่วนของกรมประมงและความเอกชนควรมาจาก 4 สายพันธุ์แม่(maternal lineage)

การจะวางแผนการผสมพันธุ์เพื่อเป็น captive breeding stock ในอนาคตควรจะต้องคำนึงสายพันธุ์แม่ที่นำเสนอไว้นี้ เพื่อหลีกเลี่ยงการผสมเลือดชิด (inbreeding) อันจะก่อให้เกิดความล้มเหลวทางพันธุกรรม (genetic erosion) รายละเอียดต่างๆได้นำเสนอไว้แล้ว

6. ข้อเสนอแนะ

สำหรับข้อเสนอให้จัดสร้าง captive breeding stock ของปลาบึกจากสถานีวิจัยต่าง ๆ นั้นได้นำเสนอไว้แล้ว สำหรับสุดท้ายนี้ ตามคาดหวังเบื้องต้น คาดกันว่าปลาบึกจะกลายเป็นปลาเศรษฐกิจได้ในอนาคต แต่ในระหว่างการศึกษาทำให้ได้รับข้อมูลเพิ่มเติมจากผู้เกี่ยวข้องต่างๆว่า การจะทำให้ปลาบึกกลายเป็นปลาเศรษฐกิจนั้นเป็นเรื่องยาก ด้วยเหตุผลดังต่อไปนี้

1. ปลาบึกเป็นปลาที่มีอายุยืนยาว ดังนั้นกว่าจะเพาะเลี้ยงจนถึงอายุผสมพันธุ์ได้ต้องใช้ระยะเวลาอันยาวนาน ประมาณ 13-15 ปี ซึ่งต้องลงทุนระยะยาว มีค่าใช้จ่ายมาก จึงคาดกันว่าจะไม่คุ้มทุน

2. ความต้องการของตลาดต่อปลาบึกที่มีอยู่แล้ว (2-3 ปีที่ผ่านมา) มีน้อย ผู้บริโภคทั่วไปนิยมไปซื้อเนื้อปลาบึกที่จับได้จากแม่น้ำโขง แต่ตลาดปลาบึกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไม่เป็นที่ต้องการมากนัก (ไม่มีข้อมูลที่แท้จริง) ถึงแม้จะเปลี่ยนเนื้อปลาบึกเป็นผลิตภัณฑ์อย่างอื่น ความต้องการของตลาดมีไม่มากนัก ยิ่งปลาบึกยังคงติดอยู่ใน Red list ของ IUCN จึงต้องภายใต้ข้อบังคับของ CITES การวางตลาดต่างประเทศกระทำไม่ได้เลย

ด้วยเหตุผลที่กล่าวแล้วข้างบน คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่าประเทศไทยมีปลาบึกอยู่ในประเทศมากมายและมีนักวิชาการที่มีความรู้เรื่องปลาบึกอยู่พอสมควรแล้ว (อาจมีนักวิชาการมากกว่าของประเทศเพื่อนบ้าน) ประเทศไทย (กรมประมง) น่าจะใช้โอกาสนี้ดำเนินโครงการสร้าง captive breeding stock ผลิตลูกปลาบึกปล่อยกลับลงสู่แม่น้ำโขง เพื่อเป็นโครงการประชาสัมพันธ์ประเทศในฐานะประเทศที่ดำเนินการอนุรักษ์ ปลา endangered species ของโลก

บรรณานุกรม

- กรมประมง. 2527. ปลาบึก. เอกสารวิชาการ, กรมประมง. กรุงเทพฯ. น.29.
- เสน่ห์ ผลประสิทธิ์. 2526. การผสมเทียมปลาบึก. วารสารการประมง 36: 247-260.
- Adams, N.S., W.J. Spearman, C.V. Burger, K.P. Currens, C.B. Schreck and H.W. Li. 1994. Variation in mitochondrial DNA and allozymes discriminates early and late forms of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in the Kenai and Kasilof River, Alaska. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 51: 1994.
- Avise, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** 312: 325-342.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb and N.C. Saunders. 1987. Intespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann. Rev.Ecol. Syst.** 18: 489-522.
- Bartley, D.M., and G.A.E. 1990. Genetic structure and gene flow in Chinook salmon populations of California. **Trans. Am. Fish. Soc.** 119: 55-71.
- Beacham, T.D., A.P. Gould, R.E. Withler, C.B. Murray and L.W. Barner. 1987. Biochemical genetic survey and stock identification of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in British Columbia. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 44: 1702-1713.
- Bembo, D.G., A.J. Weightman, R.J.H. Beverton and R.C. Cresswell. 1994. Mitochondrial DNA variation in River Usk brown trout, *Salmo trutta*. **J. Fish Biol.** 44: 717-723.
- Berg, W.J. and Ferris. 1984. Restriction endonuclease analysis of salmonid mitochondria DNA. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 41: 1041-1047.
- Carney, B.L. A.K. Gray and A.J. Gharrett. 1997. Mitochondrial DNA restriction site variation within and among five populations of Alaskan coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 54: 940-949.
- Carney, B.L., A.K. Gray and A.J. Gharrett. 1997. Mitochondrial DNA restriction site variation within and among five populations of Alaskan coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 54: 940-949.
- Cronin, J.C., W.J. Spearman, R.L. Wilmot, J.C. Patton, J.W. Bickham. 1993. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by

- restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 50: 708-715.
- Cruz, T.A., J.P. Thorope and R.S.Pullin. 1982. Enzyme electrophoresis: A pattern for determining biochemical genetic markers for use in *Tilapia* stock identification. **Aquaculture** 29:311-329.
- Dahle, G. 1991. Cod, *Gadus morhua* L., populations identified by mitochondrial DNA. **J. Fish Biol.** 38: 295-303.
- Epifanio, J.M. P.E. Smouse, C.J. Kobak and B.L. Brown. 1995. Mitochondrial DNA divergence among populations of American shad (*Alosa sapidissima*): how much variation is enough for mixed-stock analysis? **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 52: 1688-1702.
- Excoffier, L.G. L. and S. Schneider. 2005. Arlequin ver 3.0: An integrated software package of population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** 1: 47-50.
- Ferris, S.D. and W. J. Berg. 1987. The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery management. In N. Ryman and F. Utter (ed). **Population genetics and fishery management**, pp. 277-299. University of Washington Press, Seattle.
- Fujii, T. and M. Nishida. 1997. High sequence variability in the mitochondrial DNA control region of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fish. Sci.** 63: 906-910.
- Ginatulina, L.K. 1992. Genetic differentiation among chum salmon, *Oncorhynchus keta* (Walbaum), from Primorye and Sakhalin. **J. Fish Biol.** 40: 33-38.
- Gleeson, D.M. R.L.J. Howitt and N. Ling. 1999. Genetic variation, population structure and cryptic species within the black mudfish, *Neochanna diversus*, an endemic galaxiid from New Zealand. **Mol. Eco.** 8: 47-57.
- Hallerman, E.M. and J.S. Beckmann. 1988. DNA-level polymorphism as a tool in fisheries science. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 45: 1075-1087.
- Heist, E.J., J.A. Musick and J.E. Graves. 1996. Genetic population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*) inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 53: 583-588.
- Hogan, Z.S., P.B. Moyle, B. May, M.J.V. Zanden and I.G. Baird. 2004. The imperiled giants of the Mekong. **American Scientist** (May-June 2004).
- Hoolihan, J.P. P. Anandh and L.V. Herwerden. 2006. Mitochondrial DNA analysis of narrow-barred Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*) suggest a single genetic stock in the ROPME sea area (Arabian Gulf, Gulf of Oman, and Arabian Sea). **ICES J. Marine Sci.** (In press).

- Huang, X. and A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.** 9: 868-877.
- Inoue, J.G., M. Miya, K. Tsukamoto and M. Nishida. 2000. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. **Fish. Sci.** 66: 924-932.
- Ishikawa, S., J. Aoyama, K. Tsukamoto and M. Nishida. 2001. Population structure of the Japanese eel *Anguilla japonica* as examined by mitochondrial DNA sequencing. **Fish. Sci.** 67: 246-253.
- IUCN. 2004. The IUCN red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org/info/introduction.html>.
- Johansen, S. P.H. Guddal and T. Johansen. 1989. Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Nucleic Acids Res.** 18: 411-419.
- Jones, M.W. D. Clay and R.G. Danzmann. 1996. Conservation genetics of brook trout (*Salvelinus fontinalis*): population structuring in Fundy National Park, New Brunswick, and eastern Canada. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 53: 2776-2791.
- Kawamura, K., M. Kubota, M. Furukawa, and Y. Harada. 2005. The genetic structure of endangered indigenous populations of the amago salmon, *Oncorhynchus masou ishikawae*, in Japan. **Conserv Genet.**, doi 10.1007/s10592-9271-1.
- Kocher, T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Paabo and F.X. Villablanca. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 86: 6196-6200.
- Kochzius, M. and D. Blohm. 2004. Genetic population structure of the lionfish *Pterois miles* (Scorpaenidae, Pteroinae) in the Gulf of Aqaba and northern Red Sea. **Gene** 247: 295-301.
- Kumar, S. A. Takemura and M. Nei. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief Bioinform.** 5: 150-163.
- Lafontaine, P. and J.J. Dodson. 1997. Intraspecific genetic structure of white sucker (*Catostomus commersoni*) in northeastern North America as revealed by mitochondrial DNA polymorphism. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 54: 555-565.
- Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. pp. 1-38. In P.W. Hochachka and T.P. Mommsen (eds.). **Molecular Biology Frontiers**. Elsevier, Netherlands.

- Miya, M. and M. Nishida. 1999. Organization of the mitochondrial genome of a deep-sea fish, *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes): first example of transfer RNA gene rearrangements in bony fishes. **Mar. Biotechnol.** 1: 416-426.
- Na-Nakorn, U. , S. Sukmanomon, M. Nakajima, N. Taniguchi, W. Kamonrat, S. Poompuang and T.T.T. Nguyen. 2006. MtDNA diversity of the critically endangered Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas* Chevey, 1939) and closely related species: implication for conservation. **Animal Conservation**, doi:10.1111/j.1469-1795.2006.00064.x.
- Ovenden, J.R. R. Bywater and R.W.G. White. 1993. Mitochondrial DNA nucleotide sequence variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*), brown trout (*S. trutta*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) from Tasmania, Australia. **Aquaculture** 114: 217-227.
- Palava, T.K. and T. Palva. 1987. Restriction site polymorphism in mitochondrial DNA of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, stocks in Finland. **Aquaculture** 67: 283-289.
- Paragamian, V.L. 1999. Mitochondrial DNA analysis of burbot stocks in the Kootenai River Basin of British Columbia, Montana, and Idaho. **Trans Am. Fish. Soc.** 128: 868-874.
- Rozas, J., C.J. Sanchez-Delbarrio, X. Messeguer, and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods. **Bioinformatics** 19:2496-2497.
- Saiki, R.K., R.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Ttiguchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Ehrlich. 1998. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. **Science** (Wash. D.C.) 239: 487-491.
- Saitoh, K., M. Miya, J.G. Inoue, N.B. Ishiguro, and M. Nishida. 2003. Mitochondrial genomics of ostariophysan fish: Perspectives on phylogeny and biogeography. **J. Mol. Evol.** 56:464-472.
- Sangthong, P. and A. Jondeung. 2003. Cloning and nucleotide sequence of four tRNA genes in mitochondrial genome of Thai walking catfish, *Clarias macrocephalus* Gunther. **Kasetsart. J. (Nat. Sci.)** 37: 33-40.
- Sriphairoj, K., W. Kamonrat, U. Na-Nakorn. 2006. Genetic aspect in broodstock management of the critically endangered Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas*, in Thailand. **doi:10.1016/j.aquaculture.2006.12.046**.
- Tabata, K. and A. Mizuta. 1997. RFLP analysis of the mtDNA D-loop region in Red Sea bream *Pagrus major* population from four locations of Western Japan. **Fish. Sci.** 63: 211-217.

- Tabata, K. and A. Mizuta. 1997. RFLP Analysis of the mtDNA D-loop in Red Sea Bream *Pagrus major* population from four locations of Western Japan. *Fish. Sci.* 63: 211-217.
- Thai, B.T., T.A. Pham and C.M. Austin. 2006. Genetic diversity of common crap in Vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. **Aquaculture** (Inpress).
- Thompson, J.D., D.G.Higgins, T.J. Gibson. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22: 4673-4680.
- Tringali, M.D. and T.M. Bert. 1996. The genetic stock structure of common snook (*Centropomus undecimalis*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 53: 974-984.
- Tzeng, C.-S., C.-F. Hui, S.-C. Shen and P.C. Huang. 1992. The complete nucleotide sequence of the *Crossostoma lacustre* mitochondrial genome: conservation and variations among vertebrates. **Nucleic Acids Res.** 20: 4853-4858.
- Waldbieser, G.C., A.L. Bilodeau and D.J. Nonneman. 2003. Complete sequence and characterization of the channel catfish mitochondrial genome. **DNA sequence** 14: 265-277.
- Whitmore, D.H., H. Thai and C.M. Craft. 1992. Gene Amplification permits minimally invasive analysis of fish mitochondrial DNA. **Trans. Amer. Fish. Soc.** 121: 170-177.
- Zardoya, R. A. G.-Perterra and J.M. Bautista. 1995. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Mol. Evol.** 41: 942-951.
- Zhang, S-M., D-Q Wang, and Y-P Zhang. 2003. Mitochondrial DNA variation, effective female population size and population history of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. **Conserv Genet.** 4 : 673- 683.

ภาคผนวก

- ภาคผนวก 1. GenBank: Accession Number AY762971: *Pangasianodon gigas* mitochondrion, complete genome
- ภาคผนวก 2. The complete mitochondrial DNA sequence of the Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*), and the phylogenetic relationships among Siluriformes.
Gene 387 : 49-57, 2007
- ภาคผนวก 3. หนังสือที่ วช 0007/ 5610 เรื่อง แจ้งผลการตัดสิน “รางวัลสภาวิจัยแห่งชาติ : รางวัลผลงานวิจัย ประจำปี 2550”
- ภาคผนวก 4. ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการได้ และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการได้ และผลที่ได้รับตลอดโครงการ
“การจำแนกพันธุ์กรรมระหว่างประชากรปลาบึก (*Pangasianodon gigas* Chevey) จากบ่อเลี้ยง”

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการได้	ผลที่ได้
1. เพื่อการโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอทั้งหมดของปลาบึก	1.การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอปลาบึก	1.ได้ดำเนินการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของปลาบึกสำเร็จแล้วและนำข้อมูลไปฝากไว้ที่ GenBank แล้ว	1.พบว่าไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอปลาบึก มีขนาด 16,533 นิวคลีโอไทด์ นำไปฝากไว้ที่ GenBank ภายใต้อccession number AY 761972 และได้นำเสนอผลงานในลักษณะโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการ.เกษตรศาสตร์ปี 2548และการนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2549และตีพิมพ์แล้วในวารสารนานาชาติแล้ว คือ GENE 387:49-53. ผลการวิจัยนี้ยังได้รับ รางวัลผลงานวิจัย จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
2.เพื่อพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะสำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณ (mtDNA fragment) หรือ mtDNA marker ของปลาบึก ซึ่งมีความยาวมากกว่า 1 ซีน	2.ออกแบบไพรเมอร์และทดสอบประสิทธิภาพ	2.ได้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นยาวของยีน <i>ND2</i> , <i>ND3-ND4</i> และ <i>Cytb</i> +control region ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ จำนวน 3 คู่และดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว	2.ได้ออกแบบไพรเมอร์ P13-P14 สำหรับเพิ่มปริมาณ <i>ND2</i> , P15-P16 สำหรับยีน <i>ND3-ND4</i> และ P19-P20 สำหรับยีน <i>Cytb</i> + control region ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มีขนาดประมาณ 1,300 , 2,300 และ 2,400 คู่เบส ตามลำดับ
3.เพื่อการจำแนกสัตอกลาบึกจากแหล่งเลี้ยงต่างๆ ด้วยการวิเคราะห์ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่เพิ่มปริมาณได้	3.เก็บตัวอย่างปลาบึกจากแหล่งเลี้ยงต่างๆและแยกสกัด genomic DNA	3.ดำเนินเก็บตัวอย่างปลาบึกจากแหล่งเลี้ยงต่างๆ ทั้งฟาร์มเลี้ยงของทางราชการและของเอกชน	3.ได้เก็บตัวอย่างปลาบึกสถานีประมงกาฬสินธุ์ เชียงราย สระแก้ว ศูนย์วิจัยประมงแห่งชาติ อุดรฯ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดอุดรธานี ศูนย์พัฒนาและทดสอบพันธุ์ประมงบุรีรัมย์ และ ฟาร์มปลาเอกชน คือ จรัลฟาร์ม เชียงราย และฟาร์มปลาเอกชนในลพบุรีและสิงห์บุรี และรวมทั้งปลาบึกที่จับได้ในฤดูกาล จำนวนรวมทั้งหมด 302 ตัว

4.เพื่อการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมปลาบึกที่ไม่ทราบประวัติตามแหล่งเลี้ยงต่างๆ ตามรูปแบบของ haplotype โดยอาศัยข้อมูลปลาที่ทราบประวัติแล้ว	4.จำแนก haplotype ของปลาบึก จาก 3 ประชากรและปลาบึกที่ไม่ทราบประวัติอีก 30-50 ตัว 5.วิเคราะห์ข้อมูลและการเตรียมรายงานผลของโครงการ	4.การจำแนก haplotype ปลาบึก จาก 9 ประชากร โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน <i>ND2</i> และตัดด้วยเอนไซม์ restriction enzyme ประเภท 4-cutter 5 ชนิด และจำแนก RFLP marker ด้วย polyacrylamide electrophoresis นอกจากนั้นได้พยายามที่จะจำแนก haplotype ของปลาบึก ด้วย RFLP ของยีน <i>ND3-ND4</i> และด้วยยีน <i>Cytb</i> +control region แต่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะประชากร กากพินธุ์และอุรุทธยานั้น จึงเปลี่ยนแทน วิธีการจำแนกไปเป็นการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในบริเวณ control region 5.ดำเนินการวิเคราะห์, gene diversity, genetic difference จากข้อมูล RFLP marker และวิเคราะห์ haplotype diversity, nucleotide diversity และ nucleotide divergence จากข้อมูล control region เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากร และพร้อมทั้ง phylogenetic relationship -	4.การจำแนก haplotype ปลาบึก จำนวน 163 ตัว จาก 9 ประชากร โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน <i>ND2</i> และตัดด้วยเอนไซม์ ปรากฏว่าปลาทั้งหมดจำแนกได้เพียง 4 haplotype เท่านั้น นอกจากนั้นได้พยายามที่จะจำแนก haplotype ของปลาบึก ด้วย RFLP ของยีน <i>ND3-ND4</i> และด้วยยีน <i>Cytb</i> +control region แต่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะประชากร กากพินธุ์และอุรุทธยา จำนวน 63 และ 52 ตัว ตามลำดับ เท่านั้น และการจำแนก haplotype ด้วยการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในบริเวณ control regionและ ปรากฏว่าจาก 9 ประชากร วิเคราะห์ปลาได้ 131 ตัว 5. ผลการจำแนกประชากร ด้วย RFLP marker จากยีน <i>ND2</i> สามารถแบ่งปลาได้ 4 สายพันธุ์แม่ (maternal lineage) ประชากรเด่นหลัก คือ ประชากรกากพินธุ์และประชากรเชียงราย แต่เมื่อจำแนกประชากรโดยใช้ ลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ control region สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลัก (major clade) แต่กลุ่มใหญ่นั้นมีอยู่หลายสายพันธุ์แม่ (maternal lineage) ประชากรเด่น คือ กากพินธุ์ และ เชียงราย ได้ทำข้อเสนอแนะว่า การจะดำเนินการผสมพันธุ์ปลาบึก เป็น captive breeding stock ควรจะทำความร่วมมือระหว่างสถานีต่างเพื่อคัดเลือกแม่พันธุ์ก่อนดำเนินการ
---	--	--	---