การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาหมูบริเวณเขื่อนลำปาว จังหวัดกาฬสินธุ์ โดยเทคนิคอาร์เอพีดี-พีซีอาร์

A Study of Genetic Diversity of *Botia* species in Lampao Dam, KalasinProvince Using RAPD-PCR Technique

กีรวิชญ์ เพชรจุล

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตกาฬสินธุ์ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000 / E-mail : pkeravit@yahoo.com

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาหมูบริเวณเขื่อนลำปาว จังหวัดกาฬสินธุ์ ด้วยการศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี–พีซีอาร์ (RAPD-PCR) พบปลาหมูทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ปลาหมูข้างลาย (*Syncrossus hymenophysa*) ปลาหมูหางแดง(*Yasuhikotakia eos*) และปลาหมูขาว (*Yasuhikotakia modesta*) ในการศึกษาสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อข้างลำตัว เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด จากนั้นแยกแถบดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีสพบว่าไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ Oligo 101 (5'-GCGCCTGGAG–3') และไพรเมอร์ Oligo 147 (5'–AACGGGCAGA–3') สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ และผลการทำ RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ทั้งสองของปลาหมูทั้ง 3 ชนิดพบแถบดีเอ็นเอจำนวน 33 แถบ ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 300–1,600 คู่เบสโดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลาย (polymorphic band) จำนวน 32 แถบ คิดเป็น 96.97 เปอร์เซ็นต์ และพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความหลากหลาย (monomorphic band) จำนวน 1 แถบ คิดเป็น 3.03 เปอร์เซ็นต์ จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าปลาหมูที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ซึ่งจากข้อมูลนี้จะเป็นแนวทางนำไปสู่การอนุรักษ์และบันทึกประวัติทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ปลาหมูในพื้นที่บริเวณเขื่อนลำปาวจังหวัดกาฬสินธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : ความหลากหลายทางพันธุกรรม ปลาหมูข้างลาย ปลาหมูหางแดง ปลาหมูขาว เขื่อนลำปาว อาร์เอพีดี-พีซีอาร์

Abstract

A study genetic diversity of *Botia* species in Lampao dam, Kalasin province using Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction technique (RAPD-PCR) were found 3 *Botia* species such as : *Syncrossus hymenophysa*, *Yasuhikotakia eos* and *Y. modesta*. DNA extraction from the tissue has beside the body already. DNA amplifications were using RAPD-PCR technique using 10 primers, and PCR products were analysed by gel electrophoresis. The results showed that primer Oligo 101 (5'-GCGCCTGGAG-3') and primer Oligo 147 (5'-AACGGGCAGA-3') were able to amplify the DNA in RAPD reaction. For RAPD of this 2 primers of 3 *Botia* species showed 33 bands

which the size is 300-1600 bp. DNA fingerprints of these 2 primers were found 32 polymorphic bands (96.97%) and the monomorphic band was found 1 band (3.03%). This study showed the *Botia* species from Lampao dam in Kalasin province have the difference genetic diversity. The data of this study will be help the conservation and the genetic history study of *Botia* species in Lampao dam.

Keywords : Genetic diversity, *Syncrossus hymenophysa*, *Yasuhikotakia eos*, *Y. modesta*, Lampao dam, RAPD-PCR

คำนำ

ปลาหมูเป็นปลาที่อยู่ในวงศ์โคบิทิดี (Family Cobitidae) ปลาในวงศ์นี้พบมีอยู่ในโลกนี้ประมาณ 18 สกุล 110 ชนิด มีกระจายแพร่หลายมากที่สุดในเขตทวีปเอเชีย (Nelson,1984) ชอบอาศัยอยู่ในเขตร้อนชื้นแต่เป็นบริเวณที่น้ำมีอุณหภูมิต่ำกว่าหรือเย็นกว่าบริเวณอื่นในแหล่งน้ำเดียวกันดังนั้นบริเวณที่ปลาหมูอาศัยจึงมักจะเป็นบริเวณน้ำไหลข้างๆแก่งหินที่มีน้ำไหลเชี่ยวตลอดเวลาในประเทศไทยพบปลาหมูในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไปโดยปลาหมูตามแม่น้ำลำคลองส่วนใหญ่จะเป็นปลาที่มีขนาดเล็กผิดกับปลาหมูตามโตรกธารวังน้ำหน้าน้ำตกหรือแก่งผาที่เป็นลำห้วยบนเขาหรือที่สูงที่เป็นต้นน้ำจะพบปลาหมูที่มีขนาดใหญ่เป็นพิเศษ ปลาหมูที่พบในประเทศไทย Smith (1945) รายงานไว้ 6 ชนิด Suwannates (1970) รายงานไว้ 9 ชนิด และมีรายงานเพิ่มเติมพบปลาหมูอีก 1 ชนิด คือ ปลาหมูลายเมฆ (Kottelat, 2001) ที่พบในปัจจุบัน ได้แก่ ปลาหมูสัก (*Botia lecontei*) ปลาหมูสาละวิน (*B. berdmorei*) ปลาหมูลายเมฆ (*B. kubotai*) ปลาหมูข้างลาย (*Syncrossus hymenophysa*) ปลาหมูลายเสือ (*S. beauforti*) ปลาหมูขาว(*Yasuhikotakia modesta*) ปลาหมูคอก (*Y. morleti*) ปลาหมูหางแดง (*Y. eos*) ปลาหมูหางจุด (*Y. caudipunctatus*) และปลาหมูอารีย์ (*Y. sidthimunk*)

ปลาหมูชนิดต่างๆ เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ในปัจจุบันมีการส่งออกในปริมาณมากขึ้นทุกๆ ปี โดยประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์จับจากธรรมชาติ ปลาหมูที่รู้จักกันดีในต่างประเทศ ได้แก่ ปลาหมูอารีย์ โดยนิยมเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม ปัจจุบันปลาหมูจึงพบเห็นตามแหล่งน้ำทั่วไปมีเพียง 2 สกุลเท่านั้นคือปลาหมูข้างลายและปลาหมูขาวส่วนที่เหลือนอกจากที่กล่าวมาหายากมากโดยปลาหมูขาวจะล่ำสันบึกบึน ส่วนปลาหมูข้างลายปราดเปรียวว่องไว ดังนั้นจึงพบปลาทั้งสองในที่ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาพันธุ์ปลาบริเวณประตูระบายทางน้ำออกของเขื่อนลำปาว จังหวัดกาฬสินธุ์พบว่ามีปลาหมูหลายชนิดอาศัยอยู่ เช่น ปลาหมูข้างลาย ปลาหมูหางแดง ปลาหมูขาว ซึ่งใน 1 ปีจะพบได้ครั้งเดียวในช่วงเวลาหลังน้ำลดหลังจากนั้นจะไม่พบอีกเลย ปัจจุบันปลาหมูเหล่านี้ที่เคยมีอยู่ตามธรรมชาติจำนวนมากได้เริ่มลดลงอย่างต่อเนื่องและกำลังเข้าสู่ขั้นวิกฤต เนื่องจากปลาหมูมีการขยายพันธุ์ได้ยากโดยทางกรมประมงอยู่ระหว่างดำเนินการหาวิธีเพาะพันธุ์ใหม่ๆ นอกจากนั้นยังมีแนวโน้มว่าการเก็บตัวอย่างสายพันธุ์ปลาหมูในเขื่อนลำปาว จังหวัดกาฬสินธุ์มีโอกาสที่จะพบปลาหมูสายพันธุ์ใหม่ ทำให้ควรมีการจัดจำแนกสายพันธุ์ปลาหมู ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำความรู้ด้านพันธุศาสตร์ของเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์อนุกรมวิธาน (Cytotaxonomy) ภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology) ชีวเคมี

(Biochemistry) ตลอดจนชีววิทยาโมเลกุล (Molecular Biology) เข้ามาช่วยในการจัดจำแนก (Ari, 1982 ; Buth *et al*. 1991) ทำให้เพิ่มความถูกต้องและแม่นยำในการจำแนกได้มากขึ้นโดยการศึกษาทางด้านชีววิทยาโมเลกุลของปลาหมูในประเทศไทยยังไม่เคยปรากฏรายงานการวิจัยมาก่อนดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลาหมูที่พบในบริเวณเขื่อนลำปาว จังหวัดกาฬสินธุ์ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ ซึ่งงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ศึกษาชนิดของปลาหมูที่พบในบริเวณเขื่อนลำปาวเพื่อเป็นแนวทางการอนุรักษ์และแก้ไขปัญหาการสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพของปลาหมูต่อไป

วิธีการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาหมู

เก็บรวบรวมตัวอย่างปลาหมูบริเวณทางออกของประตูระบายน้ำเขื่อนลำปาว จังหวัดกาฬสินธุ์ โดยรวบรวมจากชาวประมง ตั้งแต่เดือนเมษายน – กันยายน 2554

2. ศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาภายนอกของปลาหมู

นำตัวอย่างปลามาล้างทำความสะอาด จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะภายนอกตามวิธีของ Rainboth (1966), Kottelat (2001) และ Kottelat (2004) โดยศึกษาจากลักษณะเด่นทางสัณฐานวิทยาของปลาหมู ได้แก่ ลักษณะของลำตัว สี ครีบ ขนาดความยาว ฟัน และลักษณะเด่นอื่นๆ เพื่อจำแนกชนิดของปลาหมูที่พบ

3. การศึกษาระดับโมเลกุลของปลาหมูด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอพีดีและวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การสกัดดีเอ็นเอของปลาหมู

การสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจาก Winnepenninckx *et al.* (1993) โดยตัดเนื้อเยื่อข้างลำตัวของปลาหมูขนาด 1 cm^3บดให้ละเอียดเติม TEN buffer ปริมาตร 500 µl (tris HCl 100 mM, EDTA 100 mM, NaCl 250 mM) เติมเอนไซม์ Protenase K ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 10 µl ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 $^{\circ}$C นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นเติม Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25:24:1 v/v/v) ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปมานาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm นาน 15 นาที ดูดเอาส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้มีตะกอนติดมาด้วย)นำมาเติม Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25:24:1 v/v/v) ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปมานาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที(หากสารละลายส่วนบนยังไม่ใสให้สกัดซ้ำครั้งที่ 3)ดูดเอาส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่หลอดใหม่ นำมาเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1 v/v) ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปมานาน 5 นาทีนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที ดูดเอาส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม 3M Sodium acetate, pH 5.3 ปริมาตร 1/10 ของปริมาตรของเหลวทั้งหมดแล้วเติม Absolute ethanol ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรของเหลวทั้งหมดเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm นาน 10 นาทีเทส่วนสารละลายทิ้งเก็บส่วนตะกอนดีเอ็นเอจากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอ

ด้วย 70 % Ethanol 2 ครั้ง ๆ ละ 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm นาน 10 นาที เท Ethanol ทิ้ง แล้วปล่อยให้แห้งในอากาศละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1x TE buffer ปริมาตร 100 µl (tris HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM)

3.2 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี Spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD 260) และ 280 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Biophotometry หากอัตราส่วน 260/280 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 1.7 –1.9 แสดงว่าดีเอ็นเอที่ได้นั้นมีคุณภาพดี และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบปริมาณและการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอโดยใช้เทคนิค Gel electrophoresis(Piyachokkanakul, 2002)

3.3 การทำPCR (Polymerase Chain Reaction)

การทำ PCR ดัดแปลงมาจาก Petjul *et al.* (2011) โดยนำดีเอ็นเอปลาหมูมาเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง PCR (Polymerase Chain Reaction,Biometra® รุ่น TGRADIENT) โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 10 ชนิด ได้แก่ Oligo 101(5'-GCGCCTGGA G–3'),Oligo 147 (5'-AACGGGCAGA–3'), Oligo 268 (5'-AGGCCGCTTA–3'), Oligo 428 (5'-GGCTGCGGTA–3'), Oligo 456 (5'-GCGGAGGTCC–3'), Oligo 457 (5'-CGACGCCCTG–3'), Oligo 459 (5'-GCGTCGAGGG–3'), UBC 122 (5'-GTAGACGAGC–3'), OPA 01 (5'-CAGGCCCTTC–3')และ OPA 05 (5'-AGGGGTCTTG–3') โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย10 X Vi buffer ปริมาตร 2.5 µl, 25 mM$MgCl_2$ปริมาตร 3 µl, 1mM dNTP ปริมาตร 5 µl, 10 µM primer ปริมาตร 2 µl, 5.0Unit*Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.1 µl, 50 ng/ µl ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 3 µl และน้ำปริมาตร 9.4 µl โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ PCR profile ดังนี้

1. ขั้นตอน Initial denaturation ที่ 94 °C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ
2. ขั้นตอน denaturation ที่ 94 °C นาน 10 วินาที
3. ขั้นตอน Annealing ที่ 36 °C นาน 45 วินาที
4. ขั้นตอน Extension ที่ 72 °C นาน 90 วินาที (ขั้นที่ 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ)
5. ขั้นตอนการ Final Extension ที่ 72 °C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ

3.4 การทำอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (Agarose gel electopholesis)

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 % (W/V) ใน 0.5X TBE Buffer จากนั้นผสม 10X loading dye กับ Lambda *Hin*d III standard marker ในอัตราส่วน 2: 5 ให้เข้ากันแล้วโหลดลงในช่องเจล ผสม 10X loading dye กับ PCR product ในอัตราส่วน 2: 10 ให้เข้ากันแล้วโหลดลงในช่องเจลให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลอะกาโรสไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นาน 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำเปล่านาน 5 นาที จากนั้นตรวจดูลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ด้วยเครื่อง Gel documentation พร้อมทั้งบันทึกภาพไว้ เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของปลาหมูต่อไป

ผลการทดลอง

1. ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกปลาหมู

จากการศึกษาลักษณะเด่นทางสัณฐานวิทยาของปลาหมูที่รวบรวมได้ พบว่าจำแนกได้ 3 ชนิด ได้แก่

1. ปลาหมูข้างลาย (*S. hymenophysa*) มีลักษณะทั่วไป คือ ลำตัวเรียว ยาวประมาณ 9-13 เซนติเมตร มีลายตัดลำตัว หางเว้า (Fig.1)

Fig.1 : *Syncrossus hymenophysa*

2. ปลาหมูหางแดง (*Y.eos*) มีลักษณะทั่วไป คือ ลำตัวยาวประมาณ 9-12 เซนติเมตร หางและครีบมีสีแดง หางเว้า (Fig.2)

Fig.2 : *Yasuhikotakiaeos*

3. ปลาหมูขาว (*Y. modesta*) มีลักษณะทั่วไป คือ ลำตัวมีสีขาวนวลหรือสีเหลืองนวล ขนาดความยาวของลำตัวประมาณ 10-15 เซนติเมตร(Fig.3)

Fig.3 : *Yasuhikotakia modesta*

2. ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาหมูโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR

2.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อข้างลำตัวของปลาหมูเมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพและหาปริมาณดีเอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี โดยมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น OD_{260}/OD_{280} อยู่ในช่วง 1.47 – 2.00 และเมื่อนำมาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค 1.0 % อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสพบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีนี้มีการปนเปื้อนของ อาร์เอ็นเอน้อยมาก (Fig.4)

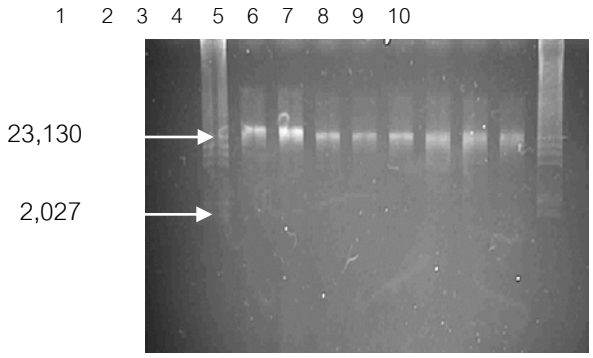

Fig. 4: Genomic DNA of *Botia* species from 1.0 % agarose gel electrophoresis.

Lane 1 and 10 : Lambda *Hin*d III standard marker (Invitrogen,Carlsbad,CA),

Lane 2-3 : *S. hymenophysa*, Lane 4-6 : *Y.eos*, Lane 7-9 : *Y. modesta.*

2.2 ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD - PCR

จากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด พบว่า มีไพรเมอร์เพียง 2 ชนิดที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอ ได้แก่ ไพรเมอร์ Oligo 101 และไพรเมอร์ Oligo 147 โดยมีแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ทั้งสองจำนวน 33 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 300 – 1600 คู่เบสพบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลาย 32 แถบ (polymorphic band) คิดเป็น 96.97 % (Table 1) ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

2.2.1 ไพรเมอร์ Oligo 101 พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 18 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 300 – 1,550 คู่เบสซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึม จำนวน 17 แถบ ได้แก่แถบดีเอ็นเอขนาด 1,550, 1,500 1,420 1,250 1,200 1,125 1,000 950, 900, 720, 700, 650, 600, 550, 450, 340 และ 300 คู่เบสและ monomorphic band จำนวน 1 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 800 คู่เบสโดยแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 900 คู่เบสพบเฉพาะในปลาหมูหางแดง(*Y.eos*) และแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 650 คู่เบสพบเฉพาะในปลาหมูข้างลาย (*S. hymenophysa*) เท่านั้น (Fig.5)

2.2.2 ไพรเมอร์ Oligo 147 พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 15 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 500 – 1,600 คู่เบสซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึม จำนวน 15 แถบ ได้แก่แถบดีเอ็นเอขนาด 1,600, 1,550, 1,000, 990, 950, 900, 850, 800, 780, 710, 700, 650, 610, 600, และ 500 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 900 คู่เบสพบเฉพาะในปลาหมูหางแดง (*Y.eos*) และแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 500 คู่เบส พบเฉพาะในปลาหมูข้างลาย (*S. hymenophysa*) เท่านั้น (Fig. 6)

Table 1:Sequence of oligonucleotide primers, sizes and number of scorable RAPD bands and percentage of polymorphic bands resulting from RAPD analysis using primer Oligo 101 and Oligo 147

Primer	Sequences (5′ - 3′)	Size – range (bp)	Total bands	Polymorphic bands
Oligo 101	GCG CCT GGA G	300 – 1,550	18	17(94.44%)
Oligo 147	AAC GGG CAG A	500 – 1,600	15	15(100.00%)
Total			33	32(96.97%)

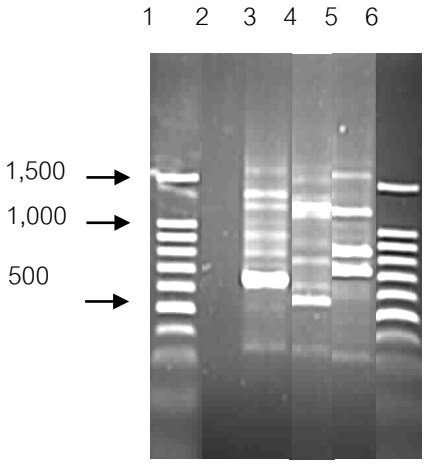

Fig.5:RAPD pattern of *Botia* species generated by primer Oligo 100.

Lane 1 and 6 : 100 bp Ladder DNA markers (Invitrogen,Carlsbad,CA),

Lane 2 : negative control, Lane 3 : *S. hymenophysa*,

Lane 4 : *Y.eos* and Lane 5 : *Y. modesta*

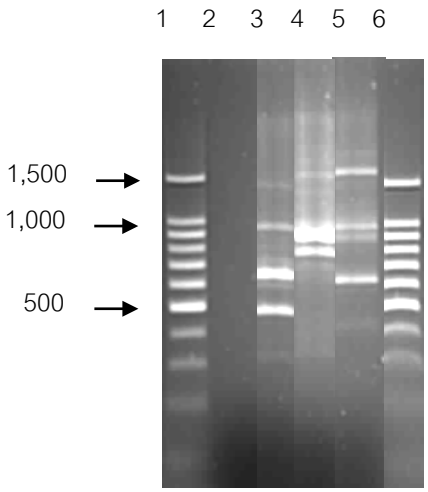

Fig.6:RAPD pattern of *Botia* species generated by primer Oligo 147.

Lane 1 and 6 : 100 bp ladder DNA markers (Invitrogen,Carlsbad,CA),

Lane 2 : negative control, Lane 3 : *S. hymenophysa*,

Lane 4 : *Y.eos* and Lane 5 : *Y. modesta*

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกประเภทของปลาหมูโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก สามารถจำแนกได้ 3 Species คือ ปลาหมูข้างลาย (*S. hymenophysa*), ปลาหมูหางแดง(*Y.eos*) และปลาหมูขาว (*Y. modesta*) ซึ่งมีลักษณะตามที่ Rainboth (1966), Kottelat (2001) และ Kottelat (2004) ได้จัดจำแนกไว้ โดยลักษณะภายนอกของปลาหมูที่พบ ปลาหมูขาวจะมีขนาดใหญ่กว่าปลาหมูข้างลายและปลาหมูหางแดง โดยความแตกต่างของปลาหมูทั้ง 3 ชนิดสามารถแยกได้โดยดูจากลักษณะความแตกต่างของลักษณะลำตัว ขนาด สีและครีบ

จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด พบว่า มีไพรเมอร์ 2 ชนิดที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ คือ ไพรเมอร์ Oligo 101 และไพรเมอร์ Oligo 147 พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 33 แถบ มีขนาดอยู่ในช่วง 300 – 1,600 คู่เบสแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็น Polymorphic band จำนวน 32 แถบ (96.97%) จากค่าความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ Polymorphic band ที่เกิดจากไพรเมอร์ Oligo 101และ Oligo 147 สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างปลาหมูที่พบทั้ง 3 ชนิดได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Petjul *et al*. (2011) ที่ทำการศึกษาการใช้เทคนิค RAPD-PCR แยกความแตกต่างของปลาในสกุล *Barbodes* spp. ในประเทศไทย โดยเทคนิคนี้สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างชนิดของปลาได้สูง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาหมูทั้ง 3 ชนิดในครั้งนี้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาหมูที่พบบริเวณเขื่อนลำปาวได้ และสามารถใช้เป็นแนวทางใน

การอนุรักษ์พันธุกรรมและแก้ไขปัญหาไม่ให้ปลาหมูจากเขื่อนลำปาวมีการสูญพันธุ์หรือไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะการกลายทางพันธุกรรมต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

Ari, R. (1982). A Chromosome Study on Two Cyprinid Fishes *Acrossocheilus labiatus* and *Pseudorasbora pumila* with Note on Eurasian Cyprinid and Their Karyotypes. Bull.Natn.Sci.Mus.Ser.A 8(3) : 131-182.

Buth, D.G., Dowling, T. E. and Gold, J. R. (1991). Molecular and Cytological Investigation. In : Winfield, J.J. & Nelson, J.S. (eds.) : Cyprinid Fishes Systematics, Biology and Exploitation. Chapman & Hall, London. Fisheries Series. 3 : 81-126.

Petjul K., Sangdee A. and Thaewnon-ngiw B. (2011). Using Randomly Ampified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction of *Barbodes* spp. In Thailand. Online Journal of Biological Sciences 11(1) : 1-6.

Kottelat, M. (2001). Fishes of Laos. WHT Publications Ltd., Sri Lanka. 198 p.

Kottelat, M. (2004). *Botia kubotai*, a New Species of Loach (Teleostei : Cobitidae) from the Ataran River Basin (Myanmar), with Comments on Botine Nomenclature and Diagnosis of a New Genus. Zoota. 401 : 1-18.

Nelson, S. (1994). Fishes of world. John Wiley & Sons, Inc., New York. 600 p.

Rainboth, W.J. (1996). Fishes of the Cambodian Mekong, FAO of the United Nation, Rome. 263 p.

Suwannates S. (1970). The Botia Species in Thailand. Annual Report : Inland Aquatic Animal of Taxonomy Institute. Department of Fisheries, 121-168. (in Thai)

Smith, H.M. (1945). The Freshwater Fishes of Siam, or Thailand. United StatesNationalMuseum, Bulletin 188. 622 p.

Piyachokkanakul S. (2002). Principle of Genetic Engineering. 2nd Printing. Kasetsart University Press, Bangkok, 282 p. (in Thai)

Winnepenninckx, B., T. Backeljau and R. De Wachter. (1993). Extraction of High Molecular Weight DNA from Mollusk. Trends Genetics, 9 : 407.