

ลักษณะสัณฐานวิทยา และความหลากหลายของปลาสลิคในประเทศไทย

Morphology and Biodiversity of Snakeskin gourami

(*Trichogaster pectoralis*) in Thailand

พรพิมล กาญจนवास

ชุตานา คุณสุข

อลิษา สุนทรวัฒน์

สุภาภรณ์ วรรณภิญโญชีพ

เดชาวุธ นิตยสุทธิ

วิภาวรรณ วิทยกฤตศิริกุล

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีการศึกษา 2556

ลักษณะสัณฐานวิทยา และความหลากหลายของปลาสลิคในประเทศไทย

Morphology and Biodiversity of Snakeskin gourami

(*Trichogaster pectoralis*) in Thailand



พรพิมล กาญจนवास

ชุตานา คุณสุข

อลิษา สุนทรวัฒน์

สุภาภรณ์ วรรณภิญโญชีพ

เดชาวุธ นิตยสุทธิ

วิภาวรรณ วิทยกฤตศิริกุล

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีการศึกษา 2556

ชื่อเรื่อง ลักษณะสัณฐานวิทยา และความหลากหลายของปลาสดในประเทศไทย

ผู้วิจัย พรพิมล กาญจนวาศ

ชุตานาภา คุณสุข

อลิษา สุนทรวัฒน์

สุภาภรณ์ วรรณภิญโญชีพ

เดชาวุธ นิตยสุทธิ

วิภาวรรณ วิทยกฤตศิริกุล

สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีที่พิมพ์ 2559

สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

จำนวนหน้างานวิจัย 77 หน้า

คำสำคัญ ปลาสด, ความหลากหลาย, Cytochrome oxidase subunit I, Cytochrome *b*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

การศึกษาสัณฐานวิทยา และความหลากหลายของปลาสดในประเทศไทยโดยใช้ปลาสดอายุ 8 เดือน จาก 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดอยุธยา จังหวัดสระแก้ว จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม จากการศึกษาคความผันแปรของลักษณะภายนอกพบว่าปลาสดจากจังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดสระแก้ว จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม มีการแปรผัน 3 ลักษณะ คือ 1) ลายแถบดำคล้ายลายเสือ 2) ลายแถบดำ 1 แถบกลางตัวหรือเรียกว่าลายจุด และ 3) ไม่มีแถบดำ ตัวมีสีขาวนวล แต่ปลาสดจากจังหวัดอยุธยา และฉะเชิงเทรามีเพียงลักษณะเดียว คือ ลายเสือ พบว่าปลาสดจากจังหวัดสมุทรสาครมีขนาดความยาวลำตัวมากที่สุด คือ 152.57 มิลลิเมตร ส่วนปลาสดจากจังหวัดฉะเชิงเทรามีดัชนีสมบูรณ์เพศสูงที่สุด คือ 13.68% การศึกษาคความหลากหลายของปลาสดโดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และ Cytochrome *b* นำมาทำแผนภาพอนุমানต้นไม้ด้วย MEGA 5 พบว่าสามารถจัดจำแนกปลาสดจาก 7 จังหวัดได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ปลาสดลายเสือจากจังหวัดสมุทรปราการ (SPV) ปลาสดลายเสือจากจังหวัดนครปฐม (NPTT) และปลาสดลายเสือจากจังหวัดเพชรบุรี

(PTTT) กลุ่มที่ 2 ปลาสลิดลายจุดจากจังหวัดนครปฐม (NPWD) ปลาสลิดจากจังหวัดอยุธยา และปลาสลิดอ้างอิง *Trichogaster pectoralis* accession number HQ682729 กลุ่มที่ 3 คือ ปลาสลิดลายเสือจากจังหวัดสระแก้ว (SKTT) ปลาสลิดลายเสือจากจังหวัดสมุทรสาคร (SSDVT) และปลาสลิดจากจังหวัดฉะเชิงเทรา (CH)



Research Title : Morphology and Biodiversity of Snakeskin gourami (*Trichogaster pectoralis*) in Thailand

Researchers : Pornpimon Kanjanavas
Chutapa Kunsook
Alisa Soontornwat
Supaporn Wannapinyosheep
Dechavudh Nityasuddhi
Vipawan Vitayakritsirikul

Institution : Huachiew Chalermprakiet University

Year of Publication : 2016

Publisher : Huachiew Chalermprakiet University

Sources : Huachiew Chalermprakiet University

No. of pages : 77 pages

Keywords : Snakeskin gourami, biodiversity, Cytochrome oxidase subunit I, Cytochrome *b*

Copyright : Huachiew Chalermprakiet University

Abstract

The study on morphology age biodiversity of snakeskin gourami (*Trichogaster pectoralis*) in eight months of fish, that collected from 7 provinces of Thailand namely Samut Prakan, Samut Sakhon, Chachoengsao, Phra Nakhon Si Ayutthaya, Sa Kaeo, Phetchaburi and Nakhon Pathom. The external variable was found from Pla- salid of Samut Prakan, Samut Sakhon, Sa Kaeo, Phetchaburi and Nakhon Pathom. There were three distinguished morphological characteristics inpla-salid as follows: 1) tiger-liked strips in Samut Prakan, Samut Sakhon, Sa Kaeo, Phetchaburi, Nakhon Pathom, Phra Nakhon Si Ayutthaya and Chachoengsao samples, 2) black bar at the middle of the body with black dots in Samut Prakan, Samut Sakhon, Sa Kaeo, Phetchaburi and Nakhon Pathom samples, and 3) bright white colour of body in Samut Prakan, Samut Sakhon, Sa Kaeo, Phetchaburi and Nakhon Pathom samples. Pla- salid from Samut Sakhon had the longest body of 152.57 mm. and Chachoengsao

had the most complete of sexual integrity at 13.68 %. The biodiversity of Pla-salid was studied using cytochrome oxidase subunit I gene and cytochrome *b* gene. The phylogenetic tree of Pla-salid was carried on with MEGA 5 program that could divide into three groups as: 1) Pla-salid from Samut Prakan (SPV), Nakhon Pathom (NPTT) and Phetchaburi (PTTT), 2) Pla-salid from Nakhon Pathom (NPWD), Phra Nakhon Si Ayutthaya and *Trichogaster pectoralis* accession number HQ682729, and 3) Pla-salid from Sa Kaeo (SKTT), Samut Sakhon (SSDVT) and Chachoengsao (CH).



กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นายสัมพันธ์ พันธะชา นักศึกษาหลักสูตรจุฬชวีทยาอุตสาหกรรม ผู้ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หลักสูตรจุฬชวีทยาอุตสาหกรรม ทุก ๆ ท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกด้วยดีตลอดการทำวิจัย ขอขอบพระคุณ ดร. ศิริวรรณ ตันตระวานิช คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ผู้ให้การสนับสนุน และผลักดัน ให้เกิดงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณทางมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงมาด้วยดี มา ณ โอกาสนี้

พรพิมล กาญจนวาส

ชุตานา คุณสุข

อลิษา สุนทรวัฒน์

สุภาภรณ์ วรรณภิญโญชีพ

เดชาวุธ นิตยสุทธิ

วิภาวรรณ วิทยาภักตศิริกุล

พฤศจิกายน 2559

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ฅ
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 อัตรการผลิตพลาสติก	5
2.2 แหล่งที่พบพลาสติก	6
2.3 การจัดจำแนกพลาสติก	7
2.4 เทคนิคทางอนุชีววิทยาที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิต	10
2.5 ยีนเป้าหมายที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต (DNA marker target)	13
2.6 การคัดเลือก molecular markers หรือ gene regions	14
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	18
3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ใช้ในการทดลอง	18
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย	26
4.1 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของพลาสติกจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย	26
4.2 ผลการศึกษาทางอณูชีววิทยาของพลาสติกจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย	34
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	47
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	50
บรรณานุกรม	52
ภาคผนวก	
ก. วิธีการเตรียมสารเคมี	59
ข. การวิเคราะห์ทางสถิติ	61
ค. ประวัติย่อผู้วิจัย	63

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	การเปรียบเทียบ 10 วิธี ที่ใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ของปลาในช่วงปี ค.ศ. 1997-2007	11
3-1	คอนดิชันที่ใช้ในการทำงาน PCR จำนวน 35 รอบ COIF/COIR	23
3-2	คอนดิชันที่ใช้ในการทำงาน PCR จำนวน 35 รอบ CytbF/CytbR	23
4-1	การเปรียบเทียบความยาวเหยียด (Total length, TL) จากทั้งหมด 7 จังหวัด	27
4-2	ค่าดัชนีสมบูรณ์เพศของปลาสดเพศเมีย (อายุ 8 เดือน)	29
4-3	แสดงค่าดัชนีฐานวิทยาของปลาสดประเทศไทย	33
4-4	แสดงค่าอัตราส่วนของระยะจากตาถึงช่องเหงือก (B) ต่อระยะตั้งแต่ปากถึงโคนหาง (H)	34
4-5	แสดงการจัดกลุ่มของปลาสดโดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และ Cytochrome b ของปลาสด มาทำแผนภาพอนุমানต้นไม้	46

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า	
2-1	อัตราการผลิตพลาสติกจากทั่วโลก	5
2-2	การแพร่กระจายของพลาสติก	6
2-3	การวัดสัดส่วนปลา	8
3-1	แสดงการวัดสัดส่วนของปลา	20
3-2	การศึกษาสัณฐานวิทยาโดยใช้ข้อมูลเครือข่ายโครงยัดในพลาสติกจากจังหวัดต่างๆ	21
4-1	ความแปรผันทางสัณฐานภายนอกของพลาสติก	29
4-2	พลาสติกจากจังหวัดต่าง ๆ ก) สมุทรปราการ ข) สมุทรสาคร ค) ฉะเชิงเทรา และ ง) ออยุธยา	31
4-3	พลาสติกจากจังหวัดต่าง ๆ ก) สระแก้ว ข) เพชรบุรี และ ค) นครปฐม	31
4-4	แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ของพลาสติกจาก จังหวัดสมุทรปราการ (SP) สมุทรสาคร(SS) ฉะเชิงเทรา(CH) ออยุธยา(AY) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และ นครปฐม(NP) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ของ Cytochrome oxidase subunit I (COI) ของพลาสติก <i>Trichogaster pectoralis</i> accession number HQ682729	35
4-5	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome <i>b</i> (Cytb) ของพลาสติกจาก จังหวัดสมุทรปราการ(SP) สมุทรสาคร(SS) ออยุธยา(AY) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และนครปฐม(NP) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ของ Cytochrome <i>b</i> ของพลาสติก <i>Trichogaster pectoralis</i> accession number AY763758	38
4-6	แผนภาพอนุมานต้นไม้ของยีน Cytochrome oxidase subunit I ของพลาสติกจาก 7 จังหวัด เมื่อใช้วิธี Maximum likelihood	41

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-7 แผนภาพอนุमानต้นไม้ของยีน Cytochrome oxidase subunit I ของปลาสดิจจาก 7 จังหวัด เมื่อใช้วิธี Neighbor joining	41
4-8 แผนภาพอนุमानต้นไม้ของยีน Cytochrome oxidase subunit I ของปลาสดิจจาก 7 จังหวัด เมื่อใช้วิธี Maximum parsimony	42
4-9 แผนภาพอนุमानต้นไม้ของยีน Cytochrome <i>b</i> ของปลาสดิจจาก 6 จังหวัด เมื่อใช้วิธี Maximum likelihood	44
4-10 แผนภาพอนุमानต้นไม้ของยีน Cytochrome <i>b</i> ของปลาสดิจจาก 6 จังหวัด เมื่อใช้วิธี Neighbor joining	44
4-11 แผนภาพอนุमानต้นไม้ของยีน Cytochrome <i>b</i> ของปลาสดิจจาก 6 จังหวัด เมื่อใช้วิธี Maximum parsimony	45

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลาสดเป็นปลาน้ำจืด ซึ่งเป็นปลาพื้นบ้านของประเทศไทย มีแหล่งกำเนิดอยู่ในที่ลุ่มภาคกลางของประเทศ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Trichogaster pectoralis* ปลาสดเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงกันมากบริเวณภาคกลาง และสามารถพบในประเทศเพื่อนบ้านอย่าง เช่น กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย อินเดีย ปากีสถาน ศรีลังกา และฟิลิปปินส์ ซึ่งมีที่มาจากการส่งพันธุ์ปลาจากเมืองไทยไปยังประเทศดังกล่าว เมื่อประมาณ 80-90 ปีที่ผ่านมา การจัดจำแนกปลาจะอาศัยการสังเกตจากลักษณะรูปร่าง สี ขนาดความยาว หรือการเรียงตัวของเกล็ดปลา หรือลักษณะของไข่ หรือองค์ประกอบอื่นๆที่อยู่ภายในตัวปลา ซึ่งปลาสดมีรูปร่างคล้ายปลากะตักหัวโต แต่มีขนาดโตกว่า ลำตัวแบนข้างมีครีบ ท้องยาวครีบเดียว สีของลำตัวมีสีเขียวออกเทา หรือมีสีคล้ำเป็นพื้น และมีริ้วดำพาดขวางตามลำตัวจากหัวถึงโคนหาง เกล็ดบนเส้นข้างตัวประมาณ 42-47 เกล็ด ปากเล็กยึดหดได้ ปลาสดซึ่งมีขนาดใหญ่เต็มที่จะมีความยาวประมาณ 20 เซนติเมตร (กรมประมง. 2548) ปลาสดยังมีลักษณะความแตกต่างของเพศระหว่างเพศผู้และเพศเมีย โดยเพศผู้จะมีลักษณะลำตัวยาวเรียว สันหลัง และสันท้องเกือบเป็นเส้นขนานกัน ลายเข้มมีสีสวดยกว่าเพศเมีย และมีน้ำหนักร้อยกว่าเพศเมีย ปลาสดเพศเมียมีลักษณะลำตัวสั้นป้อม มีท้องยาวมน ไม่ขนานกับสันหลัง มีสีจาง และมีน้ำหนักร้อยกว่าเพศผู้ (สัญญาชัย บุญญะธานี. 2548) ปลาสดสามารถผสมพันธุ์ และวางไข่ได้เมื่อมีอายุ 7 เดือน โดยเกษตรกรนิยมจับปลาอายุประมาณ 8 เดือน มาจำหน่ายเพื่อนำไปทำปลาสดตากแห้ง ขนาดของปลาสดที่โตเต็มที่โดยเฉลี่ยจะมีขนาดตัวยาวประมาณ 6-7 นิ้ว หนัก 130-400 กรัม ปลาสดจะเริ่มวางไข่ตั้งแต่เดือนเมษายน ถึงเดือนสิงหาคม หรือช่วงในฤดูฝน นอกจากการใช้ลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของลำตัวปลาสดมาใช้ในการจัดจำแนกปัจจุบันมีการนำวิธีการนำข้อมูลทางพันธุกรรมมาช่วยในการจัดจำแนกโดยในสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอตมักนิยมใช้ระดับสปีชีส์สำหรับในยูคาริโอตหรือสัตว์ชั้นสูง นอกจากยีน 18S rDNA และ ITS1 ITS2 ก็ยังมียีนอื่นที่ได้รับความสนใจ โดย Steinke และคณะ (2009) ใช้ยีน Cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) มาเป็นตัวจัดจำแนกปลาการ์ตูนที่เดินทางในอเมริกาเหนือ และ Wicht และคณะ (2010) สามารถจัดจำแนกปรสิติในปลาโดยอาศัยยีน Cytochrome c oxidase subunit 1 และ Cytochrome b (Cytb) เช่นกัน ซึ่งทั้งยีน COI และ Cytb เป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย ถูกนำมาใช้เป็น Molecular Marker ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แมลง นก สัตว์เลื้อยคลาน และ ปลา เป็นต้น สำหรับปลาสดถูกนำมาทำคาร์โบไทป์พบว่ามีความโครโมโซมเท่ากับ 46 แท่ง (ธวัช ตอนสกุล,

วิเชียร มากตุ่น และอิโรชิ อุวะ. 2530) นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์หาความแตกต่างของพลาสติกโดยใช้ไอโซไซม์ 14 ชนิด มาทำการเปรียบเทียบกัน (แสงทอง ประเสริฐวิริยะกุล. 2539) นอกจากนี้ก็มีวิธีอื่นๆอีกมากมายที่นำมาช่วยในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต เช่น polymerase chain reaction และ microsatellite DNA marker technique (Pongthana. 2001) พลาสติกเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้กับประเทศอย่างมาก (แสงทอง ประเสริฐวิริยะกุล. 2539) และพลาสติกบางบ่อเป็นที่รู้จักและยอมรับของคนทั่วไปว่ามีรสชาติอร่อยด้วยความมีชื่อเสียงของพลาสติกในพื้นที่ พลาสติกจึงเป็นเอกลักษณ์หนึ่งในคำขวัญของจังหวัดสมุทรปราการ แต่ในปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมได้ขยายตัวอย่างแพร่หลายและมีการปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งเป็นแหล่งน้ำที่เกษตรกรใช้ในการเพาะเลี้ยงปลา (เจียมจิต บุญสม. 2529) นอกจากนี้พื้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาในจังหวัดสมุทรปราการเริ่มลดจำนวนลง จนทำให้ปริมาณพลาสติกที่ผลิตได้ภายในจังหวัดสมุทรปราการไม่เพียงพอต่อการนำมาแปรรูป จึงมีการนำพลาสติกจากพื้นที่อื่นมาทำการแปรรูปแทนที่พลาสติกจากบางบ่อ ทำให้เอกลักษณ์ที่แท้จริงของพลาสติกบางบ่อสูญหายไปเนื่องจากพลาสติกจากต่างพื้นที่มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการจัดจำแนกพลาสติกที่มาจากพื้นที่ต่างกัน โดยงานวิจัยนี้ต้องการจะบอกความแตกต่างพลาสติกที่มาจากแหล่งต่างกันโดยอาศัยการเปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานทางสัณฐานวิทยาและใช้ความแตกต่างทางพันธุกรรมเข้ามาช่วยในการจัดจำแนกพลาสติกที่มาจากแหล่งต่างกัน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะภายนอกโดยใช้หลักการเครือข่ายโครงยัดในปลาสดสด จาก จังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดสระแก้ว จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดอยุธยา จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม
2. ศึกษาค่าดัชนีสมบรูณ์เพศของปลาสดสดจาก จังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดสระแก้ว จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดอยุธยา จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม
3. เพื่อเปรียบเทียบยีน Cytochrome oxidase subunit 1 และ Cytochrome *b* ของปลาสดสดจาก จังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดสระแก้ว จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดอยุธยา จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม
4. เพื่อทำการจัดกลุ่มปลาสดสดโดยการทำให้ phylogenetic tree จากข้อมูลของยีน Cytochrome oxidase subunit 1 และ Cytochrome *b*

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

การเลี้ยงปลาสดสดในพื้นที่ๆสภาพแวดล้อมด้วยกระบวนการเลี้ยงและสายพันธุ์สืบทอดที่แตกต่างกัน ลักษณะรูปร่างและพันธุกรรมของปลาอาจแตกต่างกัน

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

นำปลาสดอายุเฉลี่ย 8 เดือน จากบ่อเลี้ยงในจังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดสระแก้ว จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดอยุธยา จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม มาทำการวัดขนาดสัดส่วน น้ำหนัก และสังเกตรูปร่าง ลาย พร้อมทั้งชั่งน้ำหนักของไข่ปลา และทำการสุ่มปลาเพื่อเป็นตัวแทนไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อนำไปเพิ่มขยายส่วนของยีน Cytochrome oxidase subunit 1 และ Cytochrome *b* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain reaction และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่นำมาศึกษาเพื่อนำไปสร้างเป็นแผนภาพ phylogenetic tree

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยจะสามารถเป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไปได้ เช่น ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการส่งเสริมการเลี้ยงปลาชนิด
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานการยืนยันเอกลักษณ์ หรือชี้ให้เห็นถึงสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (Geographic information)
3. เป็นข้อมูลพื้นฐานรูปร่างของปลาชนิดจากแต่ละพื้นที่

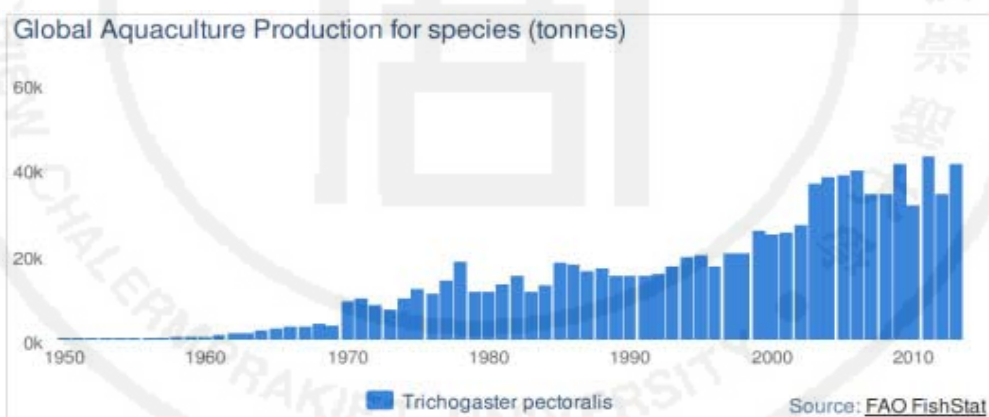


บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อัตราการผลิตพลาสติก

พลาสติกเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายเพราะเป็นปลาที่มีราคาดี จากสถิติในช่วงปี 2555 มีราคาพลาสติกสดสูงสุดที่ 70 บาท (องค์การสะพานปลา. ม.ป.ป.) ราคาจะขึ้นกับขนาดของตัวปลาและฤดูกาลโดยพลาสติกจะมีราคาแพงในช่วงเดือน สิงหาคม-กันยายน เนื่องจากพลาสติกให้ลักษณะเนื้อที่มีไขมันมากและมีราคาสูง ส่วนเดือน มีนาคม-เมษายน พลาสติกจะมีราคาถูก เพราะน้ำในแหล่งน้ำแห้ง ทำให้จับปลาได้ในปริมาณมากส่งผลให้ราคาปลาตกต่ำ (ศิริจรรยา เขาประเสริฐ. 2551) และ จากสถิติการส่งออกของสัตว์น้ำของประเทศไทยในช่วงปี 2545 พบว่าการส่งออกพลาสติกเป็นอันดับ 4 ของสัตว์น้ำจืด โดยมีอัตราปริมาณการผลิตพลาสติกเท่ากับ 24,179 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1,099,588 ล้านบาท รองจาก ปลาตุ๊ก ปลานิล และปลาตะเพียน (กรมประมง. 2545) และมีอัตราการผลิตพลาสติกทั้งโลกที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี ดังภาพที่ 2.1

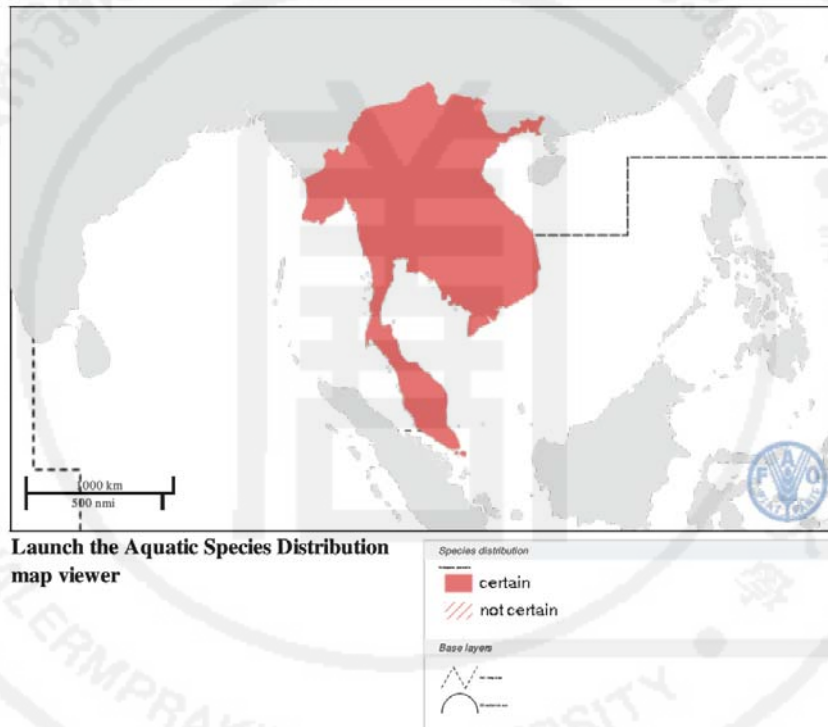


ภาพที่ 2.1 อัตราการผลิตพลาสติกจากทั่วโลก

ที่มา : <http://www.fao.org/fishery/species/3321/en>

2.2 แหล่งที่พบปลาสลิค

ปลาสลิคหรือปลาใบไม้เป็นปลาน้ำจืด ซึ่งเป็นปลาพื้นบ้านของประเทศไทย มีแหล่งกำเนิดอยู่ในที่ลุ่มภาคกลาง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Trichogaster pectoralis* หรือชื่อสามัญว่า snakeskin gourami และนิยมเลี้ยงกันมากบริเวณภาคกลาง ส่วนที่พบในประเทศเพื่อนบ้าน (ภาพที่ 2.2) เช่น กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย พม่า อินเดีย ปากีสถาน ศรีลังกา และฟิลิปปินส์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ปลาที่ส่งไปจากเมืองไทย เมื่อประมาณ 80-90 ปีที่ผ่านมา (กรมส่งเสริมการเกษตร. ม.ป.ป.)



ภาพที่ 2.2 ภาพการแพร่กระจายของปลาสลิค

ที่มา : <http://www.fao.org/fishery/species/3321/en>

2.3 การจัดจำแนกปลาสลิค

ปลาสลิคจัดอยู่ใน Family Anabantidae ซึ่งมีชื่อสามัญหลายชื่อ เช่น snakeskin gourami, sepat Siam ซึ่งเป็นปลาที่อยู่ในวงศ์เดียวกับปลาสลิค ได้แก่ ปลาหมอ ปลาหมอตาล ปลาแรด ปลากริม ปลากัด และปลากระดี่ (สัญญาชัย บุญญะธานี. 2548)

อนุกรมวิธาน (Taxonomy)

การจัดจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ (Berg. 1947)

Phylum : Vertebrata

Subphylum : Craniata

Superclass: Gnothostomata

Series: Pisces

Class: Teleostomi

Subclass: Acytimopterygii

Order: Cypriniformes

Suborder: Anabantoidel, Labyrinthici

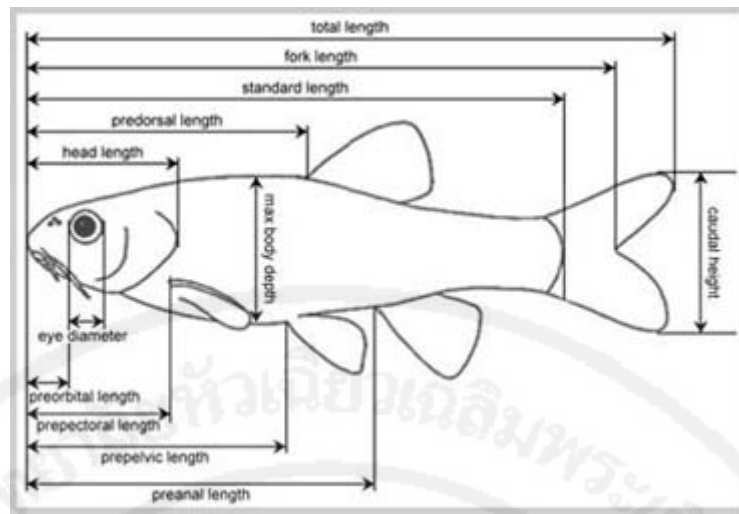
Family: Anabantidae

Genus: Trichogaster Bloch. 1809

Species: Trichogaster pectoralis Regan. 1910

2.3.1 การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology identification)

การจัดจำแนกสปีชีส์ของปลาแบบดั้งเดิมจะยึดการศึกษารูปร่าง ลักษณะภายนอก (ภาพที่ 2.3) รวมถึงรูปแบบของสี ขนาดและจำนวนเกล็ด ตำแหน่งและจำนวน ชนิดรัศมีของครีบ หรือการหาความสัมพันธ์จากการวัดขนาด และอัตราส่วนของตัวปลา (Strauss and Bond. 1990) และยังสามารถหาความแตกต่างในสปีชีส์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกันมากโดยดูจากซี่ของเหงือกปลา (Fahmida. 2002) ในบางครั้งมีการศึกษาจากส่วนของกระดูกหู (otoliths) และอาหารที่พบอยู่ในกระเพาะอาหารของฟอสซิล (Pierce and Boyle. 1991; Granadeiro and Silva. 2000) นอกจากลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของลำตัวยังมีการใช้ระยะของการเจริญไม่ว่าจะเป็นไข่หรือระยะเป็นตัว



ภาพที่ 2.3 ภาพแสดงการวัดสัดส่วนปลา

ที่มา : <http://www.fishbase.org/identification/Morphometrics/centimeters/Index.php>

รูปร่างลักษณะของปลาสลิค (Morphology of *Trichogaster pectoralis*)

การศึกษาตัวอ่อนของปลา ชนิด ลักษณะของไข่และความตกของไข่มาใช้ในการช่วยในการจัดจำแนก (Amornsakun et al. 2004) มีเว็บไซต์ที่ให้ข้อมูลมากมายเกี่ยวข้องกับลักษณะรูปร่างของปลา (www.fishbase.org) และลักษณะจำเพาะของกระดูกหู (www.pescabase.org) ปลาสลิคมีรูปร่างคล้ายปลากระดี่หม้อ แต่ขนาดโตกว่า ลำตัวแบนข้างมีครีบ ท้องยาวครึ่งเดียว สีของลำตัวมีสีเขียวออกเทาหรือมีสีคล้ำเป็นพื้น และมีริ้วดำพาดขวางตามลำตัวจากหัวถึงโคนหาง เกิดดบนเส้นข้างตัวประมาณ 42-47 แถว ปากเล็กยึดหดได้ ปลาสลิคซึ่งมีขนาดใหญ่เต็มที่จะมีความยาวประมาณ 20 เซนติเมตร (กรมประมง. 2548) ปลาสลิคยังมีความแตกต่างของเพศระหว่างเพศผู้และเพศเมียโดยเพศผู้จะมีลักษณะลำตัวยาวเรียว สันหลังและสันท้องเกือบเป็นเส้นขนานกัน ลายเข้มมีสีสวกว่าเพศเมีย และมีน้ำหนักน้อยกว่าเพศเมีย ปลาสลิคเพศเมียมีลักษณะลำตัวสั้นป้อม มีท้องยาวมนไม่ขนานกับสันหลัง มีสีจางและมีน้ำหนักมากกว่าเพศผู้ (สัญญาชัย บุญญะธานี. 2548) ปลาสลิคสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้เมื่อมีอายุ 7 เดือน ปลาสลิคขนาดโตเต็มที่โดยเฉลี่ยจะมีขนาดตัวยาวประมาณ 6-7 นิ้ว น้ำหนักประมาณ 130-400 กรัม ปลาสลิคจะเริ่มวางไข่ตั้งแต่เดือนเมษายน ถึงเดือนสิงหาคม หรือในช่วงฤดูฝน แม่ปลาดูตัวหนึ่งๆ จะสามารถวางไข่ได้หลายครั้ง แต่แต่ละครั้งจะได้ปริมาณไข่ประมาณ 4,000-10,000 ฟอง ในฤดูวางไข่ท้องแม่ปลาจะอูมโป่งออกมาทั้งสองข้าง ลักษณะของไข่ปลาสลิคมีสีเหลือง (กรมส่งเสริมการเกษตร. ม.ป.ป.)

2.3.2 การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular Biology identification)

สำหรับการจัดจำแนกแบบด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาแบบดั้งเดิมจะอาศัยโปรตีนที่จำเพาะ โดยใช้เทคนิคทาง electrophoresis เช่น isoelectrofocusing (IEF) (Rehbein. 1990) Capillary electrophoresis (CE) (Kvasnicka. 2005), HPLC (Hubalkova et al. 2007) หรือใช้เทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยามาใช้ เช่น Enzyme-Link ImmunoSorbent (ELISA) ซึ่งในปัจจุบันมีหลายบริษัทที่พัฒนา ELISA diagnostic kit ออกมาใช้ในการตรวจสอบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Asensio et al. 2008) แต่การตรวจสอบด้วยโปรตีนมีข้อจำกัดคือ ต้องใช้ตัวอย่างที่สดใหม่ จึงทำให้เกิดการพัฒนาการตรวจสอบทางด้าน DNA ขึ้นมา เนื่องจาก DNA เป็นแหล่งของข้อมูลทางพันธุกรรม และ DNA สามารถทนต่อการบรรจุกระป๋อง ทนต่อความร้อน นอกจากนี้ DNA สามารถจับกับสับสเตรท (substrate) ได้หลากหลายและพบในทุกเนื้อเยื่อ และมีข้อมูลในส่วนที่เป็นทั้ง coding และ non-coding region (Teletchea et al. 2005) ดังนั้นการตรวจสอบโดยใช้ DNA จึงถูกพัฒนาและได้รับความนิยมนำไปใช้ประโยชน์อย่างหลากหลายมากกว่าการตรวจทางโปรตีน การจัดจำแนกโดยใช้ DNA จะถูกนำมาใช้ในการบอกความแตกต่างในสปีชีส์โดยการสกัด DNA มาจากชิ้นส่วนของกล้ามเนื้อ ครีบ หรือเลือด (Lockley and Bardsley. 2000 ; Teletchea et al. 2005) ซึ่งการจัดจำแนกด้วย DNA ด้วยวิธีแรกเริ่มจะใช้ PCR-RFLP, PCR-sequencing และ PCR specific primer และในปัจจุบันมีการนำเทคนิคใหม่ๆ เข้ามาใช้ในการจัดจำแนก เช่น PCR-SSCP, PCR-RAPD, PCR-DGGE, PCR-ALFP การ cloning และ sequencing นอกจากนี้ก็มีเทคนิค real-time PCR และ microarray เป็นต้น เทคนิคเหล่านี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกหรือตรวจสอบตัวอย่างปลา โดยดูจากการทำงานวิจัยที่อ้าง 10 ปี ที่ผ่านมา ตั้งแต่ปี ค. ศ. 1997-2007 ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน โดยพบว่าวิธี PCR-RFLP มีผู้นำไปใช้มากที่สุด รองลงมาคือ เทคนิค PCR – sequencing ซึ่งเป็นวิธีที่ราคาถูกและให้ผลรวดเร็ว

2.4 เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิต

2.4.1 เทคนิค PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

เทคนิค PCR-RFLP เป็นเทคนิคที่นำชิ้นส่วนของยีนที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ endonuclease ซึ่งจะมีความจำเพาะกับบริเวณจุดตัด เป็นผลให้ได้ชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน และชิ้นส่วนดังกล่าวจะถูกนำไปแยกด้วย agarose gel electrophoresis เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ง่าย และเสถียร และราคาถูกเมื่อเทียบกับเทคนิค PCR-sequencing แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ อาจมีการตัดแบบไม่สมบูรณ์เกิดขึ้น และความหลากหลายภายในสปีชีส์อาจจะถูกตัดออกไปหรือ

เพิ่มเข้ามาในส่วนของคุณตัด และเทคนิคนี้ต้องการความรู้พื้นฐานของยีนที่ต้องการนำมาตัดจากตัวอย่างอีกด้วย (Lockley and Bardsley. 2000)

2.4.2 เทคนิค PCR –sequencing

เทคนิค PCR –sequencing เป็นเทคนิคที่ใช้ลำดับของสาย DNA โดยทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่สนใจด้วยเทคนิค PCR ก่อน จากนั้นนำชิ้นส่วน PCR product ไปทำให้บริสุทธิ์ และนำไปหาลำดับเบส (Lockley and Bardsley. 2000; Asensio. 2007) ซึ่งการหาลำดับเบสแบบเดิมจะใช้เวลานาน และต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการทำและมีราคาสูง แต่ในปัจจุบันทั้งปัญหาของราคาและระยะเวลาที่นานในการทำนั้นลดลง และถูกนำมาใช้ในการหาลำดับของยีน 16S rRNA หรือการหา SNPs (single nucleotide polymorphism) เพื่อใช้บอกความแตกต่างของแต่ละสปีชีส์กันอย่างแพร่หลาย (Maretto et al. 2007) เทคนิค sequencing ใหม่ที่เรียกว่า pyrosequencing โดยเทคนิคนี้อาศัยการตรวจสอบ pyrophosphate (PPi) ที่ถูกปล่อยออกมาจาก dNTPs ในระหว่างการสังเคราะห์สาย DNA ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ช่วงคลื่นแสงที่สามารถมองเห็นได้ โดยจำนวนของแสงจะสัมพันธ์กับนิวคลีโอไทด์ (Ronaghi. 2001)

2.4.3 เทคนิค PCR specific primer

เทคนิค PCR specific primer จะอาศัยความข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะของในแต่ละสปีชีส์นำไปใช้ในการออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจง ที่สามารถให้ชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน เช่นการทำ Multiplex PCR ซึ่งมีออกแบบ primer มากกว่า 1 คู่ ให้จำเพาะกับเป้าหมายที่สนใจได้หลายๆเป้าหมายและสามารถนำมาตรวจสอบผลได้พร้อมกันในเวลาเดียวกัน ซึ่งเทคนิคนี้มีความจำเพาะเจาะจงและช่วยประหยัดเวลา (Michelini et al. 2007)

2.4.4 เทคนิค PCR specific primer

เทคนิค PCR specific primer จะอาศัยความข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะของในแต่ละสปีชีส์นำไปใช้ในการออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจง ที่สามารถให้ชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน เช่นการทำ Multiplex PCR ซึ่งมีออกแบบ primer มากกว่า 1 คู่ ให้จำเพาะกับเป้าหมายที่สนใจได้หลายๆเป้าหมายและสามารถนำมาตรวจสอบผลได้พร้อมกันในเวลาเดียวกัน ซึ่งเทคนิคนี้มีความจำเพาะเจาะจงและช่วยประหยัดเวลา (Michelini et al. 2007)

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบ 10 วิธี ที่ใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ของปลาในช่วงปี ค.ศ. 1997-2007

Techniques	DNA quality ^a	Admixtures ^b	Prior Knowledge ^c	Quantitative ^d	Intraspecific variations ^e	Reproducibility ^f	Developing time ^g	Cost ^h	Speed analysis ⁱ	Main advantage ^s	Main disadvantage ^k
PCR-RLFP	+	Yes	Yes	No	Yes	Yes	+	+	+	Fast	Incomplete digestion
PCR-sequencing	+	No	Yes/No	No	No	Yes	+	++	++	Quantity of information	Cost
PCR-specific primers	+	Yes	Yes	No	Yes	Yes	+	+	+	Fast	Low taxonomic range
PCR-SSCP	+	No	Yes	No	Yes	Yes/No	+	+	+	Fast	Reproducibility
Real-time PCR	++	No	Yes	Yes	No	Yes	++	+	+	Quantity of information	Cost
PCR-RAPD	+++	No	Yes	No	No	Yes/No	+	+	+	Fast	Quality of genomic DNA
PCR-DGGE	++	No	Yes	No	Yes	Yes	+	+	+	Fast	Discriminatory power
PCR-AFLP	+++	No	Yes	No	No	Yes/No	+	++	++	Sensitivity	Quality of genomic DNA
Cloning and Sequencing	+	Yes	No	?	No	?	++	+++	+++	Admixtures	Cost
Microarray	+	Yes	No	?	No	Yes	++++	+++	+++	Admixtures	Developing time

ที่มา : Teletchea. (2009)

2.4.5 เทคนิค Real time PCR

เทคนิค Real time PCR หรือที่เรียกว่า Real time quantitative PCR (qPCR) โดยเทคนิคนี้ จะมีการเพิ่มปริมาณของ DNA และสามารถวัดปริมาณ DNA ที่เพิ่มจำนวนขึ้นในแต่ละรอบได้โดยอาศัย florescent reporter ที่เติมลงไป โดยตัว reporter นี้เป็นโมเลกุลของสาย oligonucleotide ที่มีสีของ florescent ติดอยู่ที่ปลาย 5' และมี florescence quencher ติดอยู่ที่ปลาย 3' ซึ่งสายของ oligonucleotide นี้จะถูกออกแบบให้สามารถเข้าจับกับตำแหน่งระหว่างสอง primer ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ *Taq* DNA polymerase จะย่อยโพรบและปล่อยโมเลกุลของ reporter นั่นคือ สี fluorescences ออกมา ปริมาณของสี fluorescences จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของชิ้นส่วน PCR product ที่เพิ่มขึ้นมาในระหว่างการทำ PCR (Lockley and Bardsley, 2000)

2.4.6 เทคนิค PCR-RAPD (PCR Random Amplified polymorphic DNA)

เทคนิค PCR-RAPD ประกอบไปด้วยการเพิ่มจำนวน DNA โดย PCR โดยใช้ primer สายสั้นๆ ซึ่งจะทำให้การสุ่มจับกับจีโนม และนำไปแยกชิ้นส่วนของ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ซึ่งข้อดีของวิธีนี้ก็คือ ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลพื้นฐานของยีนของตัวอย่างที่สนใจนำมาตรวจสอบ แต่ข้อเสียคือ ไม่สามารถนำมาทำซ้ำได้ และหากมีหลายสปีชีส์ที่รวมกันอยู่จะไม่สามารถแยกออกได้ และหากมีการปนเปื้อนจะทำให้ไม่สามารถบอกผลได้ เทคนิคนี้ถูกนำไปใช้บอกความแตกต่างหรือวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตในระหว่างสปีชีส์

2.4.7 เทคนิค PCR-AFLP (PCR Amplified Fragment Length Polymorphism)

เทคนิค PCR-AFLP เป็นเทคนิคที่ใช้ในการคัดเลือกเป้าหมายที่จะนำมาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR และใช้เป็นจุดตัดจาก genomic DNA เทคนิค PCR-AFLP จะใช้ restriction enzyme ตัด genomic DNA โดยทำการเชื่อมต่อ adaptors ที่ปลายของของชิ้น DNA และเมื่อทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ DNA ก็จะเป็นการเพิ่มขึ้นส่วนของ adaptor ที่ต่อไว้ด้วย หลังจากนั้นชิ้นส่วนที่ถูกเพิ่มจำนวนจะถูกแยกด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (Vos et al. 1995)

2.5 ยีนเป้าหมายที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต (DNA marker target)

เนื่องจากมีวิธีการศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตหลายรูปแบบโดยใช้ยีนในการจัดจำแนกอย่างกว้างขวาง แต่ไม่มีข้อตกลงหรือจัดลำดับอย่างเป็นทางการว่ายีนใดของส่วนใดบนยีนจะเป็นตัวแทนข้อมูลที่ดีสำหรับเป็นตัวแทน (molecular marker) ในการศึกษาวิวัฒนาการ อย่างไรก็ตามข้อมูลจีโนมไทป์ที่ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ และศึกษาวิวัฒนาการในด้านของการเป็น molecular marker มากที่สุดคือ ดีเอ็นเอจากภายในนิวเคลียส (nuclear rDNAs) และ ดีเอ็นเอจากไมโทคอนเดรีย (mtDNA)

2.5.1 Nuclear rDNA และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

Nuclear rDNA ซึ่งควบคุมการสร้าง rRNAs ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ทางวิวัฒนาการอย่างกว้างขวาง nuclear rDNA ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง มีการจัดเรียงตัวในลักษณะของ tandem repeat ซึ่งซ้ำกันประมาณ 5,000 ครั้ง แต่ละ repeat unit ประกอบด้วยยีนที่ควบคุมการสร้าง nuclear small subunit (SSU), large subunit (LSU) และ 5.8S rDNA แต่ละส่วนจะถูกคั่นด้วย spacer โดย SSU และ LSU rDNAs ถูกคั่นด้วย external transcribed spacer (ETS) จำนวน 2 บริเวณ และ non-transcribed spacer จำนวน 1 บริเวณ ซึ่ง spacer ทั้งสองชนิดนี้เรียกรวมกันว่า intergenic spacer (IGS) ส่วน 5.8S rDNA อยู่ระหว่าง Internal transcribed spacers (ITS) 2 บริเวณ คือ ITS1 และ ITS2

2.5.2 mtDNA และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

mtDNA ของสัตว์หุเซลล์มีลักษณะเป็นวงกลมปิด ยกเว้นใน Cnidarians ซึ่งเป็นเส้นตรงหนึ่งหรือสองเส้น (Warrior and Gall. 1985; Bridge et al. 1992) ขนาดของ mtDNA มีตั้งแต่ 11-17 kbp บางชนิดมีขนาดประมาณ 40 kbp (Wolstenholme. 1992) อย่างไรก็ตาม ลำดับเบสของ mtDNA ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก เนื่องจากขนาดที่ใหญ่ขึ้น เนื่องจากความยาวของ non coding region (Harrisson. 1989) หรือ iteration ของ mtDNA บางส่วน (Moritz and Brown. 1987; Stanton et al. 1994) นอกจากนี้พบว่า mtDNA มีวิวัฒนาการที่เร็วกว่า nuclear genome ดังนั้นยีนที่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีนในไมโทคอนเดรีย จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ในระดับ families, genera, species และ populations เนื่องจากการเกิดกระบวนการการแทนที่ของเบส (substitution) ใน codon ตำแหน่งที่ 3 (Wobble positions) ดังนั้นลำดับเบสบนยีนที่สร้างโปรตีนจึงถูกนำมาใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับ species และ populations (Navajas et al. 1996) ในทางตรงกันข้ามลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ถูกสร้างจาก mtDNA มีความอนุรักษ์สูงกว่าลำดับเบส จึงนิยมนำมาใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับ families หรือ orders (Liu and Beckenbach. 1992 ; Frati et al. 1997)

ถึงแม้ว่า mtDNA จะมีวิวัฒนาการที่รวดเร็วกว่า nuclear genome แต่ก็พบว่า 12S rDNA มีดีกรีของการอนุรักษ์สูงใกล้เคียงกับ SSU rDNA และมักใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับ phyla หรือ subphyla (Ballard et al. 1992) ในขณะที่ 16S rDNA มักใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระดับวิวัฒนาการระดับ families หรือ genera (Black and Piesman. 1994; Kambhampah et al. 1996) และเมื่อเปรียบเทียบกับ nuclear rDNA แล้ว พบว่าการออกแบบ universal primer ให้สอดคล้องกับการทำ PCR amplification ของ mtDNA ค่อนข้างทำได้ยาก เนื่องจากมีความผันแปรของลำดับเบสค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงมักจะพบข้อมูลของยีนใน mtDNA จำนวนไม่มากนัก ในการนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เช่น 12S rDNA, 16S rDNA, Cytb, NADH dehydrogenase 1 (ND1) และ COI โดยทั่วไป 12S rDNA และ 16S rDNA มีความอนุรักษ์สูงมากกว่ายีนอื่นๆใน mtDNA ยีน COI อนุรักษ์มากกว่ายีน COII และ COIII นอกจากนี้ยังพบว่า ยีน ND1 อนุรักษ์มากกว่ายีนที่สร้างเอนไซม์ NADH dehydrogenase ชนิดอื่น แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ดีกรีของการอนุรักษ์ของยีน COI มากกว่า Cytb และ Cytb มากกว่า ND1 และในปัจจุบันมีข้อมูลของยีน 12S และ 16S rDNA, Cytb, COI และ ND1 เนื่องจากลำดับของการอนุรักษ์ในลำดับเบสค่อนข้างสูงจึงทำให้ง่ายต่อการออกแบบ universal primer สำหรับการทำให้ PCR

2.6 การคัดเลือก molecular markers หรือ gene regions

กระบวนการคัดเลือก molecular markers หรือ gene regions เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการวิเคราะห์ทางวิวัฒนาการ การเลือก molecular markers หรือ gene regions ที่ไม่เหมาะสม และไม่สอดคล้องกับประเด็นคำถาม จะทำให้ได้ข้อมูลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ไม่ถูกต้อง และมีความคลาดเคลื่อน ยกตัวอย่างเช่น ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกันมากจะนิยมใช้ข้อมูลของ coding genes ใน mtDNA เช่น ยีน Cytb, COI, COII, ND1 หรือ ND2 และ nuclear rDNA spacers เช่น IGS หรือ ITS มากกว่าใช้ nuclear SSU, LSU และ 5.8S rDNA

ยีนที่นิยมนำมาใช้หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

2.6.1 Nuclear ribosomal genes

ยีน 16S rRNA ในปี 1965 Dubnau และคณะ ได้ศึกษาบริเวณอนุรักษ์ของลำดับเบสใน ยีน 16S rRNA จากลำดับเบสของเชื้อในสปีชีส์ *Bacillus* (Dubnau et al. 1965) และยีนนี้ถูก นำมาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย แต่ในขณะเดียวกันลำดับเบสบริเวณอนุรักษ์ ของยีน 16S rRNA ก็ไม่สามารถใช้บอกวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่มีอัตราการวิวัฒนาการเท่าๆกัน แต่คุณสมบัติของสิ่งนี้ ช่วยบอกความแตกต่างของแบคทีเรียที่ต่างกลุ่มกันได้ (Gutell et al. 1993; Woese. 1987; Clarridge. 2004) ยีน 16S rRNA มีขนาด 1,550 bp และประกอบไปด้วยทั้งบริเวณที่มีความผัน แปร และอนุรักษ์ที่มีลักษณะจำเพาะกับกลุ่ม (Chen et al. 1989) ยีน 16S สามารถพบได้ในทุกสปีชีส์ของแบคทีเรีย และสามารถวัดความสัมพันธ์ของสปีชีส์ในแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ยังใช้ในการ หาแบคทีเรีย unknown การศึกษา 16S และ 23S rRNA จะเป็นส่วนสำคัญในการจัดจำแนก แบคทีเรีย และใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (Clarridge. 2004)

2.6.2 Mitochondrial genes (mtDNA)

ข้อมูลจากไมโทคอนเดรียมีความสำคัญอย่างมากในการศึกษาการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ ยีนในไมโทคอนเดรียมีความผันแปรและสามารถแบ่งเป็นส่วนๆ โดยส่วนใหญ่ๆจะเป็น non-coding DNA การใช้ไมโทคอนเดรียช่วยเพิ่มอัตราการศึกษการจัดจำแนกมากขึ้นโดยใช้การตัดจำเพาะของ เอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงกับลำดับเบสที่แตกต่างในสาย DNA (Brown et al. 1982)

ยีน **Cytochrome c oxidase subunit I/II (COI/II)** เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการ ขนส่งอิเล็กตรอนในขบวนการ electron transport chain และสามารถพบได้ในทั้งแบคทีเรียและไม โทคอนเดรีย ยีนของCOI และ COII มีขนาดเท่ากับ 2 หน่วย จาก 7 หน่วยใน cytochrome c oxidase complex โดยยีน COI มีขนาดประมาณ 894 bp และทั้ง COI และCOII ยีนถูกใช้ในการ แก้ปัญหาในการจัดลำดับในแมลงที่มีความใกล้ชิดทางสปีชีส์กัน และในส่วนของ subfamilies families และ order โดยยีน COI จะมีวิวัฒนาการช้าหากเทียบกับยีนอื่นๆในไมโทคอนเดรีย (Russo et al. 1996) จึงนิยมนำมาใช้ในการศึกษา Molecular phylogenies อย่างแพร่หลาย ยีน COI และ COII ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ในพยาธิ และในปัจจุบันยีน COI ถูกนำมาใช้เป็น barcode ในการจัดแบ่งกลุ่มของแมลง (Zhang and Sota. 2007)

ยีน **Cytochrome b** เป็นยีนที่มีขนาดประมาณ 1,143 bp และถูกรายงานว่าใช้เป็น marker ในการหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกันมาก ยีน *Cytb* จะมีประโยชน์มาก และถูกนำไปใช้ในการหาสัญญาณ และจัดกลุ่มของจีโนส *Peromyscus* (หมัดควาง) (Bradley et al. 2007) และใช้ในการจัดจำแนก 5 จีโนส ของนก Indo-Himalayan ในระดับสปีชีส์ นอกจากนี้ยังมีการใช้ในส่วนของยีนควบคุม (control region (CR)) ร่วมในการจัดจำแนกด้วย (Randi et al. 2001)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ และนนทวิ ปานพรหมมินทร์ (2557) ได้นำเอา DNA barcode ไปใช้ในการจัดจำแนกชนิดปลาในวงศ์เสือดอ จำนวน 4 ชนิดได้แก่ ปลาเสือดอลายใหญ่ ปลาเสือดอลายเล็ก ปลาเสือดอลายคู่ ปลากระพงลายคู่ โดยนำยีน *Cytochrome c oxidase I* มีทำการออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งข้อมูลของยีนในปลาดังกล่าวยังไม่พบในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD และพบว่า COI สามารถใช้แยกวงศ์ของปลาเสือดอได้อย่างชัดเจน และสามารถแยกวงศ์ปลาเสือดอจากปลาในวงศ์ใกล้เคียงได้อีกด้วย

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ และศิริภรณ์ อ่วมเจริญ (2557) ได้ทำการจำแนกชนิดปลาจากพื้นที่ปากปากันธุกรรมพีชในมหาวิทยาลัยพะเยาโดยใช้ยีน *Cytochrome c oxidase I* พบว่าวิธีนี้สามารถจำแนกปลาได้ 11 ชนิด ได้อย่างถูกต้อง โดยสามารถแบ่งปลาออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ ปลาในอันดับเพอร์ซิฟอร์เมส ไชพรีนิฟอร์เมส และซิลูริฟอร์เมส

Pongthana และคณะ (1999) ได้ทำการเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อ ตับ ไต เลือดและหัวใจ มาจากปลาสดจากในประเทศไทยมา 5 จังหวัด ได้แก่ สมุทรปราการ พิษณุโลก สุพรรณบุรี อุบลราชธานี และปัตตานี เพื่อนำมาศึกษาหาความแตกต่างของ isozyme จำนวน 14 ตัว พบว่าจากการศึกษา ปลาจากจังหวัดสมุทรปราการมีความใกล้เคียงกับปลาสดจากพิษณุโลก และปลาจากจังหวัดปัตตานีนี้มีความแตกต่างจากปลาสดจังหวัดพิษณุโลกมาก และจากการศึกษาทางสัณฐานวิทยา พบว่า ระยะห่างของหัวปลาสดจากจังหวัดพิษณุโลกมีขนาดยาวกว่ามาตรฐาน ส่วนปลาสดจากจังหวัดสมุทรปราการและสุพรรณบุรีมีลักษณะใกล้เคียงกัน และ ขนาดความยาวของหัวปลาในจังหวัดอุบลราชธานีใกล้เคียงกับปัตตานี

Lin และคณะ (2005) ได้ทำการจัดจำแนกปลาทูน่า 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Thunnus thynnus*, *Thunnus alalunga*, *Thunnus obsus*, *Thunnus albacores* โดยใช้ยีน *Cytb* มาทำการออกแบบไพรเมอร์ จากนั้นมาทำ PCR-RFLP โดยตัดด้วยเอนไซม์ *BSP1286*, *HincII* และ *RsaI* ซึ่งสามารถจัดจำแนกปลาเศรษฐกิจเหล่านี้ได้อย่างรวดเร็ว

Persis และคณะ (2009) ทำการจัดจำแนกและหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลา Carangid ซึ่งเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในแถบบริเวณชายฝั่ง Kakinda ในประเทศอินเดีย สามารถใช้ยีน Cytochrome c oxidase - I (COI) ในไมโทคอนเดรียในการจัดจำแนกปลาออกเป็น 5 กลุ่ม จากปลาทั้งหมด 28 สปีชีส์ ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วและให้ผลดี โดยทำการเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะให้มียีนผลิตภัณฑ์ขนาด 650 bp จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทำการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม Clustal W และ phylogentic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 3.1

Filonzi และคณะ (2010) ได้ทำการตรวจสอบปลาที่จำหน่ายในตลาดในประเทศอิตาลีในปี 2008 โดยใช้ Molecular Barcode จากยีนในไมโทคอนเดรีย คือ Cytochrome *b* และ Cytochrome *c* oxidase ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปลาพบว่าจากจำนวนตัวอย่าง 69 ผลิตภัณฑ์ มีทั้งหมด 27 สปีชีส์ และพบว่า 22 (32%) ตัวอย่างติดฉลากผิด และมีการติดฉลากสลับสปีชีส์จำนวน 18 (26%) ตัวอย่าง ซึ่งก่อให้เกิดความผิดพลาดในปริมาณสารอาหารและทางด้านสิ่งแวดล้อมด้วย

Kochzius และคณะ (2010) ได้นำเทคโนโลยี DNA barcode ร่วมกับ DNA microarray มาใช้ในการจัดจำแนกปลาทะเลจากยุโรปซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจ จำนวน 50 สปีชีส์ ซึ่งในการทดลองจะทำการออกแบบไพรเมอร์จากยีนในส่วนของไมโทคอนเดรีย ได้แก่ 16S rRNA, Cytochrome *b* และ Cytochrome *c* oxidase I ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นพบว่า ยีน Cytochrome *b* และ Cytochrome *c* oxidase I เหมาะสมในการนำมาใช้ในการจัดจำแนกปลา แต่ยีน 16S rRNA จะมีความผิดพลาดในการตรวจปลาที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามการนำ เทคนิค DNA microarray มาใช้ยังต้องมีการพัฒนาต่อไปอีก

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องมือวิจัย

1. โกร่งบดสาร (mortar)
2. ชุดประกอบเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis Set; Bio-Rad)
3. ไมโครปิเปตต์ (micropipette); Biorad
4. หม้อนึ่งความดัน (autoclave); Hirayama รุ่น Ha-300 MII
5. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 25 x 150 มิลลิลิตร ; MEMERT รุ่น E760
6. หลอดทดลองพลาสติก (Microcentrifuge tube)
7. หลอดทดลองพลาสติก (ependorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
8. หลอดพลาสติกดูดสาร (tip) ขนาด 1-10, 10-100 และ 100-1,000 ไมโครลิตร
9. หลอดทดลองพลาสติกสำหรับใช้ทำพีซีอาร์
10. ตู้บ่มเชื้อ (incubator); Memmert
11. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven); MEMMERT รุ่น um 600
12. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (-80 องศาเซลเซียส); Thermo scientific รุ่น 702
13. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (-20 องศาเซลเซียส)
14. เครื่องถ่ายภาพด้วย UV (Gel documentary); BioRad รุ่น XR
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงอัตโนมัติ ; Hermle รุ่น Z32HK
16. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply); Bio-Rad รุ่น PowerPac 300
17. เครื่องผสมสาร (vortex mixer); Vortex geniez รุ่น G560E
18. เครื่องพีซีอาร์ (PCR Thermal Cycle); Eppendorf รุ่น vapor. Protect
19. เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (electronic digital balance); OHAUS
20. ถังไนโตรเจนเหลว (Nitogen tank)
21. เวอร์เนียคาลิเปอร์ (virnier caliper)

3.1.3 สารเคมี

1. สารละลาย Tris-borate buffer (TBE buffer)
2. อะกาโรสเจล (agarose gal); Seakem
3. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chlorich); UNIVAR
4. เอทีเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide) ; Sigma
5. ฟีนอลคลอโรฟอร์ม(Phenol chloroform); Sigma
6. สารละลาย Lysis buffer
7. เอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (70% ethanol)
8. เอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (absolution ethanol)
9. *Taq* DNA polymerase (1 U/ μ l) บริษัท invitrogen
10. Proteinase K (invitrogen)
11. พอร์เวิร์ตไพรมเมอร์ ความเข้มข้น 20 μ M (COIF)
12. รีเวิร์ตไพรมเมอร์ ความเข้มข้น 20 μ M (COIR)
13. พอร์เวิร์ตไพรมเมอร์ ความเข้มข้น 20 μ M (CytbF)
14. รีเวิร์ตไพรมเมอร์ ความเข้มข้น 20 μ M (CytbR)

3.1.4 แหล่งที่มาของพลาสติกที่ใช้ในการวิจัย

สั่งซื้อพลาสติกสตอายุเฉลี่ย 8 เดือน (อายุที่พร้อมจำหน่าย) จากบ่อเพาะเลี้ยงจากเกษตรกร ทั้งหมด 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดสระแก้ว จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดอยุธยา จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม ขนส่งมาโดยแช่ในถังโฟมที่มีน้ำแข็งตลอดเวลา

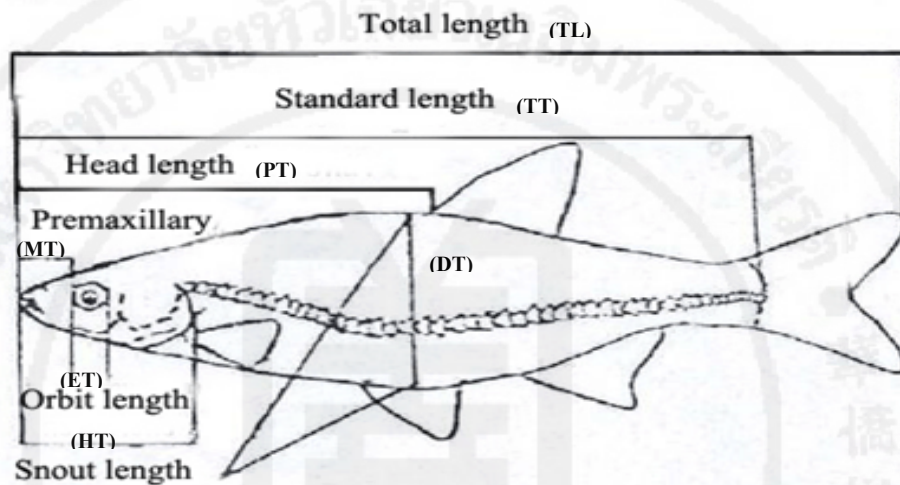
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 เก็บตัวอย่างพลาสติกและศึกษาลักษณะภายนอก

เก็บตัวอย่างพลาสติกสดทั้งเพศผู้และเพศเมียอายุเฉลี่ย 8 เดือน โดยรวมบ่อละ 100 ตัว จากบ่อเลี้ยงทั้งหมด 7 จังหวัด โดยสุ่มเลือกมาจังหวัดละ 1 บ่อ ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดสระแก้ว จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดอยุธยา จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม นำตัวอย่างพลาสติกที่จับมาใส่ในถังโฟมแช่น้ำแข็งตลอดเวลาขณะทำการทดลอง

3.2.1.1 ศึกษาขนาดของปลาสด

วัดขนาดปลา ดังนี้ ความยาวหัว(HT) ความยาวเหยียด(TL) ความยาวมาตรฐาน(TT) ความยาวปาก(MT) ความกว้างตา(ET) ความยาวหลัง(PT) และความลึกลำตัว(DT) และชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (มีหน่วยเป็นกรัม) และบันทึกภาพ และนำไปหาผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวเหยียด และน้ำหนักของปลาสด

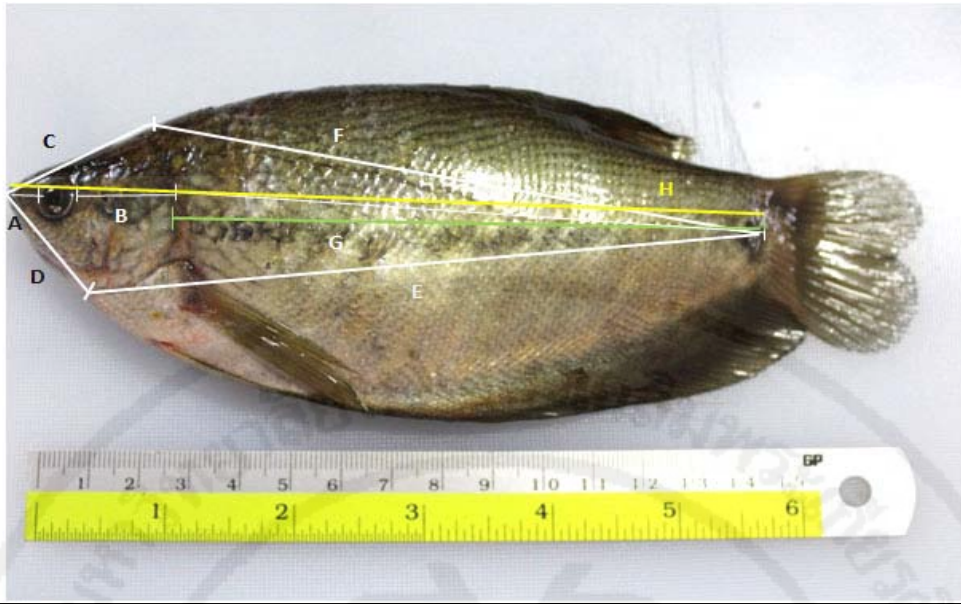


ภาพที่ 3.1 แสดงการวัดสัดส่วนปลา

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก <http://www.fishbase.org/identification/Morphometrics/centimeters/Index.php>

3.2.1.2 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา (อนันต์ เคนท้าว และพรพิมล เจียรนัยปรีเปรม. 2553)

การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาโดยใช้หลักการของระบบเครือข่ายโครงยิต การทดสอบความแตกต่างจากการวัดจุด 8 จุด ของปลาสดใน 7 จังหวัด โดยจุด A วัดตั้งแต่ปากถึงตา จุด B วัดตั้งแต่ตาถึงปลายเหงือก จุด C วัดตั้งแต่ ปากถึงขอบเหงือกบน จุด D วัดตั้งแต่ ปากถึงขอบเหงือกล่าง จุด E วัดตั้งแต่ขอบเหงือกล่างถึงโคนหาง จุด F วัดตั้งแต่ขอบเหงือกบนถึงโคนหาง จุด G วัดตั้งแต่ปลายเหงือกถึงโคนหาง จุด H วัดตั้งแต่ ปากถึงโคนหาง ดังภาพที่ 3.2



ที่มา : ภาพถ่ายโดย พรพิมล กาญจนวาส (2015)

ภาพที่ 3.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาโดยใช้ข้อมูลเครือข่ายโครงยึดในพลาสติกจากจังหวัดต่างๆ

3.2.1.3 การศึกษาค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index ; G.S.I.) (ธนัชฐา ทร
รพันธ์. 2543)

ทำโดยนำพลาสติกเพศเมียมาซึ่งน้ำหนักและผ่าท้องเพื่อนำไข่ออกมาซึ่งน้ำหนัก ตัวอย่างปลาที่วัดขนาดเสร็จเรียบร้อยแช่ลงในสารละลายเอทานอล 95% ในภาชนะปิดและนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

$$\text{ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (G.S.I.)} = (\text{GW}/\text{BW}) \times 10^3$$

GW = น้ำหนักของรังไข่ (กรัม)

BW = น้ำหนักของปลาตัวที่มีรังไข่รวมอยู่ด้วย (กรัม)

3.2.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าอัตราส่วนต่างๆ เช่น ค่าอัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวลำตัวมาตรฐานเป็นต้น โดยการทดสอบความแตกต่างของพลาสติกจากทั้ง 7 แหล่ง โดยการทดสอบทางสถิติโดยวิธี One-Way ANOVA ด้วยโปรแกรม Microsoft office Excel 2007

3.2.3 การสกัดดีเอ็นเอของพลาสติก เพื่อใช้ในการจัดจำแนกทางอนุชีววิทยา

การสกัดดีเอ็นเอจากพลาสติก

นำตัวอย่างพลาสติกที่แช่ไว้ในเอทานอล 95% มาทำการตัดบริเวณครีบ เนื้อ และด้าม นำมาทำการบดด้วยโกร่งพร้อมทั้งเติมไนโตรเจนเหลวเพื่อช่วยในการบดตัวอย่าง นำผงของตัวอย่างพลาสติกที่ถูกบดละเอียดปริมาณ 250 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย lysis buffer ที่ผสม Proteinase K ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง เติมสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มปริมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ปิดเปิดส่วนใสด้านบนในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม absolute ethanol เย็นจัดปริมาณ 2 เท่าของปริมาตรสารละลายผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติมเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วตากตะกอนดีเอ็นเอทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เพื่อดูความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ แล้วเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ในหลอดหลอดเซนทริฟิวจ์ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction

3.2.4 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ยีนจากไมโทคอนเดรีย Cytochrome c oxidase subunit I โดยใช้ primer COIF/COIR ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

ทำการเตรียม reaction mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่นปริมาณ 39.7 ไมโครลิตร, 1X Buffer , 0.1 mM dNTPs, 0.2 μ M Forward primer คือ 5' CTA GTA TTT GGT GCT TGG 3' , 0.2 μ M Reverse primer คือ 5' AAG TAG GAC GGC TGT AAT 3' , 0.3 U/ μ l Taq DNA polymerase และดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดย นำไปเข้าเครื่อง พีซีอาร์ และตั้งโปรแกรมเครื่อง Thermal cycle โดยมีสภาวะดังตารางที่ 3.1 ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งหมด 35 รอบ จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบน อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำเจลที่ได้ไปย้อมสีเอทีเดียมโบรไมด์นาน 1 นาที แล้วล้างออกโดยการแช่ในน้ำอีก 20 นาที จากนั้นดูผลภายใต้แสงยูวี

ตารางที่ 3.1 คอนดิชันที่ใช้ในการทำงาน PCR จำนวน 35 รอบ

Condition	COIF/COIR องศาเซลเซียส (°C)	เวลา
Pre-denaturation	94°C	2 นาที
Denaturation	94 °C	30 วินาที
Annealing	45 °C	30 วินาที
Extention	72 °C	1 นาที
Final Extention	72 °C	3 นาที

3.2.5 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ยีนจากไมโทคอนเดรีย Cytochrome *b* โดยใช้ primer CytbF/CytbR ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

ทำการเตรียม reaction mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 39.7 ไมโครลิตร, 1X Buffer , 0.1 mM dNTPs, 0.2 µM Forward primer คือ 5' GTA GCC CAC ATC TGC CGA GAC 3' , 0.2 µM Reverse primer คือ 5' GGC GGA AAG TCA GAG TTC GTT 3' , 0.3 U/µl *Taq* DNA polymerase และดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดย นำไปเข้าเครื่องพีซีอาร์ และตั้งโปรแกรมเครื่อง Thermal cycle โดยมีสภาวะดังตารางที่ 3.2 ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งหมด 35 รอบ จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำเจลที่ได้ไปย้อมสีเอทیدیอัมโบรไมด์นาน 1 นาที แล้วล้างออกโดยการแช่น้ำอีก 20 นาที จากนั้นดูผลภายใต้แสงยูวี

ตารางที่ 3.2 คอนดิชันที่ใช้ในการทำงาน PCR จำนวน 35 รอบ

Condition	CytbF/CytbR องศาเซลเซียส (°C)	เวลา
Pre-denaturation	94°C	2 นาที
Denaturation	94 °C	30 วินาที
Annealing	58 °C	30 วินาที
Extention	72 °C	1 นาที
Final Extention	72 °C	3 นาที

3.2.6 ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยใช้ชุด Gel Extraction Kit จากประเทศ Netherland ปีเปตสารละลาย QG Buffer 800 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในหลอดที่ได้จากการตัดเจล บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนเจลละลาย แล้ว ปีเปตดีเอ็นเอในคอลัมน์ นำไปปั่นตกที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลาย QG Buffer 500 ไมโครลิตรลงปลายคอลัมน์ นำไปปั่นตกที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งไป เติมสารละลาย PE Buffer 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที เพื่อเป็นการตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นตกที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเททิ้ง ปั่นตกคอลัมน์อีกครั้ง ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ปีเปตสารละลาย EB Buffer ใส่ 20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอเป็นเวลา 5 นาที เปลี่ยนใส่ในไมโครทิวใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

3.2.7 หาลำดับนิวคลีโอไทด์

หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการส่ง sequencing โดยส่งไปที่บริษัท แปะซิฟิก ไชเอ็นซ์ จำกัด โดยใช้หลักการ Sanger DNA sequencing

3.2.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome b และ Cytochrome c oxidase subunit I

หลังจากที่ได้ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome c oxidase subunit I และ Cytochrome b ของตัวอย่าง นำไป Blast เพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ในเว็บ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> และนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาสลิคปลาสลิค *Trichogaster pectoralis* accession number AY763758 และปลาสลิค *Trichogaster pectoralis* accession number HQ682729 โดยใช้โปรแกรม clustalW ในเว็บ <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>

3.2.9 ทำการจัดกลุ่มด้วย Phylogenetic Tree Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5)

ทำ Alignment ด้วยโปรแกรม Bioedit ร่วมกับยีนจากปลาสลิคสายพันธุ์อ้างอิง คือ ปลาสลิค *Trichogaster pectoralis* accession number AY763758 (สำหรับยีน cytb) และ ปลาสลิค *Trichogaster pectoralis* accession number HQ682729 (สำหรับยีน COI) และยีนจากปลากระดี่สายพันธุ์ใกล้เคียง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลากระดี่หม้อ *Trichogaster trichopterus* accession number 758371569, ปลากระดี่นาง *Trichogaster microlepis* accession number

836614043, ปลากระดี่มุก *Trichogaster leerii* accession number 769829725 และใช้ Outgroup เป็นปลาตุ๊กตาด้าน *Clarias batrachus* accession number 687814729 โดยนำข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบในโปรแกรม Bioedit มาจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม MEGA 5 ซึ่งเป็นโปรแกรมวิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการระดับดีเอ็นเอและโปรตีน จากการสร้างแผนภาพอนุমানต้นไม้ โดยกำหนดค่า bootstap เท่ากับ 2,000



บทที่ 4

ผลการวิจัย

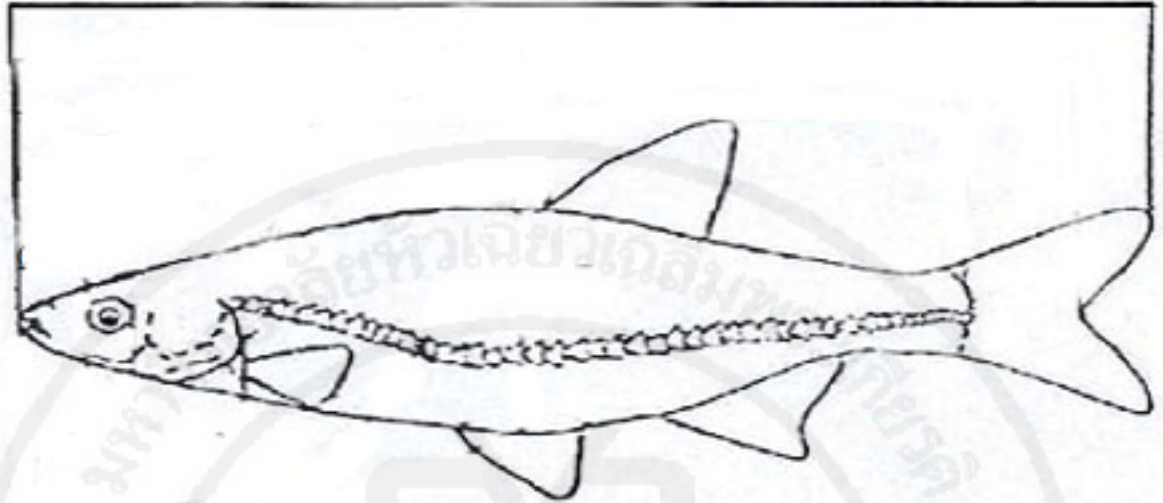
4.1 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของพลาสติกจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย

จากการเก็บตัวอย่างพลาสติกสดทั้งเพศผู้และเพศเมียอายุเฉลี่ย 8 เดือน จากบ่อเลี้ยงทั้งหมด 7 จังหวัด ได้แก่ สมุทรปราการ สมุทรสาคร ฉะเชิงเทรา อัญญา สระแก้ว เพชรบุรี และนครปฐม มาวัดขนาดความยาวหัว(HT) ความยาวเหยียด(TL) ความยาวมาตรฐาน(TT) ความยาวปาก(MT) ความกว้างตา(ET) ความยาวหลัง(PT) และความลึกลำตัว(DT) และชั่งน้ำหนัก(WT) เพื่อนำมาทดสอบหาความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาของพลาสติกใน 7 จังหวัด ด้วยวิธี One-Way ANOVA จากผลการศึกษาพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ภาคผนวกที่ 1 ซึ่งแสดงว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพลาสติกทั้ง 7 จังหวัดนั้นมีความแตกต่างกันในทุกค่าที่วัด

4.1.1 การกระจายความกว้างของความยาวเหยียดของพลาสติก

จากการศึกษาพลาสติกอายุ 8 เดือน จากบ่อปลาทั้ง 7 จังหวัด คือ สมุทรปราการ สมุทรสาคร ฉะเชิงเทรา อัญญา สระแก้ว เพชรบุรี และนครปฐม โดยวัดระยะความยาวตั้งแต่บริเวณปากจนถึงปลายหางปลาทุกตัวจากทุกจังหวัด ดังแสดงในภาพที่ 3.1 และนำมาหาค่ามาตรฐาน พบว่ามีความยาวเหยียดต่ำสุด ความยาวเหยียดสูงสุด และมีค่ากลางของความยาวดังตารางที่ 1 โดยจากผลการศึกษาจะพบว่าพลาสติกจากจังหวัดสมุทรสาครมีค่ากลางของความยาวเหยียดที่สูงที่สุด คือ 152.57 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับอีก 6 จังหวัด ซึ่งรวมไปถึงค่าความยาวเหยียดสูงที่สุด คือ 191.46 มิลลิเมตร รองลงมาคือ พลาสติกจากจังหวัดนครปฐม สมุทรปราการ เพชรบุรี สระแก้ว และอัญญา ตามลำดับ ส่วนค่ากลางของความยาวเหยียดต่ำสุดพบในพลาสติกจากจังหวัดฉะเชิงเทรา คือ 138.90 มิลลิเมตร และมีค่าความยาวเหยียดต่ำที่สุดอยู่ที่ 115.51 มิลลิเมตร

ความยาวเหยียด (TL)



ภาพที่ 3.1 การวัดระยะความยาวเหยียดของตัวปลา

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก <http://www.fishbase.org/identification/Morphometrics/centimeters/Index.php>

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบความยาวเหยียด (total length, TL) จากทั้งหมด 7 จังหวัด

สถานที่	ความยาวเหยียดต่ำที่สุด (มม.)	ความยาวเหยียด สูงสุด (มม.)	มัธยฐาน (มม.)
สมุทรปราการ	119.69	170.24	149.62
สมุทรสาคร	128.75	191.46	152.57
ฉะเชิงเทรา	115.51	173.73	138.90
อยุธยา	116.05	181.39	144.41
สระแก้ว	123.92	172.20	144.62
เพชรบุรี	124.70	174.72	147.98
นครปฐม	123.75	176.95	149.70

4.1.2 ค่าดัชนีสมบรูณ์เพศของพลาสติก

จากการศึกษาพบว่าเมื่อพลาสติกมีความยาวเพิ่มมากขึ้น ก็จะมีน้ำหนักของรังไข่เพิ่มมากขึ้นด้วย โดยพลาสติกจากจังหวัดสมุทรปราการมีค่าดัชนีสมบรูณ์เพศระหว่าง 3.79-22.29% จังหวัดสมุทรสาคร มีค่า 5.83-22.73% จังหวัดฉะเชิงเทรามีค่า 1.45-33.43% จังหวัดอยุธยา มีค่า 0.29-1.89% จังหวัดสระแก้ว มีค่า 1.29-11.28% จังหวัดเพชรบุรีมีค่า 0.45-14.93% และจังหวัดนครปฐม มีค่า 1.60-17.10% ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยจะเห็นได้ว่าพลาสติกจากจังหวัดฉะเชิงเทรามีค่ากลางดัชนีสมบรูณ์เพศสูงสุด คือ 13.68% รองลงมาคือ สมุทรสาคร สมุทรปราการ นครปฐม เพชรบุรี สระแก้ว ได้แก่ 12.37%, 10.35%, 8.37%, 8.31% และ 5.35% ตามลำดับ ส่วนจังหวัดที่มีค่าดัชนีสมบรูณ์เพศต่ำที่สุด ได้แก่ จังหวัดอยุธยา โดยมีค่ากลางของดัชนีสมบรูณ์เพศต่ำที่สุด คือ 0.67% นอกจากนี้จากข้อมูลที่ได้จากการวัดขนาดของตัวอย่างพลาสติกจากจังหวัดฉะเชิงเทรานั้น จะมีขนาดที่เล็กที่สุดที่มีไข่ระยะสมบรูณ์เพศ คือ มีขนาด 122.94 มิลลิเมตร เท่านั้น ในขณะที่พลาสติกจากจังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสาคร อยุธยา สระแก้ว เพชรบุรี และนครปฐม จะมีขนาดความยาว 131.38 มิลลิเมตร, 136.35 มิลลิเมตร, 141.84 มิลลิเมตร, 134.50 มิลลิเมตร, 143.87 มิลลิเมตร และ 134.47 มิลลิเมตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าพลาสติกจากจังหวัดฉะเชิงเทรามีค่ากลางของดัชนีสมบรูณ์เพศมากที่สุด และสามารถเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์เร็วที่สุด นั่นคือ มีขนาดเพียง 122.94 มิลลิเมตร เท่านั้นก็สามารถให้ไข่ได้แล้ว ในขณะที่จังหวัดอยุธยามีค่าเฉลี่ยดัชนีสมบรูณ์เพศน้อยที่สุด คือ 0.67% และต้องมีขนาดถึง 141.84 มิลลิเมตร จึงจะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากลักษณะทางนิเวศวิทยา และอาหารที่พลาสติกได้รับในแต่ละแหล่งนั่นเอง

ตารางที่ 4.2 ค่าดัชนีสมบรูณ์เพศของปลาสดเพศเมีย (อายุ 8 เดือน)

สถานที่	ค่าดัชนีสมบรูณ์เพศ ต่ำสุด	ค่าดัชนีสมบรูณ์เพศ สูงสุด	ค่ามัธยฐานของ ดัชนีสมบรูณ์ เพศ	ขนาดที่เล็ก ที่สุดที่มีไข่ ระยะสมบรูณ์ เพศ (มม.)
สมุทรปราการ	3.79%	25.29%	10.35%	131.38
สมุทรสาคร	5.83%	22.73%	12.74%	136.35
ฉะเชิงเทรา	1.45%	33.43%	13.68%	122.94
อยุธยา	0.29%	1.89%	0.67%	141.84
สระแก้ว	1.29%	11.28%	5.35%	134.50
เพชรบุรี	0.45%	14.93%	8.31%	143.87
นครปฐม	1.60%	17.10%	8.37%	134.47

4.1.3 ความแปรผันของลักษณะสัณฐานภายนอกของปลาสด

ความแปรผันของลักษณะสัณฐานภายนอกของปลาสดทั้ง 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดอยุธยา จังหวัดสระแก้ว จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม มีการแปรผัน 3 ลักษณะ ได้แก่ 1) ลายแถบดำคล้ายลายเสือ 2) ลายแถบดำ 1 แถบกลางตัว และ 3) ไม่มีแถบดำ ตัวมีสีขาวนวล ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ความแปรผันทางสัณฐานภายนอกของปลาสด
สำหรับความแปรผันของปลาสดในแต่ละจังหวัดมีดังนี้

พลาสติกของจังหวัดสมุทรปราการ มี 3 แบบ ได้แก่ 1) ลายแถบดำคล้ายลายเสือ 2) ลายแถบดำ 1 แถบกลางตัว และ 3) ไม่มีแถบดำ ตัวมีสีขาวนวล ตัวอย่างพลาสติกจากสมุทรปราการ ดังภาพที่ 4.2ก

พลาสติกของจังหวัดสมุทรสาคร มี 3 แบบ ได้แก่ 1) ลายแถบดำคล้ายลายเสือ 2) ลายแถบดำ 1 แถบกลางตัว และ 3) ไม่มีแถบดำ ตัวมีสีขาวนวล ตัวอย่างพลาสติกจากสมุทรสาคร ดังภาพที่ 4.2ข

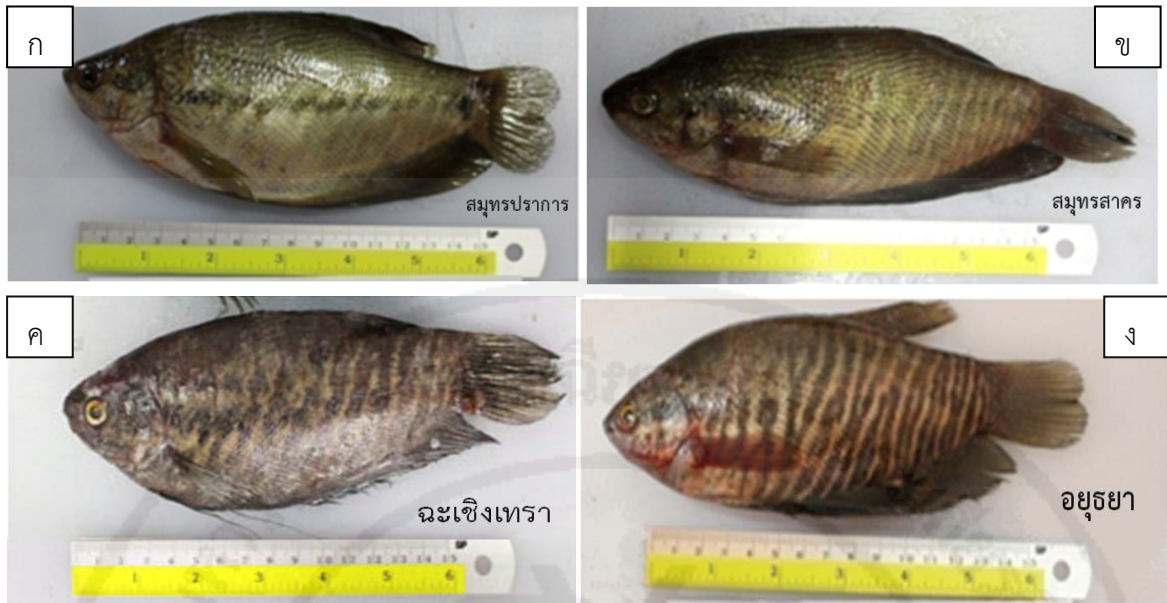
พลาสติกของจังหวัดฉะเชิงเทรา มี 1 แบบ ได้แก่ ลายแถบดำคล้ายลายเสือ ตัวอย่างพลาสติกจากฉะเชิงเทราดังภาพที่ 4.2ค

พลาสติกของอยุธยา มี 1 แบบ ได้แก่ ลายแถบดำคล้ายลายเสือ ตัวอย่างพลาสติกจากอยุธยา ดังภาพที่ 4.2ง

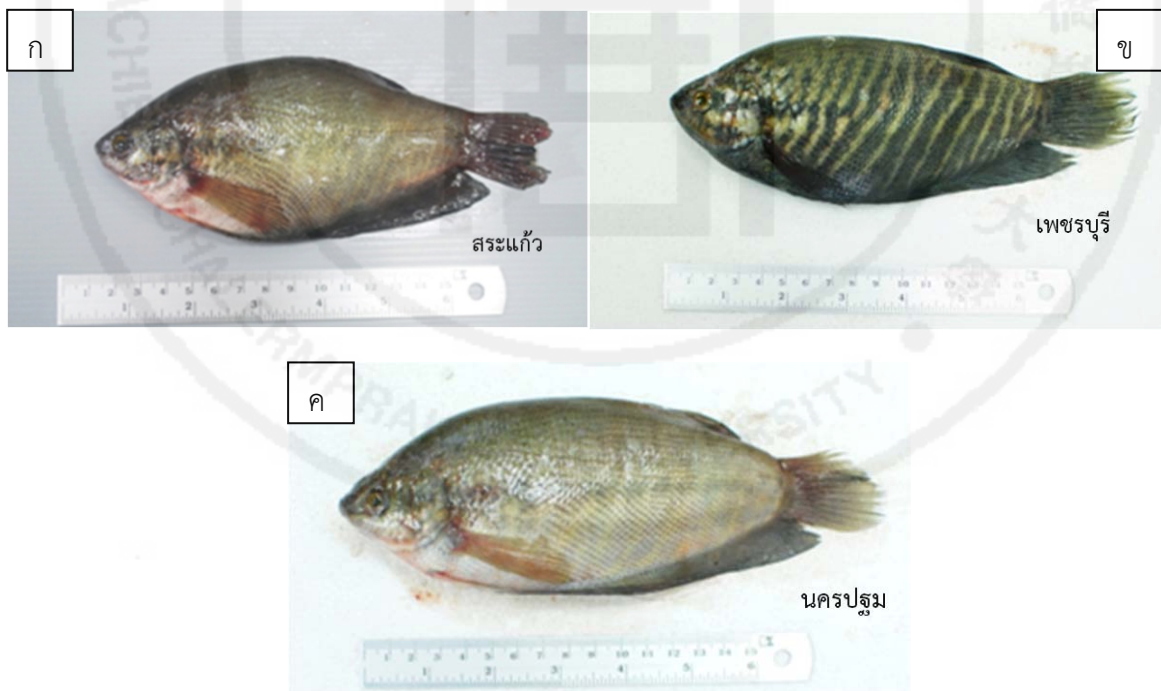
พลาสติกของสระแก้ว มี 3 แบบ ได้แก่ ลายแถบดำคล้ายลายเสือ ลายแถบดำ 1 แถบกลางตัว และไม่มีแถบดำ ตัวมีสีขาวนวล ตัวอย่างพลาสติกจากสระแก้ว ดังภาพที่ 4.3ก

พลาสติกของเพชรบุรี มี 3 ลายแถบดำคล้ายลายเสือ ลายแถบดำ 1 แถบกลางตัว และไม่มีแถบดำ ตัวมีสีขาวนวล ตัวอย่างพลาสติกจากเพชรบุรี ดังภาพที่ 4.3ข

พลาสติกของนครปฐม มี 3 แบบ ได้แก่ ลายแถบดำคล้ายลายเสือ ลายแถบดำ 1 แถบกลางตัว และไม่มีแถบดำ ตัวมีสีขาวนวล ตัวอย่างพลาสติกจากนครปฐม ดังภาพที่ 4.3ค



ภาพที่ 4.2 ปลาสดจากจังหวัดต่าง ๆ ก) สมุทรปราการ ข) สมุทรสาคร ค) ฉะเชิงเทรา และ ง) อัญชยา



ภาพที่ 4.3 ปลาสดจากจังหวัดต่าง ๆ ก) สระแก้ว ข) เพชรบุรี และ ค) นครปฐม

หมายเหตุ ปลาที่นำมาเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาร่วมกัน จะต้องมียุจากบ่อปลาเท่ากัน จึงจะเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ได้ ในที่นี้คือ อายุ 8 เดือน

4.1.4 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา

การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาโดยใช้หลักการของระบบเครือข่ายโครงยึด สำหรับการทดสอบความแตกต่างจากการวัดจุด 8 จุด ของปลาสลิดใน 7 จังหวัด ดังภาพที่ 3.2 ปรับใช้ตามวิธีของ อนันต์ เคนท้าว และพรพิมล เจียรนัยปริเปรม (2553) และทำการเปรียบเทียบด้วยวิธี One-Way ANOVA ผลการศึกษาพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ภาคผนวกที่ ข โดยในค่า H คือ ระยะตั้งแต่ปากถึงโคนหาง พบว่าปลาสลิดในแต่ละจังหวัดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยสามารถจัดกลุ่มปลาสลิดที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ จังหวัด สระแก้ว เพชรบุรี และนครปฐม กลุ่มที่ 2 ได้แก่จังหวัด สมุทรปราการ และสมุทรสาคร กลุ่มที่ 3 ได้แก่ จังหวัดอยุธยา และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับค่า A (ระยะจากปากถึงตา) ซึ่งจัดกลุ่มปลาสลิดที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันได้ 4 กลุ่มเช่นเดียวกัน ส่วนค่า B (ระยะจากตาถึงช่องเหงือก) พบว่าสามารถจัดกลุ่มปลาสลิดที่มีความคล้ายคลึงกันได้ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ จังหวัด เพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม กลุ่มที่ 2 ได้แก่ จังหวัดสระแก้ว และสมุทรสาคร กลุ่มที่ 3 ได้แก่ จังหวัดอยุธยา และฉะเชิงเทรา ส่วนกลุ่มที่ 4 ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ ค่า C (ระยะจากปากถึงขอบเหงือกบน) พบว่าสามารถจัดกลุ่มปลาสลิดที่มีความคล้ายคลึงกันได้ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่จังหวัด สระแก้ว อยุธยา นครปฐม กลุ่มที่ 2 ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสาคร ฉะเชิงเทรา กลุ่มที่สาม ได้แก่จังหวัด เพชรบุรี ส่วนค่า D (ระยะจากปากถึงขอบเหงือกล่าง) พบว่าสามารถจัดกลุ่มปลาสลิดที่มีความคล้ายคลึงกันได้ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่จังหวัด สระแก้ว และเพชรบุรี กลุ่มที่ 2 ได้แก่จังหวัด สมุทรสาคร อยุธยา และนครปฐม และกลุ่ม 3 ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ และฉะเชิงเทรา ค่า E (ระยะจากขอบเหงือกล่างถึงโคนหาง) พบว่าสามารถจัดกลุ่มปลาสลิดที่มีความคล้ายคลึงกันได้ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่จังหวัด สระแก้ว สมุทรปราการ และอยุธยา กลุ่มที่ 2 ได้แก่ จังหวัดสมุทรสาคร เพชรบุรี และนครปฐม กลุ่มที่ 3 ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ค่า F (ระยะจากขอบเหงือกบนถึงโคนหาง) พบว่าสามารถจัดกลุ่มปลาสลิดที่มีความคล้ายคลึงกันได้ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ จังหวัดสระแก้ว อยุธยา เพชรบุรี และนครปฐม กลุ่มที่ 2 ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ และสมุทรสาคร กลุ่ม 3 ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา และค่า G (ระยะจากเหงือกถึงโคนหาง) พบว่าสามารถจัดกลุ่มปลาสลิดที่มีความคล้ายคลึงกันได้ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ จังหวัดอยุธยา สระแก้ว ฉะเชิงเทรา กลุ่มที่ 2 ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสาคร และเพชรบุรี และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ จังหวัดนครปฐม ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าสัมฐานวิทยาของพลาสติกประเทศไทย

ค่าสัมฐานวิทยาของปลา	กลุ่มพลาสติก
H, A	กลุ่มที่ 1 คือ จังหวัดสระแก้ว เพชรบุรี และนครปฐม กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สมุทรปราการ และสมุทรสาคร กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ออยุธยา และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ ฉะเชิงเทรา
B	กลุ่มที่ 1 ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สระแก้ว และสมุทรสาคร กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ออยุธยา และฉะเชิงเทรา ส่วนกลุ่มที่ 4 ได้แก่ สมุทรปราการ
C	กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สระแก้ว ออยุธยา นครปฐม กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สมุทรปราการ สมุทรสาคร ฉะเชิงเทรา กลุ่มที่ 3 ได้แก่ เพชรบุรี
D	กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สระแก้ว และเพชรบุรี กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สมุทรสาคร ออยุธยา และนครปฐม และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ สมุทรปราการ และฉะเชิงเทรา
E	กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สระแก้ว สมุทรปราการ และออยุธยา กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สมุทรสาคร เพชรบุรี และนครปฐม กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ฉะเชิงเทรา
F	กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สระแก้ว ออยุธยา เพชรบุรี และนครปฐม กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สมุทรปราการ และสมุทรสาคร กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ฉะเชิงเทรา
G	กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ออยุธยา สระแก้ว ฉะเชิงเทรา กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สมุทรปราการ สมุทรสาคร และเพชรบุรี และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ นครปฐม

เมื่อหาอัตราส่วนของระยะจากตาถึงช่องเห็อก (B) ต่อระยะตั้งแต่ปากถึงโคนหาง (H) ค่าดังตารางที่ 4.4 พบว่าพลาสติกจากจังหวัดนครปฐมมีอัตราส่วนระยะจากตาถึงช่องเห็อก (B) ต่อระยะตั้งแต่ปากถึงโคนหาง (H) สูงที่สุด คือ 0.27 พลาสติกจากจังหวัดสมุทรปราการมีอัตราส่วนระยะจากตาถึงช่องเห็อก (B) ต่อระยะตั้งแต่ปากถึงโคนหาง (H) ต่ำที่สุด คือ 0.19 และพลาสติกจากจังหวัดสระแก้วและออยุธยามีค่าเท่ากันที่ 0.21

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าอัตราส่วนของระยะจากตาถึงช่องเหงือก (B) ต่อระยะตั้งแต่ปากถึงโคนหาง (H)

สถานที่	อัตราส่วน B/H
สระแก้ว	0.21
สมุทรปราการ	0.19
อยุธยา	0.21
ฉะเชิงเทรา	0.24
สมุทรสาคร	0.25
เพชรบุรี	0.23
นครปฐม	0.27

ด้วยเทคนิคการจัดจำแนกกลุ่ม สามารถแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานของกลุ่มประชากรที่มาจากแหล่งอาศัยที่แตกต่างกัน และสามารถจำแนกกลุ่มประชากรดังกล่าวออกจากกันได้ อย่างไรก็ตามแม้ว่าผลการทดสอบทางด้านสัณฐานวิทยาจะบ่งชี้ว่าปลาแต่ละจังหวัดต่างมีลักษณะทางสัณฐานที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว แต่เนื่องจากปลาในการทดลองนี้เกิดมาจากการเพาะเลี้ยง ซึ่งไม่อาจทราบได้ว่าผู้เลี้ยงได้มีการนำปลาจากที่ใดบ้างมาใช้เพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์ ดังนั้นข้อมูลทางสัณฐานวิทยาอาจจะไม่เพียงพอ จำเป็นที่จะต้องใช้อ้อมลูทางด้านชีวโมเลกุลในการตรวจสอบด้วยอีกวิธีหนึ่ง

4.2. ผลการศึกษาทางอนุชีววิทยาของปลาสลิติจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย

4.2.1 การศึกษายีน Cytochrome oxidase subunit I (COI)

ผลจากการสุ่มตัวอย่างปลาสลิติจาก 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ(SP) สมุทรสาคร(SS) อยุธยา(AY) ฉะเชิงเทรา(CH) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และ นครปฐม(NP) มาทำ polymerase chain reaction (PCR) ของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ของปลาสลิติ โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ของปลาสลิติ *Trichogaster pectoralis* accession number HQ682729 โดยขนาดของ PCR product มีขนาด 528 bp และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ของปลาสลิติจากจังหวัดสมุทรปราการ(SP) สมุทรสาคร(SS) อยุธยา(AY) ฉะเชิงเทรา(CH) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และนครปฐม(NP) ดังภาพที่ 4.4 จากภาพพบว่าสามารถแบ่งปลาออกเป็น 2 ใหญ่ คือกลุ่มที่ 1 เป็นปลาสลิติแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสมุทรปราการ(SP) สมุทรสาคร(SS) ฉะเชิงเทรา(CH) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และนครปฐม(NP) กลุ่มที่ 2 เป็นปลาสลิติลายแถบดำ 1 แถบกลางตัวจากจังหวัดสระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และนครปฐม(NP) ปลา

สไลด์ที่ไม่มีแถบดำตัวสีขาวนวนลจากสระแก้ว(SK) ปลาสไลด์ลายแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดอยุธยา และปลาสไลด์สายพันธุ์อ้างอิง *Trichogaster pectoralis* accession number HQ682729

```

SSDVTF      TTAGTT-GCTTATCCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGAGCTCTTCTCGGA 49
CHF          TTAGTT-GCTTATCCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGAGCTCTTCTCGGA 49
PTTT2F      TTAGTT-GCTTATCCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGAGCTCTTCTCGGA 49
SPVF        TTAGTT-GCTTATCCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGAGCTCTTCTCGGA 49
NPPT2F      TTAGTTTGCCTTATCCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGAGCTCTTCTCGGA 50
SKTT3F      TTAGTTTGCCTTATCCGAGCAGA-TTAAGTCAACCAGGAGCTCTTCTCGGA 49
HQ682729_T.pectolaris  TAAGTTTGCCTTATCCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGAGCTCTTCTCGGA 50
SKWF        GTAGTTTGCCTTATCCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGAGCTCTTCTCGGA 50
AY2F        CTAGTT-GCTTATCCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGAGCTCTTCTCGGA 49
NPWD1F      TTAGTT-GCTTATCCGAGCATA-TTAAGTCAACCAGGAGCTCTTCTCGGA 48
PTWD4F      TTAGTTCGCTTATCCGAGCATA-TTAAGTCAACCAGGAGCTCTTCTCGGA 49
SKD2F       ATAGTTTGCCTTATCCGAGCAGA-TTAGTCAACCAGGAGCTCTTCTCGGA 49
AY1F        TTAGTTTGCCTTATCCGAGCATA-TTAGTCAACCAGGAGCTCTTCTCGGA 49
          **** *

```

```

SSDVTF      GACGACCAAAATTTATAATGTTATGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAAT 99
CHF          GACGACCAAAATTTATAATGTTATGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAAT 99
PTTT2F      GACGACCAAAATTTATAATGTTATGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAAT 99
SPVF        GACGACCAAAATTTATAATGTTATGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAAT 99
NPPT2F      GACGACCAAAATTTATAATGTTATGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAAT 100
SKTT3F      GACGACCAAAATTTATAATGTTATGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAAT 99
HQ682729_T.pectolaris  GACGACCAAAATTTATAATGTTATGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAAT 100
SKWF        GACGACCAAAATTTATAATGTTATGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAAT 100
AY2F        GACGACCAAAATTTATAATGTTATGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAAT 99
NPWD1F      GACGACCAAAATTTATAATGTTATGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAAT 98
PTWD4F      GACGACCAAAATTTATAATGTTATGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAAT 99
SKD2F       GACGACCAAAATTTATAATGTTATGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAAT 99
AY1F        GACGACCAAAATTTATAATGTTATGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAAT 99
          *****

```

```

SSDVTF      TTTCTTTATAGTAATACCAATCATAAATGGAGGTTTGGGAAC TGACTTG 149
CHF          TTTCTTTATAGTAATACCAATCATAAATGGAGGTTTGGGAAC TGACTTG 149
PTTT2F      TTTCTTTATAGTAATACCAATCATAAATGGAGGTTTGGGAAC TGACTTG 149
SPVF        TTTCTTTATAGTAATACCAATCATAAATGGAGGTTTGGGAAC TGACTTG 149
NPPT2F      TTTCTTTATAGTAATACCAATCATAAATGGAGGTTTGGGAAC TGACTTG 150
SKTT3F      TTTCTTTATAGTAATACCAATCATAAATGGAGGTTTGGGAAC TGACTTG 149
HQ682729_T.pectolaris  TTTCTTTATAGTAATACCAATCATAAATGGAGGTTTGGGAAC TGACTTG 150
SKWF        TTTCTTTATAGTAATACCAATCATAAATGGAGGTTTGGGAAC TGACTTG 150
AY2F        TTTCTTTATAGTAATACCAATCATAAATGGAGGTTTGGGAAC TGACTTG 149
NPWD1F      TTTCTTTATAGTAATACCAATCATAAATGGAGGTTTGGGAAC TGACTTG 148
PTWD4F      TTTCTTTATAGTAATACCAATCATAAATGGAGGTTTGGGAAC TGACTTG 149
SKD2F       TTTCTTTATAGTAATACCAATCATAAATGGAGGTTTGGGAAC TGACTTG 149
AY1F        TTTCTTTATAGTAATACCAATCATAAATGGAGGTTTGGGAAC TGACTTG 149
          *** *

```

```

SSDVTF      TACCTTTAATGATCGGTGCCCCAGACATAGCATTTCCCGAATAAACAAT 199
CHF          TACCTTTAATGATCGGTGCCCCAGACATAGCATTTCCCGAATAAACAAT 199
PTTT2F      TACCTTTAATGATCGGTGCCCCAGACATAGCATTTCCCGAATAAACAAT 199
SPVF        TACCTTTAATGATCGGTGCCCCAGACATAGCATTTCCCGAATAAACAAT 199
NPPT2F      TACCTTTAATGATCGGTGCCCCAGACATAGCATTTCCCGAATAAACAAT 200
SKTT3F      TACCTTTAATGATCGGTGCCCCAGACATAGCATTTCCCGAATAAACAAT 199
HQ682729_T.pectolaris  TACCTTTAATGATCGGTGCCCCAGACATAGCATTTCCCGAATAAACAAT 200
SKWF        TACCTTTAATGATCGGTGCCCCAGACATAGCATTTCCCGAATAAACAAT 200
AY2F        TACCTTTAATGATCGGTGCCCCAGACATAGCATTTCCCGAATAAACAAT 199
NPWD1F      TACCTTTAATGATCGGTGCCCCAGACATAGCATTTCCCGAATAAACAAT 198
PTWD4F      TACCTTTAATGATCGGTGCCCCAGACATAGCATTTCCCGAATAAACAAT 199
SKD2F       TACCTTTAATGATCGGTGCCCCAGACATAGCATTTCCCGAATAAACAAT 199
AY1F        TACCTTTAATGATCGGTGCCCCAGACATAGCATTTCCCGAATAAACAAT 199
          *****

```

```
SSDVTF      ATAAGCTTTTGACTTCTACCTCCATCCCTTCCTGCTTCTTCTTGCTTCCTC 249
CHF         ATAAGCTTTTGACTTCTACCTCCATCCCTTCCTGCTTCTTCTTGCTTCCTC 249
PTTT2F     ATAAGCTTTTGACTTCTACCTCCATCCCTTCCTGCTTCTTCTTGCTTCCTC 249
SPVF       ATAAGCTTTTGACTTCTACCTCCATCCCTTCCTGCTTCTTCTTGCTTCCTC 249
NPPT2F     ATAAGCTTTTGACTTCTACCTCCATCCCTTCCTGCTTCTTCTTGCTTCCTC 250
SKTT3F     ATAAGCTTTTGACTTCTACCTCCATCCCTTCCTGCTTCTTCTTGCTTCCTC 249
HQ682729_T.pectolaris ATAAGCTTTTGACTTCTACCTCCATCCCTTCCTGCTTCTTCTTGCTTCCTC 250
SKWF       ATAAGCTTTTGACTTCTACCTCCATCCCTTCCTGCTTCTTCTTGCTTCCTC 250
AY2F       ATAAGCTTTTGACTTCTACCTCCATCCCTTCCTGCTTCTTCTTGCTTCCTC 249
NPWD1F     ATAAGCTTTTGACTTCTACCTCCATCCCTTCCTGCTTCTTCTTGCTTCCTC 248
PTWD4F     ATAAGCTTTTGACTTCTACCTCCATCCCTTCCTGCTTCTTCTTGCTTCCTC 249
SKD2F      ATAAGCTTTTGACTTCTACCTCCATCCCTTCCTGCTTCTTCTTGCTTCCTC 249
AY1F       ATAAGCTTTTGACTTCTACCTCCATCCCTTCCTGCTTCTTCTTGCTTCCTC 249
*****

SSDVTF      TGGAGTAGAGGCGGGGGCTGGTACTGGTTGGACAGTGTACCCCCCTTTAG 299
CHF         TGGAGTAGAGGCGGGGGCTGGTACTGGTTGGACAGTGTACCCCCCTTTAG 299
PTTT2F     TGGAGTAGAGGCGGGGGCTGGTACTGGTTGGACAGTGTACCCCCCTTTAG 299
SPVF       TGGAGTAGAGGCGGGGGCTGGTACTGGTTGGACAGTGTACCCCCCTTTAG 299
NPPT2F     TGGAGTAGAGGCGGGGGCTGGTACTGGTTGGACAGTGTACCCCCCTTTAG 300
SKTT3F     TGGAGTAGAGGCGGGGGCTGGTACTGGTTGGACAGTGTACCCCCCTTTAG 299
HQ682729_T.pectolaris TGGAGTAGAGGCGGGGGCTGGTACTGGTTGGACAGTGTACCCCCCTTTAG 300
SKWF       TGGAGTAGAGGCGGGGGCTGGTACTGGTTGGACAGTGTACCCCCCTTTAG 300
AY2F       TGGAGTAGAGGCGGGGGCTGGTACTGGTTGGACAGTGTACCCCCCTTTAG 299
NPWD1F     TGGAGTAGAGGCGGGGGCTGGTACTGGTTGGACAGTGTACCCCCCTTTAG 298
PTWD4F     TGGAGTAGAGGCGGGGGCTGGTACTGGTTGGACAGTGTACCCCCCTTTAG 299
SKD2F      TGGAGTAGAGGCGGGGGCTGGTACTGGTTGGACAGTGTACCCCCCTTTAG 299
AY1F       TGGAGTAGAGGCGGGGGCTGGTACTGGTTGGACAGTGTACCCCCCTTTAG 299
*****

SSDVTF      CTAGCAACCTAGCTCACGCAGGGGCTTCCGTTGACTTAACCATCTTTTCT 349
CHF         CTAGCAACCTAGCTCACGCAGGGGCTTCCGTTGACTTAACCATCTTTTCT 349
PTTT2F     CTAGCAACCTAGCTCACGCAGGAGCTTCCGTTGACTTAACCATCTTTTCT 349
SPVF       CTAGCAACCTAGCTCACGCAGGAGCTTCCGTTGACTTAACCATCTTTTCT 349
NPPT2F     CTAGCAACCTAGCTCACGCAGGAGCTTCCGTTGACTTAACCATCTTTTCT 350
SKTT3F     CTAGCAACCTAGCTCACGCAGGGGCTTCCGTTGACTTAACCATCTTTTCT 349
HQ682729_T.pectolaris CTAGCAACCTAGCTCACGCAGGGGCTTCCGTTGACTTAACCATCTTCTCT 350
SKWF       CTAGCAACCTAGCTCACGCAGGGGCTTCCGTTGACTTAACCATCTTCTCT 350
AY2F       CTAGCAACCTAGCTCACGCAGGGGCTTCCGTTGACTTAACCATCTTCTCT 349
NPWD1F     CTAGCAACCTAGCTCACGCAGGGGCTTCCGTTGACTTAACCATCTTCTCT 348
PTWD4F     CTAGCAACCTAGCTCACGCAGGGGCTTCCGTTGACTTAACCATCTTCTCT 349
SKD2F      CTAGCAACCTAGCTCACGCAGGGGCTTCCGTTGACTTAACCATCTTCTCT 349
AY1F       CTAGCAACCTAGCTCACGCAGGGGCTTCCGTTGACTTAACCATCTTCTCT 349
*****

SSDVTF      CTCCATCTAGCTGGTGTTCCTCAATTCAGGTGCAATTAATTTTATTAC 399
CHF         CTCCATCTAGCTGGTGTTCCTCAATTCAGGTGCAATTAATTTTATTAC 399
PTTT2F     CTCCATCTAGCTGGTGTTCCTCAATTCAGGTGCAATTAATTTTATTAC 399
SPVF       CTCCATCTAGCTGGTGTTCCTCAATTCAGGTGCAATTAATTTTATTAC 399
NPPT2F     CTCCATCTAGCTGGTGTTCCTCAATTCAGGTGCAATTAATTTTATTAC 400
SKTT3F     CTCCATCTAGCTGGTGTTCCTCAATTCAGGTGCAATTAATTTTATTAC 399
HQ682729_T.pectolaris CTCCATCTAGCTGGTGTTCCTCAATTCAGGTGCAATTAATTTTATTAC 400
SKWF       CTCCATCTAGCTGGTGTTCCTCAATTCAGGTGCAATTAATTTTATTAC 400
AY2F       CTCCATCTAGCTGGTGTTCCTCAATTCAGGTGCAATTAATTTTATTAC 399
NPWD1F     CTCCATCTAGCTGGTGTTCCTCAATTCAGGTGCAATTAATTTTATTAC 398
PTWD4F     CTCCATCTAGCTGGTGTTCCTCAATTCAGGTGCAATTAATTTTATTAC 399
SKD2F      CTCCATCTAGCTGGTGTTCCTCAATTCAGGTGCAATTAATTTTATTAC 399
AY1F       CTCCATCTAGCTGGTGTTCCTCAATTCAGGTGCAATTAATTTTATTAC 399
** *****
```


SSDVTF	TACAATTATCAACATGAAACCCCTGCAATTTCTCAATATCAAA	443
CHF	TACAATTATCAACATGAAACCCCTGCAATTTCTCAATATCAAA	443
PTTT2F	TACAATTATCAACATGAAACCCCTGCAATTTCTCAATATCAAA	443
SPVF	TACAATTATCAACATGAAACCCCTGCAATTTCTCAATATCAAA	443
NPPT2F	TACAATTATCAACATGAAACCCCTGCAATTTCTCAATATCAAA	444
SKTT3F	TACAATTATCAACATGAAACCCCTGCAATTTCTCAATATCAAA	443
HQ682729_T.pectolaris	TACAATTATCAACATGAAACCCCTGCAATTTCTCAATATCAAA	444
SKWF	TACAATTATCAACATGAAACCCCTGCAATTTCTCAATATCAAA	444
AY2F	TACAATTATCAACATGAAACCCCTGCAATTTCTCAATATCAAA	443
NPWD1F	TACAATTATCAACATGAAACCCCTGCAATTTCTCAATATCAAA	442
PTWD4F	TACAATTATCAACATGAAACCCCTGCAATTTCTCAATATCAAA	443
SKD2F	TACAATTATCAACATGAAACCCCTGCAATTTCTCAATATCAAA	443
AY1F	TACAATTATCAACATGAAACCCCTGCAATTTCTCAATATCAAA	443

ภาพที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ของปลาสดจาก จังหวัดสมุทรปราการ(SP) สมุทรสาคร(SS) ฉะเชิงเทรา(CH) ออยุธยา(AY) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และ นครปฐม(NP) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ของ Cytochrome oxidase subunit I (COI) ของปลาสด *Trichogaster pectoralis* accession number HQ682729

4.2.2 การศึกษายีน Cytochrome b (Cytb)

ผลจากการสุ่มตัวอย่างปลาสดจาก 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ(SP) สมุทรสาคร(SS) ออยุธยา(AY) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และ นครปฐม(NP) มาทำการสกัดดีเอ็นเอ และนำมาทำ Polymerase chain reaction (PCR) ของยีน Cytochrome b (Cytb) โดยให้ขนาดของ PCR product มีขนาดเท่ากับ 750 bp และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome b (Cytb) ของปลาสดจากจังหวัด จังหวัดสมุทรปราการ(SP) สมุทรสาคร(SS) ออยุธยา(AY) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และ นครปฐม(NP) มาเปรียบเทียบกับยีน Cytochrome b (Cytb) ของ *Trichogaster pectoralis* accession number AY763758 ดังภาพที่ 4.5 จากภาพสามารถแบ่งกลุ่มปลาสดได้เป็น 2 กลุ่ม ใหญ่ๆ โดย กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ปลาสดจากอยุธยา(AY) และปลาสด *Trichogaster pectoralis* accession number AY763758 จะมีความใกล้เคียงกัน ส่วนกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ปลาสดจากสมุทรปราการ(SP) สมุทรสาคร(SS) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และนครปฐม(NP) จะมีความใกล้เคียงกัน

PTWD1F GGAGCATCCTTCTCTTTATCTGCATCTACCTTCACATCGGACGTGGCCTTTATTATGGC 60
 SST8F GGAGCATCCTTCTCTTTATCTGCATCTACCTTCACATCGGACGTGGCCTTTATTATGGC 60
 SST5F GGAGCATCCTTCTCTTTATCTGCATCTACCTTCACATCGGACGTGGCCTTTATTATGGC 60
 SKTF GGAGCATCCTTCTCTTTATCTGCATCTACCTTCACATCGGACGTGGCCTTTATTATGGC 60
 NP1F1F GGAGCATCCTTCTCTTTATCTGCATCTACCTTCACATCGGACGTGGCCTTTATTATGGC 60
 PTT2F GGAGCATCCTTCTCTTTATCTGCATCTACCTTCACATCGGACGTGGCCTTTATTATGGC 60
 SSDVT10F GGAGCATCCTTCTCTTTATCTGCATCTACCTTCACATCGGACGTGGCCTTTATTATGGC 60
 SSDVT15F GGAGCATCCTTCTCTTTATCTGCATCTACCTTCACATCGGACGTGGCCTTTATTATGGC 60
 SPV1F GGAGCATCCTTCTCTTTATCTGCATCTACCTTCACATCGGACGTGGCCTTTATTATGGC 60
 NPWD1F GGAGCATCCTTCTCTTTATCTGCATCTACCTTCACATCGGACGTGGCCTTTATTATGGC 60
 AY2F GGAGCATCCTTCTCTTTATCTGCATCTACCTTCACATCGGACGTGGCCTTTATTATGGC 60
 AY763758T.pectolaris GGAGCATCCTTCTCTTTATCTGCATCTACCTTCACATCGGACGTGGCCTTTATTATGGC 60

PTWD1F TCATACATCTATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATTCTGCTACTACTCACAATAATA 120
 SST8F TCATACATCTATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATTCTGCTACTACTCACAATAATA 120
 SST5F TCATACATCTATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATTCTGCTACTACTCACAATAATA 120
 SKTF TCATACATCTATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATTCTGCTACTACTCACAATAATA 120
 NP1F1F TCATACATCTATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATTCTGCTACTACTCACAATAATA 120
 PTT2F TCATACATCTATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATTCTGCTACTACTCACAATAATA 120
 SSDVT10F TCATACATCTATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATTCTGCTACTACTCACAATAATA 120
 SSDVT15F TCATACATCTATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATTCTGCTACTACTCACAATAATA 120
 SPV1F TCATACATCTATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATTCTGCTACTACTCACAATAATA 120
 NPWD1F TCATACATCTATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATTCTGCTACTACTCACAATAATA 120
 AY2F TCATACATCTATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATTCTGCTACTACTCACAATAATA 120
 AY763758T.pectolaris TCATACATCTATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATTCTGCTACTACTCACAATAATA 120

PTWD1F ACCGCTTTCGTAGGCTATGTCTTCCCTGAGGACAAATATCTTTCTGAGGTGCAACCGTC 180
 SST8F ACCGCTTTCGTAGGCTATGTCTTCCCTGAGGACAAATATCTTTCTGAGGTGCAACCGTC 180
 SST5F ACCGCTTTCGTAGGCTATGTCTTCCCTGAGGACAAATATCTTTCTGAGGTGCAACCGTC 180
 SKTF ACCGCTTTCGTAGGCTATGTCTTCCCTGAGGACAAATATCTTTCTGAGGTGCAACCGTC 180
 NP1F1F ACCGCTTTCGTAGGCTATGTCTTCCCTGAGGACAAATATCTTTCTGAGGTGCAACCGTC 180
 PTT2F ACCGCTTTCGTAGGCTATGTCTTCCCTGAGGACAAATATCTTTCTGAGGTGCAACCGTC 180
 SSDVT10F ACCGCTTTCGTAGGCTATGTCTTCCCTGAGGACAAATATCTTTCTGAGGTGCAACCGTC 180
 SSDVT15F ACCGCTTTCGTAGGCTATGTCTTCCCTGAGGACAAATATCTTTCTGAGGTGCAACCGTC 180
 SPV1F ACCGCTTTCGTAGGCTATGTCTTCCCTGAGGACAAATATCTTTCTGAGGTGCAACCGTC 180
 NPWD1F ACCGCTTTCGTAGGCTATGTCTTCCCTGAGGACAAATATCTTTCTGAGGTGCAACCGTC 180
 AY2F ACCGCTTTCGTAGGCTATGTCTTCCCTGAGGACAAATATCTTTCTGAGGTGCAACCGTC 180
 AY763758T.pectolaris ACCGCTTTCGTAGGCTATGTCTTCCCTGAGGACAAATATCTTTCTGAGGTGCAACCGTC 180

PTWD1F ATTACAAACCTCCTCTCCGCCATCCCTTATGTAGGGAACACTCTAGTTCAATGAATCTGA 240
 SST8F ATTACAAACCTCCTCTCCGCCATCCCTTATGTAGGGAACACTCTAGTTCAATGAATCTGA 240
 SST5F ATTACAAACCTCCTCTCCGCCATCCCTTATGTAGGGAACACTCTAGTTCAATGAATCTGA 240
 SKTF ATTACAAACCTCCTCTCCGCCATCCCTTATGTAGGGAACACTCTAGTTCAATGAATCTGA 240
 NP1F1F ATTACAAACCTCCTCTCCGCCATCCCTTATGTAGGGAACACTCTAGTTCAATGAATCTGA 240
 PTT2F ATTACAAACCTCCTCTCCGCCATCCCTTATGTAGGGAACACTCTAGTTCAATGAATCTGA 240
 SSDVT10F ATTACAAACCTCCTCTCCGCCATCCCTTATGTAGGGAACACTCTAGTTCAATGAATCTGA 240
 SSDVT15F ATTACAAACCTCCTCTCCGCCATCCCTTATGTAGGGAACACTCTAGTTCAATGAATCTGA 240
 SPV1F ATTACAAACCTCCTCTCCGCCATCCCTTATGTAGGGAACACTCTAGTTCAATGAATCTGA 240
 NPWD1F ATTACAAACCTCCTCTCCGCCATCCCTTATGTAGGGAACACTCTAGTTCAATGAATCTGA 240
 AY2F ATTACAAACCTCCTCTCCGCCATCCCTTATGTAGGGAACACTCTAGTTCAATGAATCTGA 240
 AY763758T.pectolaris ATTACAAACCTCCTCTCCGCCATCCCTTATGTAGGGAACACTCTAGTTCAATGAATCTGA 240

PTWD1F GGCGGATTCTCCGTAGACAACGCCACTCTTACTCGATTCTTTGCCTTCCACTTTCTCCTC 300
 SST8F GGCGGATTCTCCGTAGACAACGCCACTCTTACTCGATTCTTTGCCTTCCACTTTCTCCTC 300
 SST5F GGCGGATTCTCCGTAGACAACGCCACTCTTACTCGATTCTTTGCCTTCCACTTTCTCCTC 300
 SKTF GGCGGATTCTCCGTAGACAACGCCACTCTTACTCGATTCTTTGCCTTCCACTTTCTCCTC 300
 NP1F1F GGCGGATTCTCCGTAGACAACGCCACTCTTACTCGATTCTTTGCCTTCCACTTTCTCCTC 300
 PTT2F GGCGGATTCTCCGTAGACAACGCCACTCTTACTCGATTCTTTGCCTTCCACTTTCTCCTC 300
 SSDVT10F GGCGGATTCTCCGTAGACAACGCCACTCTTACTCGATTCTTTGCCTTCCACTTTCTCCTC 300
 SSDVT15F GGCGGATTCTCCGTAGACAACGCCACTCTTACTCGATTCTTTGCCTTCCACTTTCTCCTC 300
 SPV1F GGCGGATTCTCCGTAGACAACGCCACTCTTACTCGATTCTTTGCCTTCCACTTTCTCCTC 300
 NPWD1F GGCGGATTCTCCGTAGACAACGCCACTCTTACTCGATTCTTTGCCTTCCACTTTCTCCTC 300
 AY2F GGCGGATTCTCCGTAGACAACGCCACTCTTACTCGATTCTTTGCCTTCCACTTTCTCCTC 300
 AY763758T.pectolaris GGCGGATTCTCCGTAGACAACGCCACTCTTACTCGATTCTTTGCCTTCCACTTTCTCCTC 300

PTWD1F CCCTTTATTATTGAGCAGCAACTATTATCCACTTACTTTTCTCCACGAAACAGGCTCT 360
 SST8F CCCTTTATTATTGAGCAGCAACTATTATCCACTTACTTTTCTCCACGAAACAGGCTCT 360
 SST5F CCCTTTATTATTGAGCAGCAACTATTATCCACTTACTTTTCTCCACGAAACAGGCTCT 360

SKTTF CCCTTTATTATTGCAGCAGCAACTATTATCCACTTACTTTTCCTCCACGAAACAGGCTCT 360
 NP11F CCCTTTATTATTGCAGCAGCAACTATTATCCACTTACTTTTCCTCCACGAAACAGGCTCT 360
 PTT2F CCCTTTATTATTGCAGCAGCAACTATTATCCACTTACTTTTCCTCCACGAAACAGGCTCT 360
 SSDVT10F CCCTTTATTATTGCAGCAGCAACTATTATCCACTTACTTTTCCTCCACGAAACAGGCTCT 360
 SSDVT15F CCCTTTATTATTGCAGCAGCAACTATTATCCACTTACTTTTCCTCCACGAAACAGGCTCT 360
 SPV1F CCCTTTATTATTGCAGCAGCAACTATTATCCACTTACTTTTCCTCCACGAAACAGGCTCT 360
 NPWD1F CCCTTTATTATTGCAGCAGCAACTATTATCCACTTACTTTTCCTCCACGAAACAGGCTCT 360
 AY2F CCCTTTATTATTGCAGCAGCAACTATTATCCACTTACTTTTCCTCCACGAAACAGGCTCT 360
 AY763758T.pectolaris CCCTTTATTATTGCAGCAGCAACTATTATCCACTTACTTTTCCTCCACGAAACAGGCTCT 360

PTWD1F AATAACCCAGTAGGCCATAAATTCAAACGTAGATAAAAATTACTTTTCATCCATACCTTCTCT 420
 SST8F AATAACCCAGTAGGCCATAAATTCAAACGTAGATAAAAATTACTTTTCATCCATACCTTCTCT 420
 SST5F AATAACCCAGTAGGCCATAAATTCAAACGTAGATAAAAATTACTTTTCATCCATACCTTCTCT 420
 SKTTF AATAACCCAGTAGGCCATAAATTCAAACGTAGATAAAAATTACTTTTCATCCATACCTTCTCT 420
 NP11F AATAACCCAGTAGGCCATAAATTCAAACGTAGATAAAAATTACTTTTCATCCATACCTTCTCT 420
 PTT2F AATAACCCAGTAGGCCATAAATTCAAACGTAGATAAAAATTACTTTTCATCCATACCTTCTCT 420
 SSDVT10F AATAACCCAGTAGGCCATAAATTCAAACGTAGATAAAAATTACTTTTCATCCATACCTTCTCT 420
 SSDVT15F AATAACCCAGTAGGCCATAAATTCAAACGTAGATAAAAATTACTTTTCATCCATACCTTCTCT 420
 SPV1F AATAACCCAGTAGGCCATAAATTCAAACGTAGATAAAAATTACTTTTCATCCATACCTTCTCT 420
 NPWD1F AATAACCCAGTAGGCCATAAATTCAAACGTAGATAAAAATTACTTTTCATCCATACCTTCTCT 420
 AY2F AATAACCCAGTAGGCCATAAATTCAAACGTAGATAAAAATTACTTTTCATCCATACCTTCTCT 420
 AY763758T.pectolaris AATAACCCAGTAGGCCATAAATTCAAACGTAGATAAAAATTACTTTTCATCCATACCTTCTCT 420

PTWD1F TACAAAGATCTTCTAGGATTTGCAGCAATATTAATTGCCCTAATCTTATATCCTTGTTTC 480
 SST8F TACAAAGATCTTCTAGGATTTGCAGCAATATTAATTGCCCTAATCTTATATCCTTGTTTC 480
 SST5F TACAAAGATCTTCTAGGATTTGCAGCAATATTAATTGCCCTAATCTTATATCCTTGTTTC 480
 SKTTF TACAAAGATCTTCTAGGATTTGCAGCAATATTAATTGCCCTAATCTTATATCCTTGTTTC 480
 NP11F TACAAAGATCTTCTAGGATTTGCAGCAATATTAATTGCCCTAATCTTATATCCTTGTTTC 480
 PTT2F TACAAAGATCTTCTAGGATTTGCAGCAATATTAATTGCCCTAATCTTATATCCTTGTTTC 480
 SSDVT10F TACAAAGATCTTCTAGGATTTGCAGCAATATTAATTGCCCTAATCTTATATCCTTGTTTC 480
 SSDVT15F TACAAAGATCTTCTAGGATTTGCAGCAATATTAATTGCCCTAATCTTATATCCTTGTTTC 480
 SPV1F TACAAAGATCTTCTAGGATTTGCAGCAATATTAATTGCCCTAATCTTATATCCTTGTTTC 480
 NPWD1F TACAAAGATCTTCTAGGATTTGCAGCAATATTAATTGCCCTAATCTTATATCCTTGTTTC 480
 AY2F TACAAAGATCTTCTAGGATTTGCAGCAATATTAATTGCCCTAATCTTATATCCTTGTTTC 480
 AY763758T.pectolaris TACAAAGATCTTCTAGGATTTGCAGCAATATTAATTGCCCTAATCTTATATCCTTGTTTC 480

PTWD1F TCACCAAATCTTTTAGGAGACCCAGATAATTTTCACACCCGCCAACCCCTAGTCACCCCG 540
 SST8F TCACCAAATCTTTTAGGAGACCCAGATAATTTTCACACCCGCCAACCCCTAGTCACCCCG 540
 SST5F TCACCAAATCTTTTAGGAGACCCAGATAATTTTCACACCCGCCAACCCCTAGTCACCCCG 540
 SKTTF TCACCAAATCTTTTAGGAGACCCAGATAATTTTCACACCCGCCAACCCCTAGTCACCCCG 540
 NP11F TCACCAAATCTTTTAGGAGACCCAGATAATTTTCACACCCGCCAACCCCTAGTCACCCCG 540
 PTT2F TCACCAAATCTTTTAGGAGACCCAGATAATTTTCACACCCGCCAACCCCTAGTCACCCCG 540
 SSDVT10F TCACCAAATCTTTTAGGAGACCCAGATAATTTTCACACCCGCCAACCCCTAGTCACCCCG 540
 SSDVT15F TCACCAAATCTTTTAGGAGACCCAGATAATTTTCACACCCGCCAACCCCTAGTCACCCCG 540
 SPV1F TCACCAAATCTTTTAGGAGACCCAGATAATTTTCACACCCGCCAACCCCTAGTCACCCCG 540
 NPWD1F TCACCAAATCTTTTAGGAGACCCAGATAATTTTCACACCCGCCAACCCCTAGTCACCCCG 540
 AY2F TCACCAAATCTTTTAGGAGACCCAGATAATTTTCACACCCGCCAACCCCTAGTCACCCCG 540
 AY763758T.pectolaris TCACCAAATCTTTTAGGAGACCCAGATAATTTTCACACCCGCCAACCCCTAGTCACCCCG 540

PTWD1F CCCACATTAACCAGAGTGATACTTCTTATTGCTTACGCCATCTTACGGTCAATTCCA 600
 SST8F CCCACATTAACCAGAGTGATACTTCTTATTGCTTACGCCATCTTACGGTCAATTCCA 600
 SST5F CCCACATTAACCAGAGTGATACTTCTTATTGCTTACGCCATCTTACGGTCAATTCCA 600
 SKTTF CCCACATTAACCAGAGTGATACTTCTTATTGCTTACGCCATCTTACGGTCAATTCCA 600
 NP11F CCCACATTAACCAGAGTGATACTTCTTATTGCTTACGCCATCTTACGGTCAATTCCA 600
 PTT2F CCCACATTAACCAGAGTGATACTTCTTATTGCTTACGCCATCTTACGGTCAATTCCA 600
 SSDVT10F CCCACATTAACCAGAGTGATACTTCTTATTGCTTACGCCATCTTACGGTCAATTCCA 600
 SSDVT15F CCCACATTAACCAGAGTGATACTTCTTATTGCTTACGCCATCTTACGGTCAATTCCA 600
 SPV1F CCCACATTAACCAGAGTGATACTTCTTATTGCTTACGCCATCTTACGGTCAATTCCA 600
 NPWD1F CCCACATTAACCAGAGTGATACTTCTTATTGCTTACGCCATCTTACGGTCAATTCCA 600
 AY2F CCCACATTAACCAGAGTGATACTTCTTATTGCTTACGCCATCTTACGGTCAATTCCA 600
 AY763758T.pectolaris CCCACATTAACCAGAGTGATACTTCTTATTGCTTACGCCATCTTACGGTCAATTCCA 600

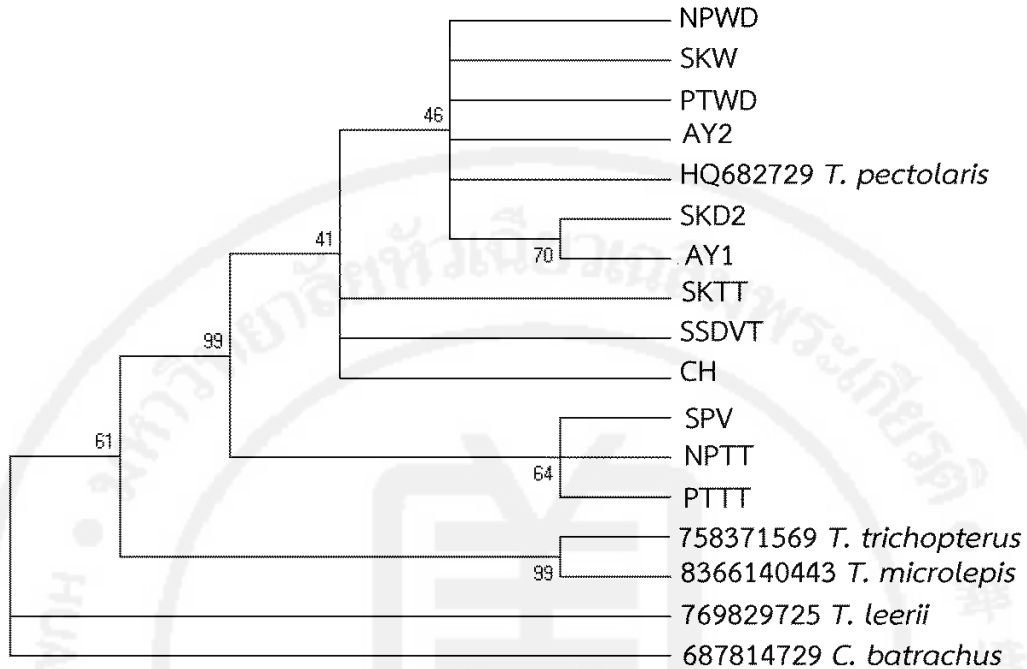
PTWD1F	A 601
SST8F	A 601
SST5F	A 601
SKTTF	A 601
NPPT1F	A 601
PTTT2F	A 601
SSDVT10F	A 601
SSDVT15F	A 601
SPV1F	A 601
NPWD1F	A 601
AY2F	A 601
AY763758T.pectolaris	A 601

*

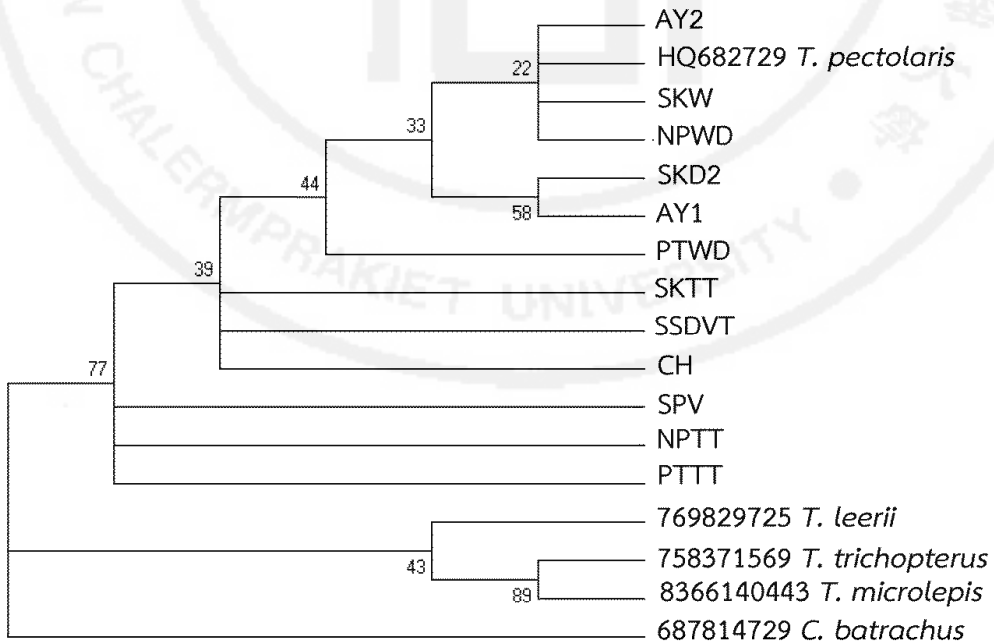
ภาพที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome *b* (Cytb) ของปลาสดิจจาก จังหวัดสมุทรปราการ(SP) สมุทรสาคร(SS) อัญญา(AY) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และนครปฐม(NP) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ของ Cytochrome *b* ของปลาสดิจ *Trichogaster pectoralis* accession number AY763758

4.2.3 แผนภาพอนุমানต้นไม้ (phylogenetic tree) จากยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI)

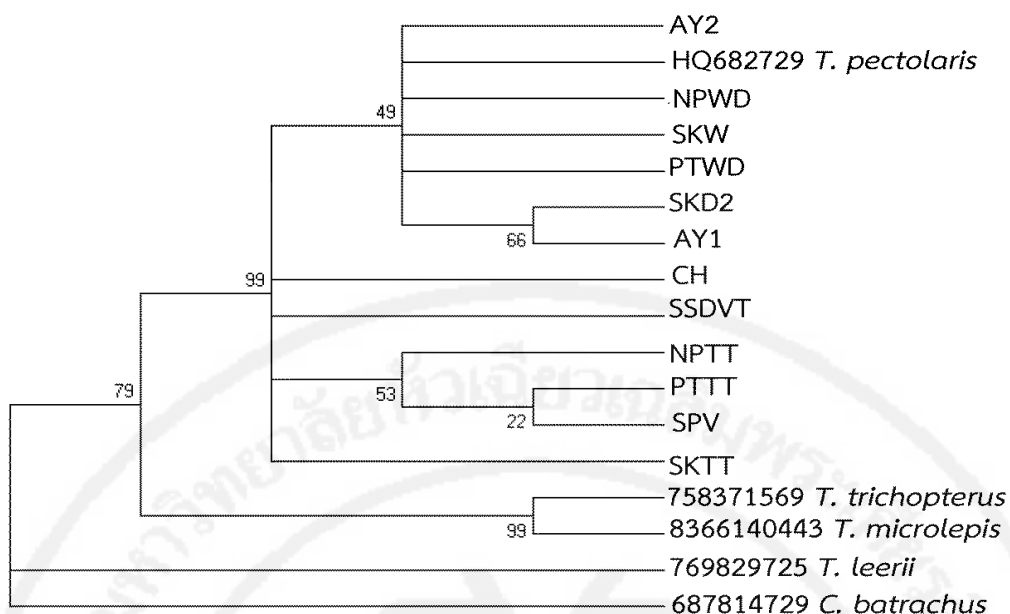
ผลการทำ Alignment ของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ของปลาสดิจจาก 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ(SP) สมุทรสาคร(SS) อัญญา(AY) ฉะเชิงเทรา(CH) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และ นครปฐม(NP) ด้วยโปรแกรม Bioedit ร่วมกับยีน Cytochrome oxidase subunit I จากปลาสดิจสายพันธุ์อ้างอิง คือ ปลาสดิจ *Trichogaster pectoralis* accession number HQ682729 และยีน Cytochrome oxidase subunit I จากปลากระดี่สายพันธุ์ใกล้เคียง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลากระดี่หม้อ *Trichogaster trichopterus* accession number 758371569 ปลากระดี่นาง *Trichogaster microlepis* accession number 836614043 ปลากระดี่มุก *Trichogaster leerii* accession number 769829725 และใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I ของปลาคูกด้าน *Clarias batrachus* accession number 687814729 เป็น Outgroup โดยนำข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบในโปรแกรม Bioedit และนำมาจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม MEGA 5 เพื่อสร้างแผนภาพอนุমানต้นไม้ โดยกำหนดค่า bootstap เท่ากับ 2,000 โดยใช้วิธีในการวิเคราะห์แบบ Maximum likelihood (ภาพที่ 4.6) Neighbor joining (ภาพที่ 4.7) และ Maximum parsimony (ภาพที่ 4.8) ตามลำดับ



ภาพที่ 4.6 แผนภาพอนุกรมวิธานต้นไม้ของยีน Cytochrome oxidase subunit I ของปลาสดจาก 7 จังหวัด เมื่อใช้วิธี Maximum likelihood



ภาพที่ 4.7 แผนภาพอนุกรมวิธานต้นไม้ของยีน Cytochrome oxidase subunit I ของปลาสดจาก 7 จังหวัด เมื่อใช้วิธี Neighbor joining



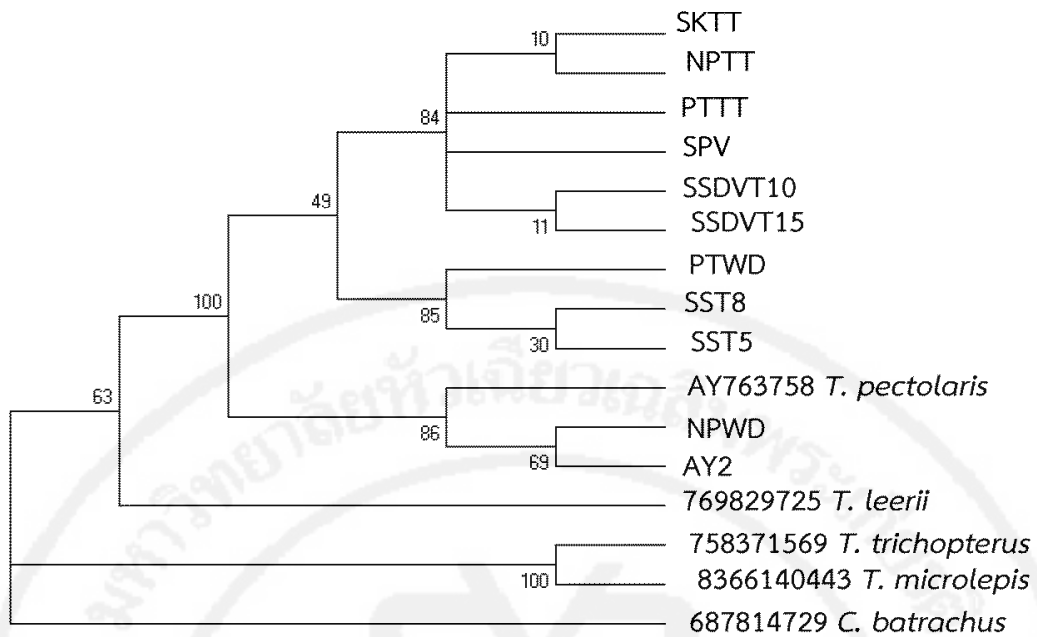
ภาพที่ 4.8 แผนภาพอนุมานต้นไม้ของยีน Cytochrome oxidase subunit I ของปลาสดจาก 7 จังหวัด เมื่อใช้วิธี Maximum parsimony

จากแผนภาพอนุมานต้นไม้ของยีน Cytochrome oxidase subunit I ของปลาสดจาก 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ(SP) สมุทรสาคร(SS) อัญญา(AY) ฉะเชิงเทรา(CH) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และ นครปฐม(NP) เมื่อใช้วิธี Maximum likelihood จะสามารถจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันได้ 4 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ out group (ปลาตุ๊กต่าน *Clarias batrachus* accession number 687814729) และปลากระดี่ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ปลากระดี่หม้อ *Trichogaster trichopterus* accession number 758371569, ปลากระดี่นาง *Trichogaster microlepis* accession number 836614043, ปลากระดี่มุก *Trichogaster leerii* accession number 769829725 ซึ่งสามารถแยกออกมาจากปลาสดอย่างชัดเจน กลุ่มที่ 2 คือ ปลาสดหลายแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสมุทรปราการ(SPV) ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดนครปฐม(NPTT) และปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดเพชรบุรี(PTTT) กลุ่มที่ 3 คือ ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสระแก้ว(SKTT) ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสมุทรสาคร(SSDVT) และปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดฉะเชิงเทรา(CH) กลุ่มที่ 4 คือ ปลาสดหลายแถบดำ 1 แถบ กลางลำตัวจากจังหวัดนครปฐม (NPWD) ปลาสดหลายแถบดำ 1 แถบ กลางลำตัวจากจังหวัดสระแก้ว(SKWD) ปลาสดหลายแถบดำ 1 แถบ กลางลำตัวจากจังหวัดเพชรบุรี(PTWD) ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดอัญญา(AY) ปลาสดอ้างอิง *Trichogaster pectoralis*

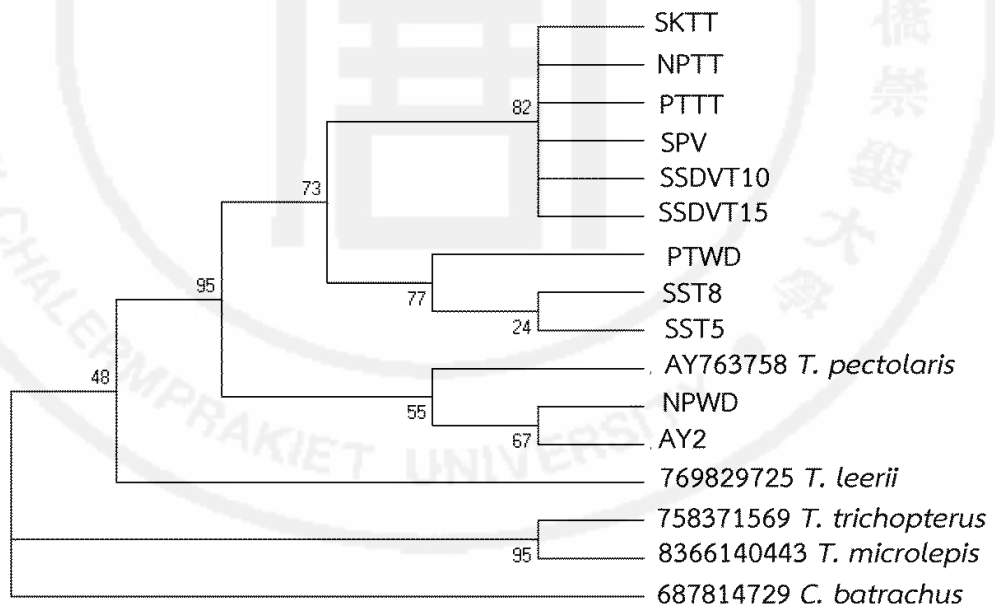
accession number HQ682729 และปลาสดหลายแถบดำ 1 แถบ กลางลำตัวจากจังหวัดสระแก้ว (SKD) และเมื่อใช้วิธี Neighbor joining และ Maximum parsimony สามารถจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันได้ 4 กลุ่มใหญ่ๆ เช่นเดียวกับการจัดกลุ่มโดยใช้วิธี Maximum likelihood ซึ่งทั้ง 3 วิธี ให้ผลสอดคล้องกันเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

4.2.4 แผนภาพอนุমানต้นไม้ (phylogenetic tree) จากยีน Cytochrome *b* (Cytb)

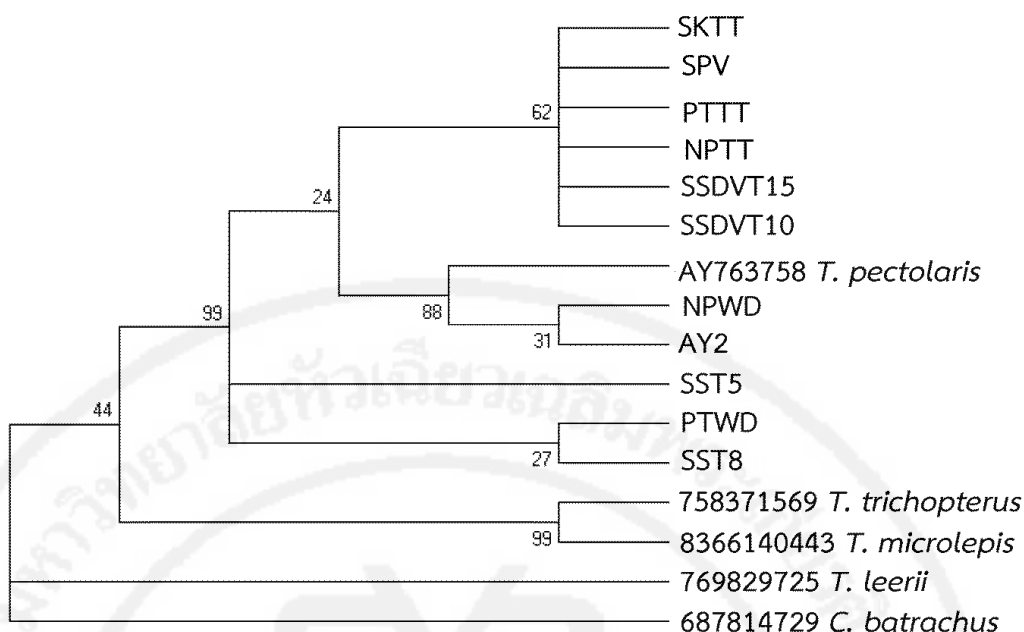
ผลการทำ Alignment ของยีน Cytochrome *b* ของปลาสดจาก 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ(SP) สมุทรสาคร(SS) อุดรธานี(AY) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และ นครปฐม(NP) ด้วยโปรแกรม Bioedit ร่วมกับยีน Cytochrome *b* จากปลาสดสายพันธุ์อ้างอิง คือ ปลาสด *Trichogaster pectoralis* accession number AY763758 และยีน Cytochrome *b* จากปลากระดี่สายพันธุ์ใกล้เคียง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลากระดี่หม้อ *Trichogaster trichopterus* accession number 758371569 ปลากระดี่นาง *Trichogaster microlepis* accession number 836614043 ปลากระดี่มุก *Trichogaster leerii* accession number 769829725 และใช้ยีน Cytochrome *b* ของปลาดุกด้าน *Clarias batrachus* accession number 687814729 เป็น Outgroup โดยนำข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบในโปรแกรม Bioedit และนำมาจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม MEGA 5 เพื่อสร้างแผนภาพอนุমানต้นไม้ โดยกำหนดค่า bootstap 2,000 โดยใช้วิธีในการวิเคราะห์แบบ Maximum likelihood (ภาพที่ 4.9), Neighbor joining (ภาพที่ 4.10) และ Maximum parsimony (ภาพที่ 4.11) ตามลำดับ



ภาพที่ 4.9 แผนภาพอนุมานต้นไม้ของยีน Cytochrome *b* ของปลาสดจาก 6 จังหวัด เมื่อใช้วิธี Maximum likelihood



ภาพที่ 4.10 แผนภาพอนุมานต้นไม้ของยีน Cytochrome *b* ของปลาสดจาก 6 จังหวัด เมื่อใช้วิธี Neighbor joining



ภาพที่ 4.11 แผนภาพอนุมานต้นไม้ของยีน Cytochrome *b* ของปลาสดจาก 6 จังหวัด เมื่อใช้วิธี Maximum parsimony

จากแผนภาพอนุมานต้นไม้ของยีน Cytochrome *b* ของปลาสดจาก 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ(SP) สมุทรสาคร(SS) อุดรธานี(AY) สระแก้ว(SK) เพชรบุรี(PT) และ นครปฐม(NP) เมื่อใช้วิธี Maximum likelihood จะสามารถจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันได้ 4 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ out group (ปลาตุ๊กตาด้าน *Clarias batrachus* accession number 687814729) และปลากระดี่ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ปลากระดี่หม้อ *Trichogaster trichopterus* accession number 758371569, ปลากระดี่นาง *Trichogaster microlepis* accession number 836614043, ปลากระดี่มุก *Trichogaster leerii* accession number 769829725 ซึ่งสามารถแยกออกมาจากปลาสดอย่างชัดเจน กลุ่มที่ 2 คือ ปลาสดอ้างอิง *Trichogaster pectoralis* accession number AY763758 ปลาสดหลายแถบดำคล้ายสายเลือดจากจังหวัดอุดรธานี(AY2) และปลาสดหลายแถบดำ 1 แถบ กลางลำตัวจากจังหวัดนครปฐม (NPWD) กลุ่มที่ 3 คือ ปลาสดแถบดำคล้ายสายเลือดจากจังหวัดสมุทรสาคร(SST) และปลาสดหลายแถบดำ 1 แถบ กลางลำตัวจากจังหวัดเพชรบุรี(PTWD) กลุ่มที่ 4 คือ ปลาสดแถบดำคล้ายสายเลือดจากจังหวัดสระแก้ว(SKTT) ปลาสดแถบดำคล้ายสายเลือดจากจังหวัดนครปฐม(NPTT) ปลาสดแถบดำคล้ายสายเลือดจากจังหวัดเพชรบุรี(PTTT) ปลาสดแถบดำคล้ายสายเลือดจากจังหวัดสมุทรปราการ(SPV) และปลาสดแถบดำคล้ายสายเลือดจากจังหวัดสมุทรสาคร(SSDVT) เมื่อใช้วิธี Neighbor joining และ Maximum parsimony จะ

สามารถจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันได้ 4 กลุ่มใหญ่ๆ เช่นเดียวกับการจัดกลุ่มโดยใช้วิธี Maximum likelihood ซึ่งทั้ง 3 วิธี ให้ผลสอดคล้องกันเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

สรุปผลจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome oxidase subunit I และ Cytochrome *b* ของปลาสด มาทำแผนภาพอนุमानต้นไม้จะสามารถจัดกลุ่มปลาสดที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์จะมาอยู่ในกลุ่มเดียวกันเสมอ และพบได้ทั้งการจัดโดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และ ยีน Cytochrome *b* ในทุกวิธีของการจัดกลุ่ม โดยสามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มหลักๆ 3 กลุ่ม ดังตารางที่ 4.5 คือ กลุ่มที่ 1 ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสมุทรปราการ (SPV) ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดนครปฐม (NPTT) และปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดเพชรบุรี (PTTT) กลุ่มที่ 2 ปลาสดลายแถบดำ 1 แถบ กลางลำตัวจากจังหวัดนครปฐม (NPWD) ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดอยุธยา (AY) และปลาสดอ้างอิง *Trichogaster pectoralis* accession number HQ682729 กลุ่มที่ 3 คือ ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสระแก้ว (SKTT) ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสมุทรสาคร (SSDVT) และปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดฉะเชิงเทรา (CH)

ตารางที่ 4.5 แสดงการจัดกลุ่มของปลาสดโดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และ Cytochrome *b* ของปลาสด มาทำแผนภาพอนุमानต้นไม้

กลุ่ม	จังหวัด
1	ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสมุทรปราการ (SPV) ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดนครปฐม (NPTT) และปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดเพชรบุรี (PTTT)
2	ปลาสดลายแถบดำ 1 แถบ กลางลำตัวจากจังหวัดนครปฐม (NPWD) ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดอยุธยา (AY)
3	ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสระแก้ว (SKTT) ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสมุทรสาคร (SSDVT) และปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดฉะเชิงเทรา (CH)

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของปลาสด โดยการศึกษานาฬิกาความยาวของตัวปลาสดอายุ 8 เดือน จาก 7 จังหวัด พบว่าปลาทั้ง 7 จังหวัดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ปลาสดจากจังหวัดสมุทรสาครมีขนาดความยาวของลำตัวมากที่สุดโดยดูจากค่าความยาวเหยียด คือ 152.57 มิลลิเมตร และปลาสดจากจังหวัดฉะเชิงเทรามีขนาดตัวสั้นที่สุด คือ 139.57 มิลลิเมตร โดยขนาดของปลาสดที่สามารถโตเต็มที่จะมีความยาวได้ถึง 250 มิลลิเมตร (พรชัย จารุรัตน์จามร และประภาส โฉลกพันธ์รัตน์. 2520) ซึ่งขนาดความยาวของตัวปลานั้นขึ้นกับอาหารที่ปลาสดได้รับในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยปลาสดจากจังหวัดสมุทรสาครมีขนาดลำตัวยาวกว่าแหล่งที่อื่นๆ เนื่องจากปลากินอาหารเม็ดซึ่งมีสารอาหารที่ส่งเสริมให้ปลามีขนาดใหญ่และโตไว ในส่วนความสมบูรณ์เพศของปลาสดพบว่าปลาสดจากจังหวัดฉะเชิงเทรามีดัชนีสมบูรณ์เพศสูงที่สุด คือ 13.68% และ ปลาสดจากจังหวัดอยุธยา มีความสมบูรณ์เพศน้อยที่สุด คือ 0.67% ความสมบูรณ์เพศเป็นการหาค่าที่บอกความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad Weight, GW) กับ น้ำหนักตัว (Body Weight, BW) หากปลาสดมีค่าดัชนีสมบูรณ์เพศสูงปลาก็เหมาะสมต่อการผสมพันธุ์และการวางไข่เพื่อขยายพันธุ์มากกว่าปลาที่มีค่าดัชนีสมบูรณ์เพศต่ำ โดยทั่วไปปลาสดสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้เมื่อมีอายุครบ 7 เดือน (พรชัย จารุรัตน์จามร และคณะ. 2543) จากการศึกษาค้นพบของลักษณะภายนอกพบว่าปลาสดมี 3 ลักษณะ คือ 1) ลายแถบดำคล้ายลายเสือ 2) ลายแถบดำ 1 แถบกลางตัวหรือเรียกว่าลายจุด และ 3) ไม่มีแถบดำ ตัวมีสีขาวนวล ซึ่งปลาสดจากจังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดสระแก้ว จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม มีการแปรผัน 3 ลักษณะ แต่ปลาสดจากจังหวัดอยุธยาและฉะเชิงเทรามีเพียงลักษณะเดียวคือ มีแถบดำคล้ายลายเสือซึ่งสีของปลาสดเกิดจากเม็ดสี melanophores ที่ปลาสร้างขึ้น เซลล์สร้างจุดสีสามารถหดหรือขยายตัวได้โดยรวดเร็วเกิดจากการกระตุ้นโดยระบบประสาททำให้ปลาสามารถเปลี่ยนสีและลวดลายให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ นอกจากนี้ลักษณะการแปรผันที่แตกต่างกันอาจเกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ (cross breeding) ของปลาสด ทำให้เกิดลายที่มีลักษณะแตกต่างกัน จากการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาโดยใช้หลักการของระบบเครือข่ายโครงยึดสามารถจัดกลุ่มของปลาสดที่มีระยะจุดความใกล้เคียงกันในแต่ละจุด ดังแสดงกลุ่มปลาสดในตารางที่ 4.3 และเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนจากตาถึงช่องเหงือกต่อความยาวดังตารางที่ 4.4 พบว่า ปลาสดจากจังหวัดนครปฐมมีอัตราส่วนระยะจากตาถึงช่องเหงือกต่อความยาวสูงที่สุด คือ 0.27 ปลาสดจากจังหวัดสมุทรปราการมีอัตราส่วนต่ำที่สุด คือ 0.19 และปลาสดจากจังหวัดสระแก้วและอยุธยามีค่าเท่ากันที่ 0.21 Pongthana และคณะ (1999) ได้ทำการจัดจำแนกปลาสดในประเทศไทยโดยศึกษาจากความ

แตกต่างของ izozyme 14 ชนิด พบว่าปลาสดจากจังหวัดสมุทรปราการมีความใกล้เคียงกับปลาสดจากจังหวัดพิษณุโลก และปลาสดจากจังหวัดพิษณุโลกจะมีความแตกต่างจากปลาสดจากจังหวัดปัตตานีอย่างมาก และจากการศึกษารูปร่างปลาสดโดยวัดอัตราส่วนความยาวของหัวปลาต่อความยาวของลำตัวปลาพบว่าปลาจากจังหวัดพิษณุโลกจะมีความแตกต่างจากปลาจากจังหวัดอื่นๆ ส่วนปลาจากจังหวัดสมุทรปราการจะมีอัตราส่วนความยาวหัวต่อลำตัวปลาเท่ากับปลาจังหวัดสุพรรณบุรี คือ 0.28 และปลาจากจังหวัดอุบลราชธานีมีอัตราส่วนความยาวหัวต่อลำตัวปลาเท่ากับปลาจังหวัดปัตตานี คือ 0.27 (Pongthona. 1999)

จากการศึกษาความหลากหลายของปลาสดโดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และ Cytochrome b นำมาทำแผนภาพอนุमानต้นไม้พบว่าสามารถจัดจำแนกปลาสดจาก 7 จังหวัดได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ปลาสดแถบคำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสมุทรปราการ (SPV) ปลาสดแถบคำคล้ายลายเสือจากจังหวัดนครปฐม (NPTT) และปลาสดแถบคำคล้ายลายเสือจากจังหวัดเพชรบุรี (PTTT) กลุ่มที่ 2 ปลาสดลายแถบดำ 1 แถบ กลางลำตัวจากจังหวัดนครปฐม (NPWD) ปลาสดแถบคำคล้ายลายเสือจากจังหวัดอยุธยา (AY) และปลาสดอ้างอิง *Trichogaster pectoralis* accession number HQ682729 กลุ่มที่ 3 คือ ปลาสดแถบคำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสระแก้ว (SKTT) ปลาสดแถบคำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสมุทรสาคร (SSDVT) และปลาสดแถบคำคล้ายลายเสือจากจังหวัดฉะเชิงเทรา (CH) ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่าปลาสดที่มีลักษณะสีและลายภายนอกคล้ายกันแต่เมื่อนำมาทำการจัดกลุ่มโดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และ Cytochrome b อาจจะถูกจัดอยู่ต่างกลุ่มกัน มีหลายรายงานที่มีการใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และ Cytochrome b มาใช้ในการในการจัดจำแนกสปีชีส์ของปลา (Lin et al. 2005; Persis et al. 2009; Filonzi et al. 2010; Kochzius et al. 2010) และมีรายงานยืนยันว่าการใช้ยีน 16S rRNA จะมีความผิดพลาดในการตรวจปลาที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน (Kochzius et al. 2010) แต่สำหรับงานวิจัยนี้ใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และ Cytochrome b มาทำการจัดจำแนกปลาสดภายในสปีชีส์เดียวกัน ซึ่งให้ผลการวิจัยยังไม่ชัดเจนเท่ากับปลาที่อยู่ต่างสปีชีส์กัน ซึ่งเห็นได้จากบางกิ่งของแผนภาพอนุमानต้นไม้ที่มีค่าต่ำกว่า 50 จำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการใช้ยีน Cytochrome b ในการจัดจำแนก Indo-Himalayan ในระดับสปีชีส์ (Randi et al. 2001)

สำหรับการเปรียบเทียบวิธีการจัดกลุ่มปลาสดด้วยวิธีทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางอณูชีววิทยาจะให้ผลการจัดกลุ่มของปลาสดแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้เนื่องจากสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะภายนอกเหมือนกันแต่อาจมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน หรือสิ่งมีชีวิตที่ลักษณะภายนอกแตกต่างกันแต่อาจมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยเรื่องสายพันธุ์ของปลาสดที่นำมาเป็นตัวอย่างไม่ทราบแหล่งกำเนิดหรือที่มาของพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ปลาได้อย่างชัดเจน เนื่องจากเกษตรกรอาจนำพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ปลาสดมาจากจังหวัดอื่นๆ เพื่อต้องการให้ได้ผลผลิตที่ดีขึ้น จึงอาจมี

ผลกระทบต่อการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาทำให้ไม่สามารถแยกสายพันธุ์ของพลาสติกได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงควรศึกษาด้วยวิธีทั้ง 2 แบบ ควบคู่กันไปเพื่อเป็นการยืนยันผลซึ่งกันและกัน



บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. ความแปรผันของลักษณะสัณฐานภายนอกของปลาสดทั้ง 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดอยุธยา จังหวัดสระแก้ว จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม มีการแปรผัน 3 ลักษณะ ได้แก่ 1) ลายแถบดำคล้ายลายเสือ 2) ลายแถบดำ 1 แถบกลางตัว และ 3) ไม่มีแถบดำ ตัวมีสีขาวนวล โดยปลาสดของจังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสาคร สระแก้ว เพชรบุรี และ นครปฐม มี 3 แบบ ได้แก่ 1 ลายแถบดำคล้ายลายเสือ 2 ลายแถบดำ 1 แถบกลางตัว และ 3 ไม่มีแถบดำ ตัวมีสีขาวนวล ส่วนปลาสดของจังหวัดฉะเชิงเทรา และอยุธยา มี 1 แบบ ได้แก่ ลายแถบดำคล้ายลายเสือ

2. การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาโดยใช้หลักการของระบบเครือข่ายโครงยึดปรับใช้ตามวิธีของ อนันต์ และพรพิมล (2553) จากการวัดจุด 8 จุด ของปลาสดใน 7 จังหวัด และทำการเปรียบเทียบด้วยวิธี One-Way ANOVA ผลการศึกษาพบว่าปลาทั้ง 7 จังหวัด มีลักษณะภายนอกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3. จากการศึกษาพบว่าเมื่อปลามีความยาวเพิ่มมากขึ้น ก็จะมีน้ำหนักของรังไข่เพิ่มมากขึ้นด้วย โดยจะเห็นได้ว่าปลาสดจากจังหวัดฉะเชิงเทรามีค่ากลางดัชนีสมบรูณ์เพศสูงสุด คือ 13.68% รองลงมาคือ สมุทรสาคร สมุทรปราการ นครปฐม เพชรบุรี สระแก้ว ได้แก่ 12.37%, 10.35%, 8.37%, 8.31% และ 5.35% ตามลำดับ ส่วนจังหวัดที่มีค่าดัชนีความสมบรูณ์เพศต่ำที่สุด ได้แก่ จังหวัดอยุธยา โดยมีค่ากลางของดัชนีความสมบรูณ์เพศต่ำที่สุด คือ 0.67% จะเห็นได้ว่าปลาสดจากจังหวัดฉะเชิงเทรามีค่ากลางของดัชนีสมบรูณ์เพศมากที่สุด และสามารถเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์เร็วที่สุด นั่นคือ มีขนาดเพียง 122.94 มิลลิเมตร เท่านั้นก็สามารถให้ไข่ได้แล้ว ในขณะที่จังหวัดอยุธยามีค่าเฉลี่ยดัชนีสมบรูณ์เพศน้อยที่สุด คือ 0.67% และต้องมีขนาดถึง 141.84 มิลลิเมตร จึงจะเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากลักษณะทางนิเวศวิทยา และอาหารที่ปลาสดได้รับในแต่ละแหล่ง

4. จากการศึกษาโดยใช้ยีน Cytochrome oxidase subunit I และ ยีน Cytochrome *b* มาสร้างเป็นแผนภาพอนุমানต้นไม้ สามารถจัดกลุ่มปลาสด ได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสมุทรปราการ (SPV) ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดนครปฐม (NPTT) และปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดเพชรบุรี (PTTT) กลุ่มที่ 2 ปลาสดลายแถบดำ 1 แถบ กลางลำตัวจากจังหวัดนครปฐม (NPWD) ปลาสดแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดอยุธยา (AY) และปลาสดอ้างอิง *Trichogaster pectoralis* accession number HQ682729 กลุ่มที่ 3 คือ

พลาสติกแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสระแก้ว (SKTT) พลาสติกแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดสมุทรสาคร (SSDVT) และพลาสติกแถบดำคล้ายลายเสือจากจังหวัดฉะเชิงเทรา (CH)

5. งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อรูปร่างและลักษณะของพลาสติกที่แตกต่างกัน คือ ปัจจัยภายนอก ได้แก่ สภาพแวดล้อม ดิน น้ำ แสงแดด และรวมถึงการให้อาหาร ซึ่งมีผลต่อรูปร่าง ลักษณะ สี และลายที่เกิดขึ้นบนตัวพลาสติก ส่วนปัจจัยภายในด้านพันธุกรรมของพลาสติกในแต่ละจังหวัดนั้นมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ซึ่งพลาสติกบางแหล่งอาจมาจากต้นกำเนิดพ่อพันธุ์แม่พันธุ์สายพันธุ์เดียวกันหรือใกล้เคียงกัน

6.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้มีข้อจำกัดเรื่องแหล่งที่มาของตัวอย่างพลาสติกซึ่งไม่สามารถระบุที่มาของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์พลาสติกได้ และไม่สามารถนำตัวอย่างมาจากทุกๆปอภายในจังหวัดได้ หรือนำตัวอย่างมาจากทุกจังหวัดในประเทศไทยได้ นอกจากนี้ตัวอย่างพลาสติกบางจังหวัดเป็นปลาจากคลองธรรมชาติ จึงไม่สามารถควบคุมอายุของพลาสติกที่จับขึ้นมาได้ จึงมีข้อเสนอแนะให้งานวิจัยเรื่องถัดไปที่ทำการทดลอง โดยการหาประวัติสายพันธุ์พลาสติกที่ใช้ในการทดลอง หรือ หาพลาสติกสายพันธุ์ดั้งเดิมมาทำ จะทำให้ได้ผลการทดลองที่สามารถแบ่งกลุ่มปลาได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรมประมง. (2548) **การเพาะเลี้ยงปลาสด**. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุม สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรมประมง กองเศรษฐกิจการประมง. (2545) **สถิติประมงน้ำจืด**. กรุงเทพฯ : กอง กรม กระทรวง.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. (ม.ป.ป.) **ปลาสด**. [ออนไลน์] แหล่งที่มา : http://www.doae.go.th/library/html/detail/f_salid/p11_1.htm (15 สิงหาคม 2556)
- เจียมจิตต์ บุญสม. (2529) “ปัญหาเกี่ยวกับการผลิตและแนวทางแก้ไขในการทำนาปลาสด” **วารสารการประมง**. 39(1) หน้า 36-44.
- ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ และนนทวิ ปานพรหมมินทร์. (2557) “ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดปลาวางศ์เสือดอ” **แก่นเกษตร**. 42 (ฉบับพิเศษ 1) หน้า 742-748.
- ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ และศิริภรณ์ อ่วมเจริญ. (2557) “ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดปลาในพื้นที่ปกปักรักษารูกรมพีช มหาวิทยาลัยพะเยา” **วารสารนเรศวรพะเยา**. 7(3) หน้า 3226-232.
- ธนิษฐา ทรรพนันท์. (2543) **ปฏิบัติการชีววิทยาประมง (Laboratory in Fishery Biology)**. กรุงเทพฯ : คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธวัช ตอนสกุล, วิเชียร มากตุน, และฮีโรชิ อุวะ. (2530) “การศึกษาการไอโทพของปลากระต๊อและปลาสดไทย” **ในการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. หน้า 113-119. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิริจรรยา เขาประเสริฐ. (2551) **การใช้ประโยชน์จากสารสกัดใบหม่อนเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาปลาสดตากแห้ง**. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร) พิษณุโลก : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- สัจชัย บุญญะธานี. (2548) **การเลี้ยงปลาสด**. กรุงเทพฯ : อักษรสยามการพิมพ์.
- แสงทอง ประเสริฐวิริยะกุล. (2539) **การศึกษาความแตกต่างของประชากรปลาสดในประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (สาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

องค์การสะพานปลา. (ม.ป.ป.) **สถิติราคาปลาน้ำจืดสดที่สะพานปลากรุงเทพมหานคร.** [ออนไลน์]
แหล่งที่มา : <http://www.fishmarket.co.th> (15 สิงหาคม 2556)

อนันต์ เคนท้าว และพรพิมล เจียรน้อยปรีเปรม. (2553) “การประยุกต์ใช้ระบบเครือข่ายโครงข่ายเพื่อ
ระบุกลุ่มประชากรทางการประมงด้วยเทคนิคมอโฟเมทรี หลายตัวแปร: กรณีศึกษาใน
กลุ่มประชากรปลาช่อน (*Channa striata*) จากแหล่งภูมิศาสตร์ที่ต่างกัน” **ในการประชุม
ทางวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา** ครั้งที่ 11. หน้า 619-630. ขอนแก่น :
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Amornsakun, T., Sriwatana, W. and Promkaew, P. (2004) “Some aspects in early life
stage of *Siameas gourami*, *Trichogaster pectoralis* (Regan) Larvae
Songklanakarinn” **Journal Science and Technology.** 26 (3) page 347-356.

Asensio, L. (2007) “PCR-based methods for fish and finisery products
authentication” **Trends Food Science and Technology.** 18 (11) page 558-
566

Asensio, L. et al. (2008) “Determination of food authenticity by enzyme-linked
immunosorbent assay (ELISA)” **Food Control.** 19 (1) page 1-8

Ballard, JWO. et al. (1992) “Evidence from 12S ribosomal RNA sequences that
onychophorans are modified arthropods” **Science.** 258 (5086) page 1345-
1348.

Berg, Leo S. (1947) “Classification of fishes, both recent and fossil” **Institute Zoology
Academy of Sciences.** 5 (2) page 87-517.

Black, WC. and Piesman, J. (1994) “Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari:
Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences” **Proceeding of the
National Academy of Sciences of the United States of America.** 91 (21)
page 10034- 10038

Bradley, RD. et al. (2007) “toward a molecular phylogeny for peromyscus: evidence
from mitochondrial cytochrome- b sequences” **Journal of Mammalogy.**
88 (5) page 1146-1159

- Bridge, D. et al. (1992) "Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure" **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 89 (18) page 8750-8753.
- Brown, WM. et al. (1982) "Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution" **Journal of Molecular Evolution**. 18 (4) page 225-239.
- Chen, K. et al. (1989) "Broad range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids" **FEMS Microbiology Letter**. 57 (1) page 19-24.
- Clarridge, JE. (2004) "Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases" **Clinical Microbiology Review**. 17 (4) page 840-862.
- Dubnau, D. et al. (1965) "Gene conservation in *Bacillus* species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies" **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 54 (2) page 491-498.
- Fahmida, I. (2002) "Mulletts of Korangi Creek, Karachi" **Rec Zoological Survey Pakistan**. 14 page 11-18.
- Filonzi, L. et al. (2010) "Molecular barcoding reveals mislabeling of commercial fish products in Italy" **Food Research International**. 43 page 1383-1388.
- Frati, F. et al. (1997) "Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in Collembola" **Journal of Molecular Evolution**. 44 (2) page 145-158.
- Granadeiro, JP. and Silva, MA. (2000) "The use of otoliths and vertebrae in the identification and size-estimation of fish in predator prey studies" **Cybium** 24 (4) page 383- 393.
- Gutell, RR. et al. (1993) "A compilation of large subunit (23S and 23S-like) ribosomal RNA structures" **Nucleic Acid Reserch**. 21 (13) page 3055-3074.
- Harrison, RG. (1989) "Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology" **Trends in Ecology and Evolution**. 4 page 6-11.

- Hubalkova, Z. et al. (2007) "Methods of gadoid fish species identification in food and their economic impact in the Czech Republic: a review" **Veterinary of Medicine**. 52 (7) page 273-292.
- Kambhampati, S., Kjer, KM. and Thorne, BL. (1996) "Phylogenetic relationship among termite families based on DNA sequence of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene" **Insect Molecular Biology**. 5 (4) page 229-238.
- Kochzius, M. et al. (2010) "Identifying Fishes through DNA Barcodes and Microarrays" **PLoS ONE**. 5(9) page 12620.
- Kvasnicka, F. (2005) "Capillary electrophoresis in food authenticity" **Journal of Separation Science**. 28 (9-10) page 813-825.
- Lin, WF., Shiao, CY and Hwang, DF. (2005) "Identification of Four *Thunnus* Tuna Species Using Mitochondrial Cytochrome *b* Gene Sequence and PCR-RFLP Analysis" **Journal of Food and Drug Analysis**. 13 (4) page 382-387.
- Liu, H. and Beckenbach, AT. (1992) "Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects" **Molecular Phylogenetic Evolution**. 1 page 41-52.
- Lockley, AK. and Bardsley, RG. (2000) "DNA-based methods for food authentication" **Trends Food Science Technology**. 11 page 67-77.
- Maretto, F. et al. (2007) "Finding 16S rRNA gene-based SNPs for the genetic traceability of commercial species belonging to Gadiformes" **Italian Journal of Animal Science**. 6 (1) page 161-163.
- Michelini, E. et al. (2007) "One-step triplex-polymerase chain reaction assay for the authentication of yellow fin (*Thunnus albacares*), bigeye (*Thunnus obesus*), and skipjack (*Katsuwonus pelamis*) tuna DNA from fresh, frozen, and canned tuna samples" **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 55 (19) page 7638-7647.

- Moritz, C. and Brown, WM. (1987) "Tandem duplications in animal mitochondrial DNAs: variation in incidence and gene content among lizards" **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 84 (20) page 7183-7187.
- Navajas, M. et al. (1998) "Species-wide homogeneity nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism" **Heredity**. 80 page 742-752.
- Persis, M. et al. (2009) "COI (cytochrome oxidase-I) sequence based studies of Carangid fishes from Kakinada coast, India" **Molecular Biology Reports**. 36 (7) page 1733-1740.
- Pierce, GJ. and Boyle, PR. (1991) "A review of methods for diet analysis in piscivorous marine mammals" **Oceanography and Marine Biology Annual Review**. 29 page 409-486.
- Pongthana, N., Prasertwiriyaikul, S. and Baoprasertkul, P. (1999) "**Population genetic structures of the Snakeskin gourami *Trichogaster pectoralis* (Regan, 1990) in Thailand**" Technical Paper No. 22 page 59. National Aquaculture Genetics Research Institute, Department of Fisheries: Thailand.
- Pongthana, N. (2001) Aquaculture genetics genetics research in Thailand. In M.V. Gupta and B.O. Acosta (eds.) Fish genetics research in member countries and institutions of the International Network on Genetics in Aquaculture. **ICLARM Conference Proceedings**. 64 page 77-89.
- Randi, E. et al. (2001) "Evolution of the mitochondrial DNA control-region and cytochrome *b* genes, and the inference of phylogenetic relationship in the avian genus *Lophura* (Galliformes)" **Molecular Phylogenetic and Evolution**. 19 page 187-201.

- Rehbein, H. (1990) "Electrophoretic techniques for species identification of fishery products" **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung Journal**. 191 (1) page 1-10.
- Ronaghi, M. (2001) "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing" **Genome Research**. 11 (1) page 3-11.
- Russo, CA., Takezaki, N. and Nei, M. (1996) "Efficiencies of different genes and different tree-building methods methods in recovering a known vertebrate phylogeny" **Molecular Biology and Evolution**. 13 (3) page 525-536.
- Stanton, JL. et al. (1994) "Sequences with the potential stem and-loop structures are associated with coding-region duplications in animal mitochondrial DNA" **Genetics**. 137 (1) page 233-241.
- Steinke, D., Zemplak, TS. and Hebert, PDN. (2009) "Barcoding Nemo: DNA –Base indentifications for the Ornamental fish trade" **PLoS ONE**. 4 (7) page 1-5.
- Strauss, RE. and Bond, CE. (1990) "**Taxonomic methods: morphology**. In: Schreck CB, Moyle PB (eds) *Methods for fish biology*" American Fisheries Society. page 109-140. Maryland : USA.
- Teletchea, F. (2009) "Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible application" **Review Fish Biology and Fisheries**. 19 page 265-293.
- Teletchea, T., Maudet, C. and Hanni, C. (2005) "Food and forensic molecular identification : update and challenges" **Trends Biotechnology**. 23 (7) page 359-366.
- Vos, P. et al. (1995) "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting" **Nucleic Acids Research**. 23 (21) page 4407-4414.
- Warrior, R. and Gall, J. (1985) "The mitochondrial DNA *Hydra attenuata* and *Hydra littoralis* consists of two linear molecules" **Archives of Science Geneve**. 38 page 439-445.

Woese, CR. (1987) "Bacterial evolution" **Microbiology Review**. 51 (2) page 221-271.

Wolstenholme, DR. (1992) "Animal mitochondrial DNA: structure and evolution"
International Review of Cytology. 141 page 173-216.

Zhang, AB. and Sota, T. (2007) "Nuclear gene sequences resolve species phylogeny and mitochondrial introgression in *Leptocarabus* beetles showing trans-species polymorphisms" **Molecular Phylogenetic and Evolution**. 45 (2) page 534-546.



ภาคผนวก ก
วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารเคมี

1.1 การเตรียม Tris-borate buffer (TBE buffer)

1.21 M Tris-base	10.80 กรัม
0.89 M Boric acid	5.50 กรัม
0.025 M EDTA pH 8	30.93 กรัม

นำส่วนประกอบต่าง ๆ ไปละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุลงในขวดฝาเกลียว ทำการปิดฝาเกลียวโดยคลายเกลียวให้หลวม และปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 การเตรียม EDTA ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 (50 mM EDTA pH 8)

ชั่ง Disodium Ethylenediamine tetraacetate – 2H₂O หนัก 18.61 กรัม ในน้ำกลั่น 100 ml คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันใส่ในบีกเกอร์ โดยใช้ Magnetic stirrer เติม NaOH เพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้พีเอช 8.0 ซึ่งเป็นพีเอช ที่ EDTA จะละลายหมดพอดี จากนั้นนำสารละลายบรรจุลงในขวดฝาเกลียว ทำการปิดฝาเกลียวโดยคลายเกลียวให้หลวม และปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 การเตรียม SDS ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (2% SDS)

ชั่ง SDS หนัก 2 กรัม นำไปละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายบรรจุลงในหลอดทดลองฝาเกลียว ทำการปิดฝาเกลียวโดยคลายเกลียวให้หลวม และปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 การเตรียม loading dry

ชั่ง Bromphenol blue หนัก 0.0005 กรัม เติม EDTA ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ จากนั้นเติม glycerol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บรรจุสารในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

1.5 การเตรียม Lysis buffer

เตรียมสำหรับ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสารเคมีต่าง ๆ ดังนี้

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)	0.788 กรัม
50 mM EDTA (pH8.0)	2.080 กรัม
3% Sodium dodecyl sulfate	3.000 มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบต่าง ๆ ไปละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุลงในขวด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.6 การเตรียมเจลสำหรับเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมถาดรองเจล (gel mould) วางบนพื้นเรียบ แล้วชั่งอะกาโรสหนัก 1.2 กรัม เติม 0.5X electrophoresis buffer (TBE) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำให้อะกาโรสละลายด้วยความร้อน แล้วทิ้งไว้ให้เย็นลงถึงประมาณ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเทอะกาโรสเจลลงในถาดรองเจลที่เตรียมไว้ พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วเสียบหวีลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดรองเจล รอให้เจลแข็งตัว หลังจากเจลแข็งตัวแล้วนำถาดไปวางใน electrophoresis tank เท buffer TBE ลงไปจนท่วมเจลให้ บัพเฟอร์ท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แล้วค่อย ๆ ดึงหวีออก

ภาคผนวก ข

1. ผลการทดสอบความแตกต่างของลักษณะสีฐานวิทยา 8 ลักษณะของพลาสติกใน 7 จังหวัด โดย One Way ANOVA ด้วยโปรแกรม Microsoft office Excel

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TT	Between Groups	25297.090	6	4216.182	27.278	.000
	Within Groups	128753.687	833	154.566		
	Total	154050.776	839			
TL	Between Groups	19038.831	6	3173.138	31.127	.000
	Within Groups	84917.497	833	101.942		
	Total	103956.328	839			
MT	Between Groups	9395.597	6	1565.933	804.919	.000
	Within Groups	1620.563	833	1.945		
	Total	11016.160	839			
HT	Between Groups	2251.743	6	375.291	40.381	.000
	Within Groups	7741.704	833	9.294		
	Total	9993.447	839			
ET	Between Groups	118.217	6	19.703	19.665	.000
	Within Groups	834.610	833	1.002		
	Total	952.827	839			
DT	Between Groups	16691.125	6	2781.854	90.893	.000
	Within Groups	25494.555	833	30.606		
	Total	42185.680	839			
PT	Between Groups	3482.697	6	580.449	40.313	.000
	Within Groups	11994.088	833	14.399		
	Total	15476.785	839			
WT	Between Groups	146896.852	6	24482.809	32.026	.000
	Within Groups	636791.328	833	764.455		
	Total	783688.180	839			

* $p > 0.05$ = ไม่มีความแตกต่าง

* $p < 0.05$ = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

2. ผลการทดสอบความแตกต่างจากการวัดจุด 8 จุด ของพลาสติกใน 7 จังหวัด โดย One Way ANOVA ด้วยโปรแกรม Microsoft office Excel

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
A	Between Groups	158.570	6	26.428	11.966	.000
	Within Groups	139.146	63	2.209		
	Total	297.716	69			
B	Between Groups	2254.862	6	375.810	13.208	.000
	Within Groups	1792.489	63	28.452		
	Total	4047.350	69			
C	Between Groups	2102.326	6	350.388	18.145	.000
	Within Groups	1216.540	63	19.310		
	Total	3318.866	69			
D	Between Groups	2274.713	6	379.119	24.952	.000
	Within Groups	957.209	63	15.194		
	Total	3231.922	69			
E	Between Groups	3380.956	6	563.493	7.208	.000
	Within Groups	4925.295	63	78.179		
	Total	8306.251	69			
F	Between Groups	5248.866	6	874.811	17.684	.000
	Within Groups	3116.579	63	49.470		
	Total	8365.445	69			
G	Between Groups	3818.529	6	636.422	10.247	.000
	Within Groups	3912.732	63	62.107		
	Total	7731.262	69			
H	Between Groups	19197.674	6	3199.612	41.345	.000
	Within Groups	4875.504	63	77.389		
	Total	24073.179	69			

* $p > 0.05$ = ไม่มีความแตกต่าง

* $p < 0.05$ = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ภาคผนวก ค

ประวัติย่อคณะผู้วิจัย

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาษาไทย	นางสาวพรพิมล กาญจนवास
ภาษาอังกฤษ	Miss Pornpimon Kanjanavas
ตำแหน่งปัจจุบัน	อาจารย์ประจำ กลุ่มวิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
สถานที่ทำงาน	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียว เฉลิมพระเกียรติ
ที่อยู่	254 พระยาสุเรนทร์ 21 ถนนพระยาสุเรนทร์ แขวงบางชัน เขต คลองสามวา จังหวัดกรุงเทพมหานคร
โทรศัพท์	083-9080717 หรือ 02-3126300 ต่อ 1256 E – mail address kanjanavas@hotmail.com

ผู้ร่วมวิจัย

1. ภาษาไทย นางสาวชุตานา คุณสุข
- ภาษาอังกฤษ Miss Chutapa Kunsook
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา
- สถานที่ทำงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพ
พรรณี
- ที่อยู่ 99/11 หมู่ 10 ตำบล ท่าช้าง อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี
22000
- โทรศัพท์ 089-9907360 หรือ 039-319111 ต่อ 8918

2. ภาษาไทย นางสาวอลิษา สุนทรวัฒน์
ภาษาอังกฤษ Miss Alisa Soontornwat
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ กลุ่มวิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์
ชีวภาพ
สถานที่ทำงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระ
เกียรติ
ที่อยู่ 53/10 ซอยติวานนท์ 20 ตำบลบางกระสอบ อำเภอเมือง จังหวัด
นนทบุรี
โทรศัพท์ 089-0203104 หรือ 02-3126300 ต่อ 1256
3. ภาษาไทย ผศ.สุภาภรณ์ วรรณภิญโญชีพ
ภาษาอังกฤษ Asst. Prof. Supaporn Wannapinyosheep
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ กลุ่มวิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์
ชีวภาพ
สถานที่ทำงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระ
เกียรติ
ที่อยู่ 555 หมู่ 1 ถนนรัตนราช ตำบลบางบ่อ อำเภอบางบ่อ จังหวัด
สมุทรปราการ 10560
โทรศัพท์ 0897671555 หรือ 02-3126300 ต่อ1256
4. ภาษาไทย รศ.ดร.เดชาวุธ นิตยสุทธิ
ภาษาอังกฤษ Assoc. Prof. Dr. Dechavudh Nityasuddhi
ตำแหน่ง อาจารย์ประจำ กลุ่มวิชาสถิติ สาขาวิชาคณิตศาสตร์และสถิติ
สถานที่ทำงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระ
เกียรติ
โทรศัพท์ 081-867-0675 หรือ 02-3126300

5. ภาษาไทย นางสาววิภาวรรณ วิทยกฤตศิริกุล
ภาษาอังกฤษ Miss Vipawan Vitayakritsirikul
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ กลุ่มวิชาชีวเคมี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์กายภาพ
สถานที่ทำงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระ
เกียรติ
ที่อยู่ 311 ซอยสหมิตร ถนนมหาพฤฒาราม บางรัก
กรุงเทพมหานคร
โทรศัพท์ 02-3126300

