ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP

Genetic Relationship among Guppy (*Poecilia reticulata*) Using AFLP Markers

สุไหลหมาน หมาดโหยด[1,2*] สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี[2] และ สุวรรณา ผลใหม่[3]
Sulaiman Madyod[1,2*] Suwit Wuthisuthimethavee[2] and Suwanna Phonmai[3]

บทคัดย่อ

การศึกษาด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลนับเป็นเทคโนโลยีที่มีความก้าวหน้าที่สุดในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ทั้งปลาที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค และปลาที่เลี้ยงเพื่อความสวยงาม การศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของสัตว์น้ำ นับเป็นเรื่องสำคัญอันดับแรกเพื่อให้การถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากที่เกิดขึ้นเป็นลักษณะที่ต้องการมากที่สุดและสมบูรณ์ที่สุด และสายพันธุ์ปลาที่นำมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ต้องไม่มาจากสายเลือดเดียวกัน

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาหางนกยูงที่มีการเลี้ยงทางการค้าโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP จำนวน 20 คู่ไพรเมอร์ ในสายพันธุ์ปลาหางนกยูงที่ใช้ศึกษาจำนวน 8 สายพันธุ์ คือ Mosaic, Tuxedo, Glass, Snake skin, Solid, Ribbon fin, Swallow fin และ Red-albino โดยผลการศึกษาพบว่ามีเครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP 16 คู่ ไพรเมอร์ที่ให้ผลชัดเจนที่ขนาด 100-500 คู่เบสในอกาโรส เจล และหลังจากนำไปวิเคราะห์ด้วย 5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และย้อมสีด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบแถบดีเอ็นเอมีจำนวนตั้งแต่ 41-82 แถบดีเอ็นเอ

---

[1] สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ตำบลถ้ำใหญ่ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

[1] Program in Fishery, Faculty of Agriculture, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Tamyai, Tungsong, Nakorn sri Thammarat 80110, Thailand.

[2] หน่วยวิจัยกุ้ง สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ตำบลไทยบุรี อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160

[2] Shrimp Research Unit, School of Agricultural Technology, Walailak University, Thaiburi, Thasala, Nakorn sri thammarat 80160, Thailand.

[3] สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ตำบลถ้ำใหญ่ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

[3] Program in Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Tamyai, Tungsong, Nakorn sri Thammarat 80110, Thailand.

[*] ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): smadyod@hotmail.com

ต่อคู่ไพรเมอร์ และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism band) จำนวน 18-50 แถบ ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ polymorphism อยู่ระหว่าง 25-69 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpc-V.1.8 พบว่าประชากรปลาหางนกยูงทั้ง 8 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันมาก โดยมีค่าระหว่าง 78-88 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ Glass, Red albino, Solid, Ribbon fin และสายพันธุ์ Snake skin และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ Mosaic, Swallow fin และสายพันธุ์ Tuxedo ผลการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่าในความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในปลาหางนกยูงทั้ง 8 สายพันธุ์ พบปลาหางนกยูงสายพันธุ์ Ribbon fin และสายพันธุ์ snake skin (cobra) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด

คำสำคัญ: ปลาหางนกยูง, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม, เครื่องหมายดีเอ็น AFLP

ABSTRACT

Molecular genetics, one of the most advanced technology involved for economic and consumer fish breeding as well as ornamental fish breeding. Genetic Closeness in fish investigated, was considered first priority topic to yield the most desirable characteristics and fish varieties to be investigated must not belong to the same inbred. The objective of this study aimed to investigate genetic relationship of guppy (*Poecilia reticulata*) was analyzed using 20 AFLP primer combinations in 8 strains consisting of Mosaic, Tuxedo, Glass, Snake skin, Solid, Ribbon fin, swallow fin and Red albino. Only between 100-500 base pair of 16 AFLP primer combinations were showed distinct results in agarose gel. And found polymorphic phylogenetic dendrogram by UPGMA using NTSYSpc program were Constructed. Average genetic similarity among strains varied from 78–88%. Phylogenetic analysis shows that the eighth strains could be divided into two major clades consisting of a group of Grass, Red albino, Solid, Ribbon fin, Cobra and a group of Mosaic, Swallow fin and Tuxedo. However, low genetic variation was found under numbers of markers used. This study also established AFLP technology as a feasible approach in trait identification of guppy.

Key words: Guppy, genetic relationship, AFLP markers

บทนำ

ปลาสวยงามเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ปัจจุบันประเทศไทยส่งออกปลาสวยงามเป็นอันดับที่ 7 ของโลก ในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมามูลค่าการซื้อขายปลาสวยงามในตลาดโลกมีอัตราการขยายตัวอยู่ในเกณฑ์สูงขึ้น โดยมูลค่าปลาสวยงามเพิ่มขึ้นจาก 40 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯในปี 2523 เป็นประมาณ 340 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯในปี 2551 มีผู้เลี้ยงปลาสวยงามในประเทศประมาณ 350,000 คน ในส่วนของร้านค้าปลาสวยงามทั่วประเทศมีอยู่ประมาณ 500 ร้าน ซึ่งร้อยละ 50 อยู่ในกรุงเทพฯและปริมณฑล ที่เหลือกระจายอยู่ในตามจังหวัดต่าง ๆ เช่น ราชบุรี เชียงใหม่ ภูเก็ต นครราชสีมา ขอนแก่น และอุดรธานี การขยายตัวของตลาดปลาสวยงามทำให้เกิดอาชีพการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามรายย่อยกระจายอยู่ทั่วประเทศ (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2551)

ในกลุ่มปลาสวยงามนั้นปลาหางนกยูงเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะในจังหวัดกรุงเทพฯ นครปฐม ราชบุรี และสมุทรสาคร (Ponpornpisit *et al*., 2003) ปลาเหล่านี้ส่วนหนึ่งจำหน่ายที่ตลาดกลางปลาสวยงามที่ตลาดจัตุจักรหรือที่ตลาดปลาอื่นๆ เช่น สหกรณ์ปลาสวยงามบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี เป็นต้น อีกส่วนหนึ่งส่งออกไปขายต่างประเทศ ประเทศที่สั่งซื้อปลาหางนกยูงจากประเทศไทย ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ประเทศในทวีปยุโรปและญี่ปุ่น

ปลาหางนกยูง เป็นปลาน้ำจืดขนาดเล็ก มีลักษณะเด่นคือ ลำตัว และครีบมีลวดลาย และสีสันหลากหลายรูปแบบ สวยสดสะดุดตา ครีบหางมีขนาดใหญ่มาก โดยเฉพาะในปลาหางนกยูงเพศผู้ ซึ่งนอกจากจะมีครีบหางที่ยาวเป็นพวง พริ้วแผ่กว้างสวยงามขณะว่ายน้ำ แล้วยังมีลักษณะรูปร่างของครีบหางที่แตกต่างกันออกไปหลายรูปแบบ ในประเทศไทยได้มีการนำเข้ามาตั้งแต่สมัยรัชกาลที่ 5 เป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โดยสามารถเลี้ยงรวมกันเป็นฝูงได้ และการเลี้ยงไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องให้ออกซิเจนเหมือนปลาชนิดอื่นๆ อีกทั้งมีการแพร่ขยายพันธุ์ได้ง่าย เนื่องจากเป็นปลาที่ปฏิสนธิภายในตัว และออกลูกเป็นตัว ปลาหางนกยูงที่มีความสวยงามจากประเทศเวเนซูเอลา บาร์บาโดส ทรินิแดด บราซิล และกิอานา ได้มีการเข้าไปดำเนินการเพาะพันธุ์และมีการคัดพันธุ์จนได้ปลาหางนกยูงที่มีความสวยงามหลายสายพันธุ์ ลักษณะเด่นที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ๆ คือลักษณะสีและลวดลายบนลำตัวและลวดลายบนครีบหางและรูปร่างของครีบหาง ซึ่งในการเรียกสายพันธุ์ต่างๆ จะถูกตั้งชื่อตามลักษณะดังกล่าว เช่น round tail, pin tail, spear tail, หรือ lace tail, sword tail, flag tail, lye tail, fan tail, triangle tail หรือ Delta tail, Veil tail นอกจากนี้สีสันและลวดลายก็นับเป็นจุดเด่นเช่นกัน ซึ่งมักจะใช้เป็นชื่อเรียกปลาสายพันธุ์นั้น เช่น บลูเยลโล โดยดูจากสีที่เด่นชัดที่สุด ส่วนลายบนลำตัวและครีบ ปลาที่มีลวดลายต่างๆ จะใช้ลายเป็นชื่อและตามด้วยลักษณะหาง หรืออาจใช้ลักษณะครีบหางเป็นชื่อก็ได้แล้วแต่ความนิยมของผู้เลี้ยง ถ้าหากสีที่ปรากฏไม่เห็นเป็นลวดลาย ก็จะให้สีที่เด่นสะดุดตาที่สุดบนตัวปลากับลักษณะครีบหางเป็นชื่อเรียกปลาแต่ละสายพันธุ์ เช่น yellow snake-skin fan tail หมายถึงสายพันธุ์ปลาหางนกยูงที่มีลำตัวและครีบหางเหลืองเป็นพื้นเด่นที่สุดในขณะเดียวกันจะมีลวดลายบนลำตัวและครีบลักษณะคล้ายหนังงูและมีครีบหางแบบรูปพัด red –lower sword tail หมายถึงปลาหางนกยูงที่มีสีเด่นบนลำตัวและครีบหางเป็นสีแดงและหางมีแบบก้าน

ครีบยื่นยาวที่ขอบล่างของครีบหาง เป็นต้น ลักษณะเหล่านี้จัดเป็นลักษณะทาง พันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากรุ่นพ่อแม่สู่รุ่นลูก ทั้งนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะใดเด่นกว่า ซึ่งอาจถูกข่มอีกลักษณะเอาไว้หรือปรากฏออกมาเท่าๆ กัน (ข่มไม่สมบูรณ์) (ธีรวุฒิ, 2549)

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลมาใช้ศึกษา และพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับลักษณะทางฟีโนไทป์ เครื่องหมายโมเลกุล AFLP เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้รับความนิยมมากเครื่องหมายหนึ่ง เนื่องจากสามารถทำให้เกิด Polymorphism ได้จำนวนมาก เหมาะสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ การศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง การจดทะเบียนพันธุ์ การตรวจสอบความเป็นลูกผสม การติดตามยีนและการทำแผนที่จีโนม เป็นต้น

ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมปลาหางนกยูงโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP ของงานวิจัยนี้ เพื่อการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในปลาหางนกยูง ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะช่วยคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาหางนกยูงที่ไม่เป็นปลาสายเลือดชิด ซึ่งจะช่วยให้การถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปในลักษณะที่ดีและสมบูรณ์ที่สุด

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการวิจัย

1.1 การเตรียมตัวอย่าง

คัดเลือกตัวอย่างปลาหางนกยูงจากตลาดค้าปลาสวยงามในกรุงเทพมหานคร จำนวน 8 สายพันธุ์ คือ Moscow full black, blue ribbon fin, Japan blue swallow, RREA full red, blue tuxedo, red grass, Spanish dancer, lace king cobra โดยใช้สายพันธุ์ละ 10 ตัวจากนั้นบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตามหลักเกณฑ์การกำหนดมาตรฐานสายพันธุ์ และเกณฑ์การตัดสินปลาหางนกยูงในประเทศไทยของกรมประมง (2550)

1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากลำตัวของปลาหางนกยูงตามวิธีการของ Wuthisuthimethavee (1999) โดยมีขั้นตอนคือ บดเนื้อเยื่อในสารละลาย Extraction buffer และ Proteinase K จากนั้นบ่มตัวอย่างในตู้ Hot air oven ที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) แล้วใช้ส่วนใสมาทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการเติมส่วนผสมของ Trapping Buffer ทิ้งให้ตกตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้เติมด้วย washing buffer และทำตะกอนให้แตกละลายกับน้ำ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงและเทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนสีขาว จากนั้นทำการล้างตะกอนด้วย 95% Ethanol นำไปปั่นเหวี่ยง เทส่วนใสทิ้งให้เหลือไว้เพียงตะกอนดีเอ็นเอที่อยู่ที่ก้นหลอด ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ดีดเบาๆ เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นละลาย แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และดูดส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสบนอกาโรสเจล 1 % เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λDNA) ปริมาณ 100, 300. 500 และ 700 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้น

pool DNA (รวม DNA) ของแต่ละสายพันธุ์ จำนวน 5 ตัวเข้าด้วยกันเป็น 1 ตัวอย่าง ดังนั้นจะมีตัวอย่างดีเอ็นเอที่จะนำไปวิเคราะห์สายพันธุ์ละ 2 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 16 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาทดสอบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP จำนวน 20 คู่ไพรเมอร์

1.4 การวิเคราะห์เครื่องหมาย AFLP

การวิเคราะห์เครื่องหมาย AFLP โดยดัดแปลงวิธีการของ Vos *et al*. (1995) โดยนำดีเอ็นเอที่จะทำการวิเคราะห์ (pool DNA) มาตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I และเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ *Eco*RI และ *Mse*I adapters จากนั้นนำผลผลิตที่ได้มาเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอในขั้นแรก (pre-amplification) ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ด้วยปฏิกิริยาทางพีซีอาร์ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ผลผลิตที่ได้จะเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (selective amplification) โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอ็นไซม์และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3’ จำนวน 20 คู่ไพรเมอร์ คือ *Eco*RI- CAG/ *Mse*I-AGA, *Eco*RI- CAG/ *Mse*I-ACT, *Eco*RI- CAG/ *Mse*I-AGT, *Eco*RI- CAG/ *Mse*I-AGC, *Eco*RI- CAA/ *Mse*I-AGA, *Eco*RI- CAA/ *Mse*I-ACT, *Eco*RI- CAA/ *Mse*I-AGT, *Eco*RI- CAA/ *Mse*I-AGC, *Eco*RI- CAA/ *Mse*I-ACG, *Eco*RI- CAA/ *Mse*I-ACC, *Eco*RI- CAC/ *Mse*I-AGA, *Eco*RI- CAC/ *Mse*I-ACT, *Eco*RI- CAC/ *Mse*I-AGT, *Eco*RI- CAC/ *Mse*I-AGC, *Eco*RI- CTA/ *Mse*I-AGT, *Eco*RI- CTA/ *Mse*I-AGC, *Eco*RI- CTA/ *Mse*I-AGA, *Eco*RI- CTA/ *Mse*I-ACT, *Eco*RI- CTA/ *Mse*I-ACG, *Eco*RI- CTA/ *Mse*I-ACC

1.5 เมื่อสิ้นสุดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (selective amplification) นำตัวอย่างที่ได้มาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide straining และตัวอย่างที่เหลือผสม loading buffer นำไปวิเคราะห์ด้วย 5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และย้อมสีด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์

นำแถบดีเอ็นเอ AFLP ที่ได้จากการวิเคราะห์ซึ่งอยู่ในรูปของแถบดีเอ็นเอมาแปลงให้อยู่ในรูปที่จะนำไปวิเคราะห์ โดยให้แถบดีเอ็นที่ปรากฏแถบเป็น ‘1’ และที่ไม่ปรากฏแถบเป็น ‘0’ ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ จากนั้นนำมาคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม โดยวิธี UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) ด้วยโปรแกรม NTSYSpc V. 1.8 (Rohlf, 1995) โดยใช้สูตรของ Jaccard (1900) หลังจากวิเคราะห์ผลแล้วจะแสดงผลในรูปของ phylogenetic tree ซึ่งเป็นการแสดงค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของปลาหางนกยูง

การจำแนกปลาหางนกยูงทั้ง 8 สายพันธุ์ ตามหลักเกณฑ์การกำหนดมาตรฐานสายพันธุ์ และเกณฑ์การตัดสินปลาหางนกยูงในประเทศไทยของกรมประมง (2550) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ปลาหางนกยูงที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อสายพันธุ์	มาตรฐานสายพันธุ์ (กรมประมง, 2550)	สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง
1. Solid (Moscow full black)	-ลำตัวจะมีสีน้ำเงินอมดำตามสายพันธุ์ตลอดลำตัว -ครีบหางไม่มีจุดหรือลวดลาย -ครีบหลังมีสีน้ำเงินอมดำสอดคล้องกับลำตัว	
2. Ribbon fin (blue ribbon fin)	-ลำตัวจะมีสีน้ำเงินเข้ม -ครีบทุกครีบยาว -ครีบหางยาวกว่าลำตัว	
3. Swallow fin (Japan blue swallow)	-ลำตัวมีสีฟ้าอ่อน -ครีบหางมีลวดลายตามสายพันธุ์ -ครีบหางมีลักษณะเป็นเส้น มองดูคล้ายครีบกร่อน เส้นของครีบหางมีตั้งแต่ 3, 4, 5, หรือ 6 เส้น	
4. Red albino (RREA full red high dorsal)	-ลำตัวมีสีแดงปกคลุมตลอดลำตัว -ตามีสีแดง -ครีบหางกว้าง และมีขนาดยาวกว่าลำตัว	
5. Tuxedo (blue tuxedo)	-ลำตัวจากบริเวณกึ่งกลางลำตัวไปสุดโคนหาง มีสีดำอมน้ำเงิน -ครีบหางไม่มีลวดลาย -ครีบหลังไม่มีลวดลาย	
6. Glass (red grass)	-ลำตัวมีลวดลายหลายสี เช่นเขียว น้ำเงิน เหลือง แดง ซึ่งเป็นลักษณะที่ปรับปรุงพันธุ์มาจากสายพันธุ์ธรรมชาติ -พื้นครีบหางมีสีอ่อน มีจุดหรือแต้มขนาดเล็กกระจายทั่วหาง มีสีแดง มากกว่าสีอื่น ตรงตามสายพันธุ์	

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ปลาหางนกยูงที่ใช้ในการทดลอง

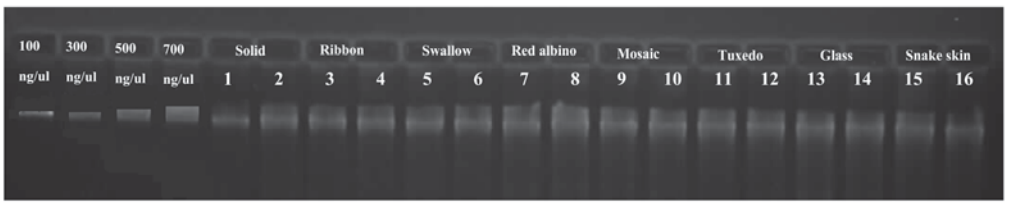
ชื่อสายพันธุ์	มาตรฐานสายพันธุ์ (กรมประมง, 2550)	สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง
7. Mosaic (Spanish dancer)	-ลำตัวมีลวดลายหลายสี ได้แก่ ดำ แดง เหลือง และเขียว -ครีบหางมีลวดลายแบบโมเสค โดยลวดลายจะมีลักษณะเป็นแต้มใหญ่ ส่วนใหญ่เป็นสีแดง เหลือง และน้ำเงิน -ครีบหลังมีสีและลวดลายสอดคล้องกับลำตัวและครีบหาง	
8. snake skin (cobra) (lace king cobra)	-ลำตัวมีจุดคล้ายหนังงู มีเหลืองปนเขียวตรงตามสายพันธุ์ -ครีบหาง และครีบหลังมีลวดลายสอดคล้องกับลำตัว และครีบหลังมีขนาดเล็กกว่าสายพันธุ์อื่น	

2. การสกัดดีเอ็นเอ

ในการทดลองครั้งนี้ได้สกัดดีเอ็นปลาหางนกยูงจากส่วนเนื้อเยื่อของลำตัวของปลาหางนกยูง และตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซีสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λDNA) ที่มีความเข้มข้น 100, 300, 500 และ 700 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 1)

3. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของรูปแบบหางในปลาหางนกยูงจำนวน 8 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค AFLP ซึ่งทำการคัดเลือกเครื่องหมาย (screen primers) จำนวน 20 คู่ ไพรเมอร์ พบเครื่องหมายที่ให้ผลชัดเจนที่ขนาดระหว่าง 100-500 คู่เบสในอกาโรส เจล ทั้งหมด 16 คู่ไพรเมอร์ และหลังจากนำไปวิเคราะห์ด้วย 5%

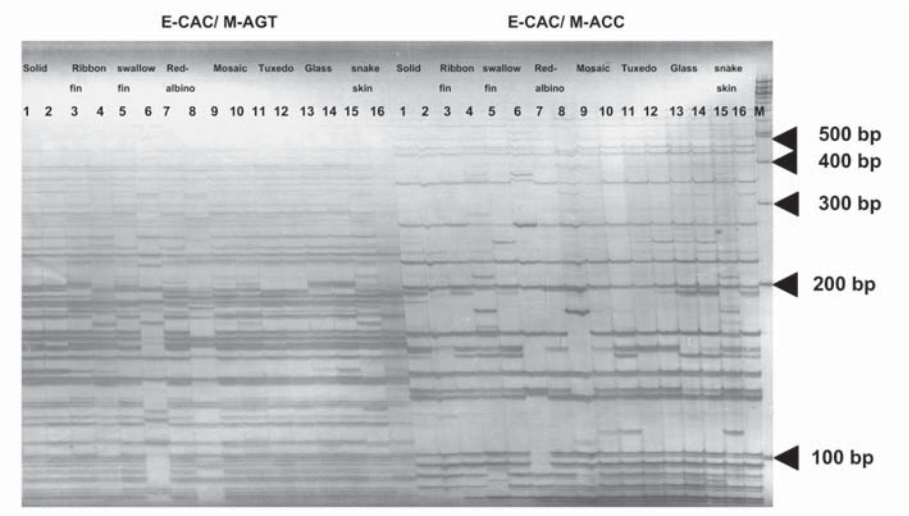


ภาพที่ 1 pool DNA ของปลาหางนกยูง ทั้ง 8 สายพันธุ์ จากการตรวจคุณภาพ และปริมาณด้วย agarose gel เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λDNA) ที่มีความเข้มข้น 100, 300, 500 และ 700 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (1-16 = ปลาหางนกยูงแต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง)

denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และย้อมสีด้วยซิลเวอร์ไนเตรท ทำการนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดระหว่าง 100-500 คู่เบส (ภาพที่ 2) พบจำนวนแถบดีเอ็นเอต่อคู่ไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 41-84 แถบ และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) อยู่ระหว่าง 18-50 แถบ ซึ่งคิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism อยู่ระหว่าง 25-69 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shen *et al*. (2007) ซึ่งวิเคราะห์เครื่องหมาย AFLP สำหรับสร้างแผนที่พันธุกรรมของปลาหางนกยูง ซึ่งพบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอประมาณ 50 - 60 ต่อคู่ไพรเมอร์

ตารางที่ 2 สรุปผลการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์

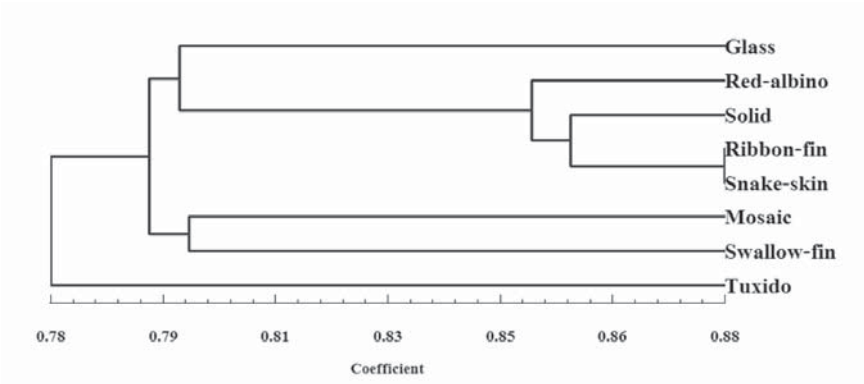
AFLP primers	**จำนวนแถบดีเอ็นที่นับได้**	**จำนวนแถบ polymorphism**	**เปอร์เซ็นต์ polymorphism**
*Eco*RI- CAG/ *Mse*I-AGA	82	50	61.0
*Eco*RI- CAG/ *Mse*I-ACT	61	33	54.0
*Eco*RI- CAG/ *Mse*I-AGT	58	40	69.0
*Eco*RI- CAA/ *Mse*I-AGA	67	35	52.2
*Eco*RI- CAA/ *Mse*I-ACT	74	40	54.1
*Eco*RI- CAA/ *Mse*I-AGT	53	29	54.7
*Eco*RI- CAA/ *Mse*I-AGC	41	18	43.9
*Eco*RI- CAA/ *Mse*I-ACG	49	43	87.8
*Eco*RI- CAA/ *Mse*I-ACC	78	48	61.5
*Eco*RI- CAC/ *Mse*I-AGA	60	23	38.3
*Eco*RI- CAC/ *Mse*I-ACT	59	20	33.9
*Eco*RI- CAC/ *Mse*I-AGT	84	22	26.2
*Eco*RI- CAC/ *Mse*I-AGC	76	36	47.4
*Eco*RI- CAC/ *Mse*I-ACC	55	22	40.0
*Eco*RI- CTA/ *Mse*I-AGT	73	18	24.7
*Eco*RI- CTA/ *Mse*I-AGC	76	47	61.9
Total	994.4	460.3	45.1



ภาพที่ 2 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอ AFLP ของปลาหางนกยูงที่ใช้ E-CAC/M-AGT และ ER-CAC/M-ACC (1-16 = ตัวอย่างปลาหางนกยูงที่ใช้ในการทดลอง M = molecular weight markers)

4. แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

จากการนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอมาคำนวณค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpc V. 1.80 (Rohlf, 1995) พบว่าเมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ Glass, Red albino, Solid, Ribbon fin และสายพันธุ์ Snake skin และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ Mosaic, Swallow fin และสายพันธุ์ Tuxedo ผลการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่าปลาหางนกยูงทั้ง 8 สายพันธุ์ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม โดยปลาหางนกยูงสายพันธุ์ Ribbon fin และสายพันธุ์ snake skin (cobra) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด (ภาพที่ 3) ส่วนค่าเฉลี่ยของดัชนีความเหมือน (S value) ของปลาหางนกยูงทั้ง 8 ชนิด อยู่ระหว่าง 75 % (สายพันธุ์ Ribbon fin และสายพันธุ์ Snake skin) ถึง 88% (สายพันธุ์ Glass และสายพันธุ์ Tuxedo) (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 3 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมปลาหางนกยูง 8 ชนิดที่สร้างด้วยวิธี UPGMA

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมของปลาหางนกยูง 8 สายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย AFLP จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์

	Glass	Mosaic	Swallow fin	Tuxedo	Red albino	Solid	Ribbon fin	Snake skin
Glass	1.0000000							
Mosaic	0.7915870	1.0000000						
Swallow fin	0.7734226	0.7982792	1.0000000					
Tuxedo	0.7543021	0.7848948	0.7629063	1.0000000				
Red albino	0.7982792	0.7925430	0.7934990	0.8049713	1.0000000			
Solid	0.7829828	0.7753346	0.7724665	0.7782027	0.8565966	1.0000000		
Ribbon fin	0.8154876	0.8001912	0.8030593	0.7743786	0.8489484	0.8757170	1.0000000	
Snake skin	0.7906310	0.8173996	0.8011472	0.7782027	0.8489484	0.8393881	0.8814532	1.000000

จากข้อมูลที่ได้พบว่าเครื่องหมาย AFLP มีความสามารถตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลได้ ซึ่งจะสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวน polymorphism ที่ตรวจพบ ในขณะที่จำนวนโครโมโซมของปลาหางนกยูงทั้งหมด 23 คู่ (Winge, 1922) ไม่สามารถบอกความหลากหลายได้โดยตรงเท่ากับระดับโมเลกุล (Srisamoot *et al*., 2007) การศึกษาครั้งนี้เป็นงานวิจัยแรกที่มีการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาหางนกยูงในระดับสายพันธุ์ (strain) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP สามารถบอกความสัมพันธ์ได้อย่างชัดเจน ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าปลาหางนกยูงทั้ง 8 สายพันธุ์มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมาก แม้ว่าจะเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการแยกความแตกต่างในระดับสายพันธุ์แล้วก็ตาม (Vos *et al*., 1995) อย่างไรก็ตาม Shen *et al*. (2007) กล่าวว่าหากมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Microsatellites ในปลาหางนกยูงจะให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงกว่า AFLP

สรุป

จากการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล AFLP เพื่อการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในปลาหางนกยูง จำนวน 20 คู่ไพรเมอร์ พบ 16 คู่ไพรเมอร์ที่ขนาดดีเอ็นเอ 100-500 คู่เบส โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 41-82 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และมีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่าง 18-50 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ polymorphism อยู่ระหว่าง 25-69 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpc-V.1.8 (Rohlf, 1995) พบว่าประชากรปลาหางนกยูงทั้ง 8 สายพันธุ์มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันมาก โดยมีค่าระหว่าง 78-88 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ Glass, Red albino, Solid, Ribbon fin และสายพันธุ์ Snake skin และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ Mosaic, Swallow fin และสายพันธุ์ Tuxedo ผลการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่าในความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของปลาหางนกยูงทั้ง 8 สายพันธุ์ พบปลาหางนกยูงสายพันธุ์ Ribbon fin และสายพันธุ์ snake skin (cobra) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ปลาหางนกยูงเพื่อการค้า โดยทุนอุดหนุนโครงการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2552 ของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ขอขอบพระคุณคณะผู้ช่วยวิจัยจากห้องปฏิบัติการอควาคัลเจอร์จีโนมิก หน่วยวิจัยกุ้ง สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือการวิเคราะห์จีโนมสัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2550. มาตรฐานสายพันธุ์และเกณฑ์การตัดสินปลาหางนกยูงในประเทศไทย. เอกสารเผยแพร่กรมประมง. กรุงเทพฯ.

ธีรวุฒิ เลิศสุทธิชวาล. 2549. **การปรับปรุงพันธุ์ปลาหางนกยูง.** จุลสารมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย นครศรีธรรมราช .

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. 2551. ปลาสวยงามปี ’51: ส่งออกขยายตัว 76.0% มูลค่าประมาณ 1,000 ล้านบาท. **วารสารกระแสทรรศน์** 14 (2272): 1-10.

Jaccard, P. 1900. Contribution au problème de l’ immigration post-glaciaire de la flore alpine. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles** 36: 87–130.

Ponpornpisit, A., Topanurak, S., and Tangtrongpiros, J. 2003. Survey of external parasitic infestation in Guppy (*poecilia reticulata*) selling at Sunday Market. **Thai Fisheries Gazette** 56: 571-577.

Rohlf, F.J. 1995. **NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 1.80**. Exeter Software, New York.

Shen, X., Yang, G., Liu, Y., Liao, M., Wang, X., Zhu, M., Song, W., Zou, G., Wei, Q., Wang, D., Chen, D. 2007. Construction of genetic linkage maps of Guppy (*Poecilia reticulata*) based on AFLP and microsatellite DNA markers. **Aquaculture** 271: 178–187.

Srisamoot, N., Chaveerach, A., Nuchadumrong, S., Sattayasai, N., Chaveerach, P., Tanomtong, A., and Pinthong, K. 2007. Genetic relationship among wild felidae in Thailand using AFLP markers. **Pakistan Journal of biological science** 10(16): 2639-2645.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., and Kuiper, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** 23(21): 4407–4414.

Winge, Ö. 1922. A peculiar mode of inheritance and its cytological explanation. **Journal of Genetics** 12**:** 137–144.

Wuthisuthimethavee, S. 1999. DNA marker technologies for biodiversity study in shrimp. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science. Kasetsart University.