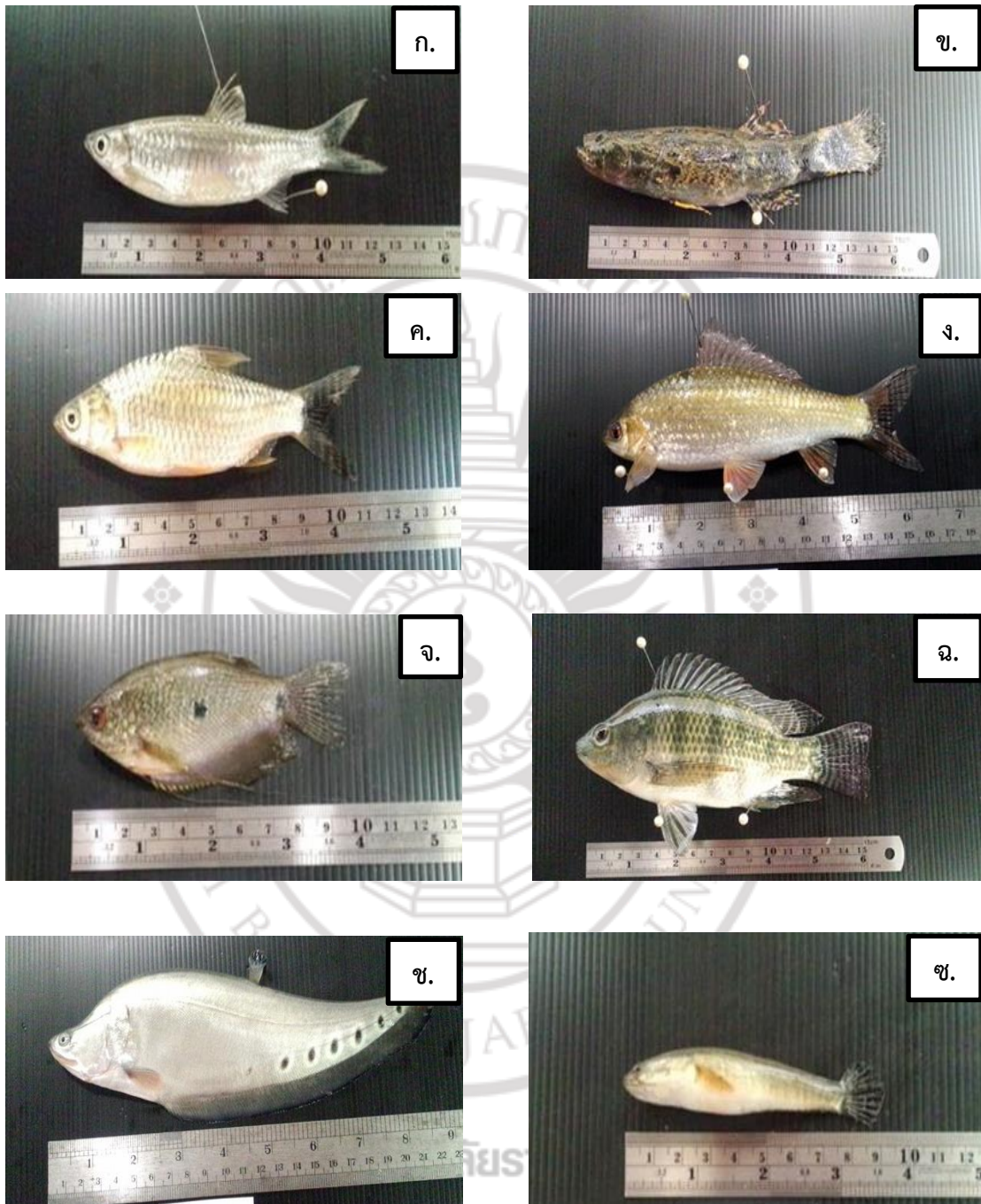


บทที่ 4 ผลการวิจัย

ผลการตรวจสอบชนิดของปลาตัวอย่างจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการเก็บตัวอย่างทั้ง 4 จุด ได้แก่ สะพานบ้านน้ำรัก คลองบ้านแก้ว สะพานกิจจานนท์ และสะพานเบญจมานุสรณ์ สามารถรวบรวมตัวอย่างได้จำนวนทั้งสิ้น 26 ตัวอย่าง ทำการจำแนกชนิดของปลาตัวอย่างในเบื้องต้น โดยใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้หนังสือสารานุกรมปลาไทยของสุรศักดิ์ วงศ์กิตติเวช (2543 : หน้า 50-170) และ เอกสารงานวิจัยของ สิทธิพัฒน์ แผ้วฉำ, สนธยา กุลกันยา และคณิศร ล้อมเมตตา (2551 : หน้า 1-60) ได้ผลการจัดจำแนกเป็นปลาจำนวน 26 ชนิด (ภาพที่ 4.1) ใน 16 วงศ์ (Family) ได้แก่ วงศ์ Cyprinidae มี 5 ชนิด คือ ปลาชีวกวาย (*Rasbora sumatrana*) ปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) ปลาชีวกหางดอก (*R. trilineata*) ปลาชีวกหางแดง (*R. borapetensis*) และปลาสร้อยนกเขา (*Osteochilus hasselti*) วงศ์ Osphronemidae มี 4 ชนิด คือ ปลากระตี่ (*Trichopodus* sp.) ปลากริม (*Trichopsis* sp.) ปลาแรด (*Osphronemus goramy*) และปลาสลิด (*T. pectoralis*) วงศ์ Channidae มี 3 ชนิด คือ ปลาช่อน (*Channa striata*) ปลากระสง (*C. lucius*) และปลาชะโด (*C. micropeltes*) วงศ์ Cichlidae มี 1 ชนิด คือ ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) วงศ์ Ambassidae มี 2 ชนิด คือ ปลาแป้นแก้ว (*Parambassis siamensis*) และปลาข้าวเม่า (*Ambassis nalu*) วงศ์ Eleotridae มี 1 ชนิด คือ ปลาปูทราย (*Oxyeleotris marmorata*) วงศ์ Notopteridae มี 1 ชนิด คือ ปลากราย (*Chitala ornata*) วงศ์ Hemiramphidae มี 1 ชนิด คือ ปลาเข็ม (*Dermogenys* sp.) วงศ์ Cobitidae มี 1 ชนิด คือ ปลารากกล้วย (*Acantopsis* sp.) วงศ์ Anabantidae มี 1 ชนิด คือ ปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) วงศ์ Scatophagidae มี 1 ชนิด คือ ปลาตะกรับ (*Scatophagus argus*) วงศ์ Gerreidae มี 1 ชนิด คือ ปลาดอกหมาก (*Gerres macracanthus*) วงศ์ Sparidae มี 1 ชนิด คือ ปลาคุด (*Acanthopagrus berda*) วงศ์ Siganidae มี 1 ชนิด คือ ปลาสลิดหิน (*Siganus javus*) วงศ์ Leiognathidae มี 1 ชนิด คือ ปลาแป้นเขียว (*Gazza minuta*) และวงศ์ Pristolepididae มี 1 ชนิด คือ ปลาหมอข้างเหยียบ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างของปลาที่ใช้ในการศึกษา จำนวน 26 ชนิด

- | | |
|------------------|------------------|
| ก. ปลาชิวควาย | ข. ปลานุ่ทราย |
| ค. ปลาคะเพียนขาว | ง. ปลาสร้อยนกเขา |
| จ. ปลากระดี่ | ฉ. ปลานิล |
| ช. ปลาทราย | ซ. ปลาช่อน |



ภาพที่ 4.1 (ต่อ)

ฅ. ปลาหมอช้างเหยียบ

ญ. ปลาแป้นแก้ว

ฎ. ปลาซิวหางแดง

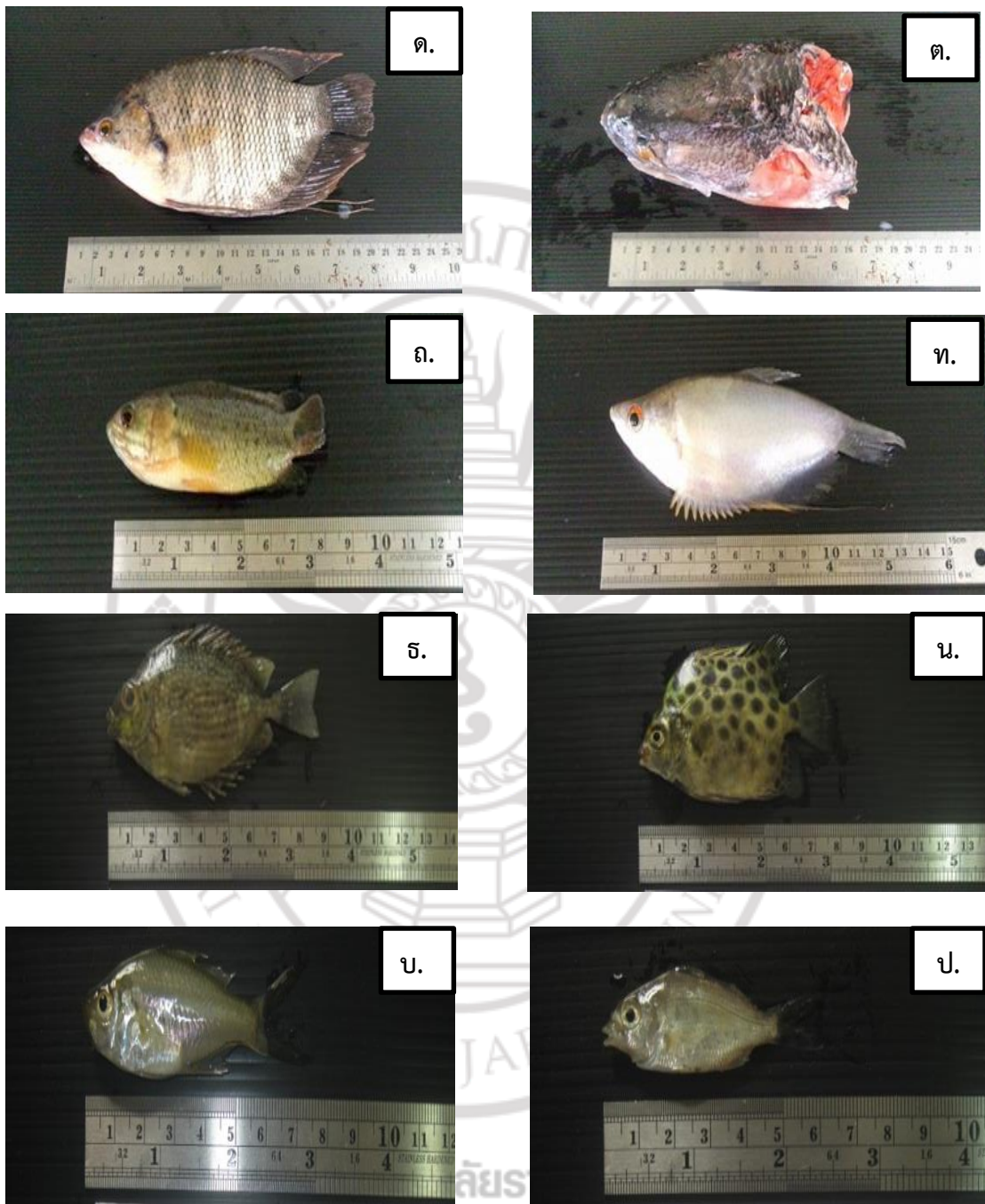
ฒ. ปลาเข็ม

ญ. ปลากระสง

ฏ. ปลาซิวหางดอก

ฑ. ปลากริม

ณ. ปลารากกล้วย



ภาพที่ 4.1 (ต่อ)

- | | |
|------------------|---------------|
| ด. ปลาแรด | ค. ปลาชะโด |
| ฉ. ปลาหมอไทย | ท. ปลาสลิด |
| ธ. ปลาสลิดหิน | น. ปลาตะกรับ |
| บ. ปลาแป้นเขี้ยว | ป. ปลาดอกหมาก |



ภาพที่ 4.1 (ต่อ)

ผ. ปลาแคต

ผ. ปลาข้าวเม่า

ตาราง 4.1 ผลการตรวจสอบชนิดปลาโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	รหัสตัวอย่าง
Cyprinidae	<i>Rasbora sumatrana</i>	ปลาชิวควาย	F-01
	<i>Barbonymus gonionotus</i>	ปลาตะเพียนขาว	F-03
	<i>R. trilineata</i>	ปลาชิวหางดอก	F-11
	<i>R. borapetensis</i>	ปลาชิวหางแดง	F-12
	<i>Osteochilus hasselti</i>	ปลาสร้อยนกเขา	F-15
Osphronemidae	<i>Trichopodus</i> sp.	ปลากระตี่	F-04
	<i>Trichopsis</i> sp.	ปลากริม	F-13
	<i>Osphronemus goramy</i>	ปลาแรด	F-17
	<i>Trichopodus pectoralis</i>	ปลาสลิด	F-20
Channidae	<i>Channa striata</i>	ปลาช่อน	F-07
	<i>C. lucius</i>	ปลากระสง	F-09
	<i>C. micropeltes</i>	ปลาชะโด	F-18
Cichlidae	<i>Oreochromis niloticus</i>	ปลานิล	F-05
Ambassidae	<i>Parambassis siamensis</i>	ปลาแป้นแก้ว	F-10
	<i>Ambassis nalua</i>	ปลาข้าวเม่า	F-21
Eleotridae	<i>Oxyeleotris marmorata</i>	ปลาบุ้ทราย	F-02
Notopteridae	<i>Chitala ornata</i>	ปลากทราย	F-06
Hemiramphidae	<i>Dermogenys</i> sp.	ปลาเข็ม	F-14
Cobitidae	<i>Acantopsis</i> sp.	ปลารากกล้วย	F-16
Anabantidae	<i>Anabas testudineus</i>	ปลาหมอไทย	F-19
Scatophagidae	<i>Scatophagus argus</i>	ปลาตะกรับ	F-23

ตาราง 4.1 (ต่อ)

วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	รหัสตัวอย่าง
Gerreidae	<i>Gerres macracanthus</i>	ปลาดอกหมาก	F-25
Sparidae	<i>Acanthopagrus berda</i>	ปลาคูด	F-26
Siganidae	<i>Siganus javus</i>	ปลาสลิดหิน	F-22
Leiognathidae	<i>Gazza minuta</i>	ปลาแป้นเขียว	F-24
Pristolepididae	<i>Pristolepis fasciata</i>	ปลาหมอข้างเหยียบ	F-08

หมายเหตุ : F ของรหัสตัวอย่าง ย่อมาจาก Fish หมายถึง ปลา

ผลการสกัดดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างเนื้อปลาจำนวน 26 ชนิด ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini kit (Flavogen, Taiwan) และตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างได้ทั้งหมด (ตารางที่ 4.1) ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพค่อนข้างดี แต่มีปริมาณน้อย โดยสังเกตจากการปรากฏแถบดีเอ็นเอบาง ๆ เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่อง UV Transilluminator (ไม่แสดงผล) จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR และนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) เป็นลำดับต่อไป (ตารางที่ 4.2)

ตาราง 4.2 ผลการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

รหัสตัวอย่าง	ชนิดของปลา	ผลการทดลอง		
		สกัด DNA	PCR	Sequencing
F-01	ปลาชีวกาย	√	√	√
F-02	ปลาบุทราย	√	√	√
F-03	ปลาตะเพียนขาว	√	√	√
F-04	ปลากระดี	√	√	√
F-05	ปลานิล	√	√	√
F-06	ปลากราย	√	√	√
F-07	ปลาช่อน	√	×	×
F-08	ปลาหมอข้างเหยียบ	√	√	√
F-09	ปลากระสง	√	×	×
F-10	ปลาแป้นแก้ว	√	×	×
F-11	ปลาชีวหาดอก	√	√	√
F-12	ปลาชีวหาดง	√	√	√

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ชนิดของปลา	ผลการทดลอง		
		สกัด DNA	PCR	Sequencing
F-13	ปลากริม	√	×	×
F-14	ปลาเข็ม	√	√	√
F-15	ปลาสร้อยนกเขา	√	×	×
F-16	ปลารากกล้วย	√	×	×
F-17	ปลาแรด	√	√	√
F-18	ปลาชะโด	√	×	×
F-19	ปลาหมอไทย	√	√	√
F-20	ปลาสลิด	√	√	√
F-21	ปลาข้าวเม่า	√	√	√
F-22	ปลาสลิดหิน	√	×	×
F-23	ปลาตะกรับ	√	×	×
F-24	ปลาแป้นเขี้ยว	√	×	×
F-25	ปลาดอกหมาก	√	√	√
F-26	ปลาคุด	√	×	×

หมายเหตุ: เครื่องหมาย √ หมายถึง ได้ผลการทดลอง
 เครื่องหมาย × หมายถึง ไม่ได้ผลการทดลอง

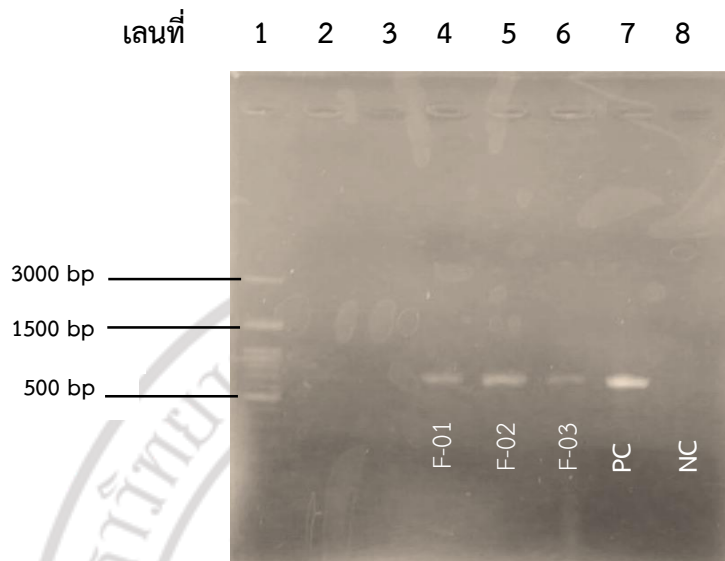
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนไซโตโครม ออกซิเดส วัน (COI) ด้วยเทคนิค PCR

เมื่อนำดีเอ็นเอของตัวอย่างปลาทั้งหมดมาเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน COI ด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 15 ชนิด โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ภาพที่ 4.2-4.5) จากคู่ไพรเมอร์ FishBarCO1-1L/FishBarCO1-1H, FishF1/FishR2, FishBarCO1-1L/FishR2 และ FishF2/ FishBarCO1-1H (ตารางที่ 4.3) และเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ พบว่าแต่ละตัวอย่างมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน COI ต่าง ๆ กัน อยู่ในช่วง 643-790 คู่เบส (ตารางที่ 4.3)

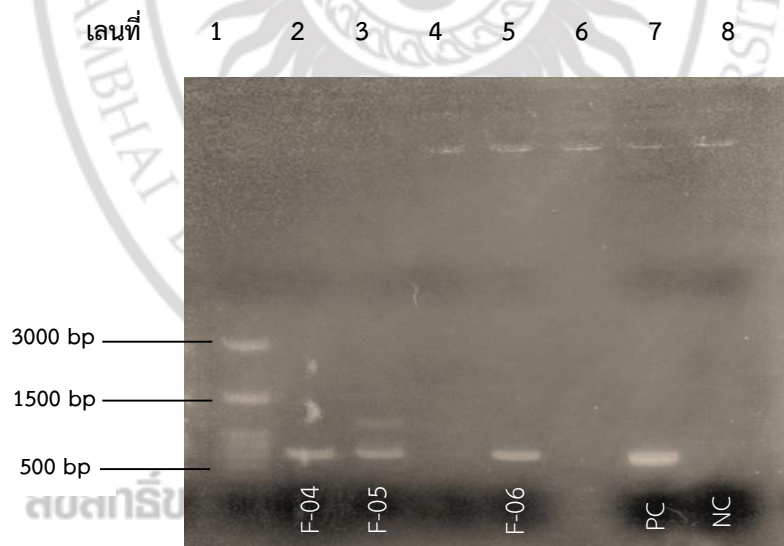
ตารางที่ 4.3 โพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR แล้วสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน COI และความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน COI ของปลาแต่ละตัวอย่าง

ชนิดปลาจากการจัดจำแนกจากลักษณะทางสัณฐาน	โพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR		ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (bp)
	โพรเมอร์ Forward	โพรเมอร์ Reverse	
ปลาชิวควาย (<i>Rasbora sumatrana</i>)	FishF1	FishR2	645
ปลาบู่ทราย (<i>Oxyeleotris marmorata</i>)	FishBarCO1-1L	FishBarCO1-1H	782
ปลาตะเพียนขาว (<i>Barbonymus gonionotus</i>)	FishF1	FishR2	663
ปลากระดี่ (<i>Trichopodus sp.</i>)	FishBarCO1-1L	FishBarCO1-1H	769
ปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i>)	FishBarCO1-1L	FishBarCO1-1H	790
ปลากราย (<i>Chitala ornata</i>)	FishBarCO1-1L	FishBarCO1-1H	713
ปลาหมอช้างเหยียบ (<i>Pristolepis fasciata</i>)	FishBarCO1-1L	FishBarCO1-1H	777
ปลาชิวหางดอก (<i>R. trilineata</i>)	FishF1	FishR2	643
ปลาชิวหางแดง (<i>R. borapetensis</i>)	FishF1	FishR2	675
ปลาเข็ม (<i>Dermogenys sp.</i>)	FishBarCO1-1L	FishR2	700
ปลาแรด (<i>Osphronemus goramy</i>)	FishBarCO1-1L	FishBarCO1-1H	765
ปลาหมอไทย (<i>Anabas testudineus</i>)	FishF2	FishBarCO1-1H	767
ปลาสลิค (<i>T. pectoralis</i>)	FishBarCO1-1L	FishBarCO1-1H	743
ปลาข้าวเม่า (<i>Ambassis nalua</i>)	FishF1	FishR2	691
ปลาดอกหมาง (<i>Gerres macracanthus</i>)	FishBarCO1-1L	FishR2	701

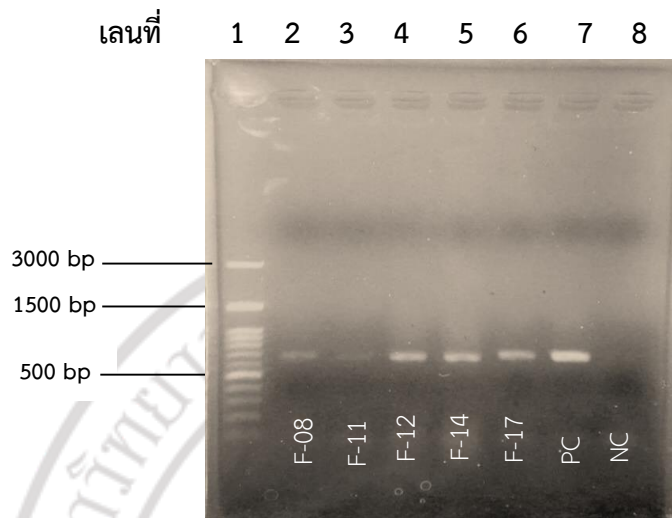
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



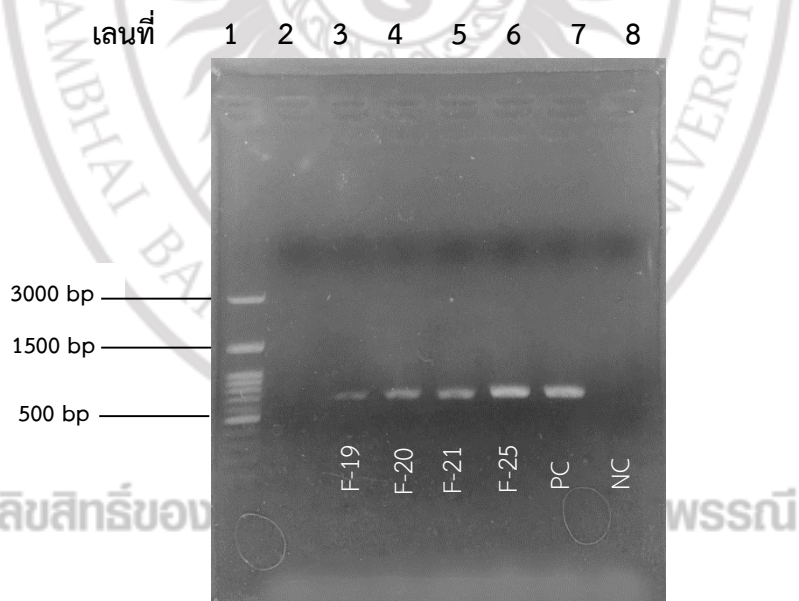
ภาพที่ 4.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ของตัวอย่างรหัส F-01, F-02 และ F-03
 เลนที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder เลนที่ 4: F-01 เลนที่ 5: F-02 เลนที่ 6: F-03 เลนที่ 7: PC (Positive control) เลนที่ 8: NC (Negative control)



ภาพที่ 4.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ของตัวอย่างรหัส F-04, F-05 และ F-06
 เลนที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder เลนที่ 2: F-04 เลนที่ 3: F-05 เลนที่ 5: F-06 เลนที่ 7: PC (Positive control) เลนที่ 8: NC (Negative control)



ภาพที่ 4.4 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ของตัวอย่างรหัส F-08, F-11, F-12, F-14 และ F-17
 เลนที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder เลนที่ 2: F-08 เลนที่ 3: F-11 เลนที่ 4: F-12 เลนที่ 5: F-14 เลนที่ 6: F-17 เลนที่ 7: PC (Positive control) เลนที่ 8: NC (Negative control)



ภาพที่ 4.5 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ของตัวอย่างรหัส F-19, F-20, F-21 และ F-25
 เลนที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder เลนที่ 3: F-19 เลนที่ 4: F-20 เลนที่ 5: F-21 เลนที่ 6: F-25 เลนที่ 7: PC (Positive control) เลนที่ 8: NC (Negative control)

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI

จากตัวอย่างปลา 26 ชนิด ได้ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน COI และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 15 ชนิด เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank และ BOLD พบว่า มีจำนวน 14 ชนิด ที่ให้ผลสอดคล้องกันทั้ง 2 ฐานข้อมูล โดยมีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสูงถึง 98-100% และมี 1 ตัวอย่างที่ให้ผลการระบุชนิดไม่สอดคล้องกัน โดยระบุชนิดเป็นปลาเข็มหม้อ *Dermogenys siamensis* และ *D. pusilla* ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD โดยมีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) ทั้งนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI สำหรับ *D. siamensis* ยังไม่มีรายงานในฐานข้อมูล BOLD ผลจากการศึกษาในครั้งนี้จึงสามารถเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาชนิดนี้ในฐานข้อมูล BOLD ได้

ตารางที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างปลา จำนวน 15 ชนิด กับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank และ BOLD

รหัส ตัวอย่าง	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank และ BOLD (% Similarity)			
	GenBank	BOLD	GenBank Accession No.	ชื่อสามัญ
F-01	<i>Rasbora sumatrana</i> (100%)	<i>Rasbora sumatrana</i> (100%)	NC031542	ปลาชีวกวาย
F-02	<i>Oxyeleotris marmorata</i> (100%)	<i>Oxyeleotris marmorata</i> (100%)	KF711995	ปลาบุ้ทราย
F-03	<i>Barbonymus gonionotus</i> (99%)	<i>Barbonymus gonionotus</i> (100%)	AB238966	ปลา ตะเพียนขาว
F-04	<i>Trichopodus trichopterus</i> (99%)	<i>Trichopodus trichopterus</i> (100%)	KU569061	ปลา กระดี่หม้อ
F-05	<i>Oreochromis aureus</i> (100%)	<i>Oreochromis aureus</i> (100%)	GU370125	ปลาหมอ เทศข้างลาย
F-06	<i>Chitala ornata</i> (100%)	<i>Chitala ornata</i> (100%)	AP008923	ปลากRAY
F-08	<i>Pristolepis fasciata</i> (99%)	<i>Pristolepis fasciata</i> (100%)	KT001055	ปลาหมอ ข้างเหยียบ
F-11	<i>Rasbora trilineata</i> (100%)	<i>Rasbora trilineata</i> (100%)	NC025336	ปลาชีว หางดอก
F-12	<i>Rasbora borapetensis</i> (99%)	<i>Rasbora borapetensis</i> (99%)	HM224221	ปลาชีว หางแดง
F-14	<i>Dermogenys siamensis</i> (99%)	<i>Dermogenys pusilla</i> (98%)	MG563669	ปลา เข็มหม้อ

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

รหัส ตัวอย่าง	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank และ BOLD (% Similarity)			
	GenBank	BOLD	GenBank Accession No.	ชื่อสามัญ
F-17	<i>Osphronemus goramy</i> (99%)	<i>Osphronemus goramy</i> (98.94%)	KU984978	ปลาแรด
F-19	<i>Anabas testudineus</i> (99%)	<i>Anabas testudineus</i> (99.84%)	KJ808811	ปลา หมอไทย
F-20	<i>Trichopodus microlepis</i> (99%)	<i>Trichopodus microlepis</i> (100%)	KU569059	ปลากระดี่ นาง
F-21	<i>Ambassis nalua</i> (99%)	<i>Ambassis nalua</i> (99.84%)	KY371127	ปลาข้าวเม่า
F-25	<i>Gerres macracanthus</i> (98%)	<i>Gerres macracanthus</i> (98.88%)	KC970387	ปลา ดอกหมาก

โดยสามารถจำแนกปลาทั้ง 15 ชนิด ออกเป็น 8 กลุ่มใหญ่ คือ ปลาในอันดับ (Order) Cypriniformes, Gobiiformes, Anabantiformes, Cichliformes, Osteoglossiformes, Beloniformes, Ovalentaria และ Gerreiformes อันดับ Cypriniformes พบมี 1 วงศ์ (Family) ได้แก่ วงศ์ Cyprinidae ประกอบด้วยปลาชิวควาย ปลาตะเพียนขาว ปลาชิวหางดอก และปลาชิวหางแดง อันดับ Gobiiformes มี 1 วงศ์ คือ Eleotridae ได้แก่ ปลาบู่ทราย อันดับ Anabantiformes ประกอบด้วย 3 วงศ์ คือ วงศ์ Osphronemidae ได้แก่ ปลากระดี่หม้อ ปลาแรด และปลากระดี่นาง วงศ์ Pristolepididae ได้แก่ ปลาหมอช้างเหยียบ และวงศ์ Anabantidae ได้แก่ ปลาหมอไทย อันดับ Cichliformes พบ 1 วงศ์ คือ Cichlidae ได้แก่ ปลาหมอเทศ ช้างลาย อันดับ Osteoglossiformes พบ 1 วงศ์ คือ Notopteridae ได้แก่ ปลากราย อันดับ Beloniformes พบ 1 วงศ์ คือ Zenarchopteridae ได้แก่ ปลาเข็มหม้อ อันดับ Ovalentaria พบ 1 วงศ์ คือ Ambassidae ได้แก่ ปลาข้าวเม่า และอันดับ Gerreiformes พบ 1 วงศ์ คือ Gerreidae ได้แก่ ปลาดอกหมาก

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี