ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดปลาวงศ์เสือตอ

DNA barcoding for identification of fish species in family Datnioididae

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์[1*,2] และ นนทรี ปานพรหมมินทร์[3]

Dutrudi Panprommin[1*,2] and Nontree Panprommin[3]

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome c oxidase I (COI) หรือดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาวงศ์เสือตอ (Datnioididae) จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ปลาเสือตอลายใหญ่ (*Datnioides pulcher*) ปลาเสือตอลายเล็ก (*D. undecimradiatus*) ปลาเสือตอลายคู่ (*D. microlepis*) และปลากะพงลาย (*D. polota*) พบว่า ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาทั้ง 4 ชนิดมีความยาวอยู่ในช่วง 621-636 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตต่างๆ พบว่า ปลาทั้ง 4 ชนิดนี้ยังไม่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ทั้งในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD ทำให้สามารถเพิ่มข้อมูลในฐานข้อมูลทั้งสองได้ และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI สามารถแยกปลาแต่ละชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน และสามารถแยกปลาวงศ์นี้ออกจากปลาวงศ์อื่นที่ใกล้เคียงกันได้อีกด้วย

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ยีน Cytochrome c oxidase I, การจำแนก, ปลาวงศ์เสือตอ

ABSTRACT: The aim of this study was to determine the patterns of COI sequence (DNA barcoding) of four fish species in family Datnioididae including *Datnioides pulcher*, *D. undecimradiatus*, *D. microlepis* and *D. polota*. The length of COI sequence ranged from 621 to 636 bp. The sequences COI gene of the four species had not been reported in GenBank and BOLD database. The phylogenetic analysis was shown that the COI sequence can be used to separate these four species and family from each others. The results indicated that the COI gene is an efficiency tool to identify fish species in family Datnioididae.

Keywords: DNA barcoding, Cytochrome c oxidase I, Identification, Family Datnioididae

บทนำ

ปลาในวงศ์เสือตอ (Datnioididae) มีเพียงสกุลเดียวเท่านั้น คือ *Datnioides* ประกอบด้วยปลา 5 ชนิด ได้แก่ ปลาเสือตอลายใหญ่ *D. pulcher* (Kottelat, 1998) ปลาเสือตอลายเล็ก *D. undecimradiatus* (Roberts & Kottelat, 1994) ปลาเสือตอลายคู่ *D. microlepis* (Bleeker, 1854) ปลาเสือตอปาปัวนิวกินี

[1] สาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000
Fisheries, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการ การอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900

[3] สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ กรมประมง ปทุมธานี 12120
Aquatic Plant and Ornamental Fish Research Institute, Department of Fisheries, PathumThani 12120

* Corresponding author: dutrudeep@yahoo.com

D. campbelli (Whitley, 1939) และปลากะพงลาย *D. polota* (Hamilton, 1822) ซึ่งในอดีตปลาเสือตอมีชื่อวิทยาศาสตร์เพียงชื่อเดียวคือ *Coius microlepis* แต่ต่อมาในปี ค.ศ.1994 ได้พบปลาชนิดใหม่คือ ปลาเสือตอลายเล็ก จึงมีชื่อเรียกว่า *C. undecimradiatus* ในปี ค.ศ.1998 ได้แยกปลา *C. microlepis* ออกเป็นปลาเสือตอลายใหญ่ *C. pulcher* พบได้ในประเทศไทยและกัมพูชา และ *C. microlepis* พบได้ในประเทศอินโดนีเซีย จนถึงปัจจุบัน Kottelat (2000) ได้เปลี่ยนสกุลของปลาในวงศ์เสือตอจาก *Coius* เป็น *Datnioides*

ปลาวงศ์เสือตอเป็นกลุ่มของปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็มทางแถบภูมิภาคเอเชียใต้จนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีลักษณะเด่นคือ ลำตัวแบนข้าง ปากยาว สามารถยืดหดได้ มีลายแถบดำพาดขวางลำตัว 5-7 แถบตามชนิดของปลา ชอบลอยตัวอยู่นิ่งๆ ตามตอไม้และพรรณไม้น้ำเพื่อจับเหยื่อ จึงถูกเรียกว่า “ปลาเสือตอ” ปัจจุบันปลาเสือตอบางชนิดได้สูญพันธุ์ไปจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยแล้ว คือ ปลาเสือตอลายใหญ่ (โกศล, ม.ป.ป.) ซึ่งในอดีตพบชุกชุมในบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ แต่เนื่องจากเนื้อมีรสชาติดี จึงถูกจับขึ้นมาบริโภคเป็นจำนวนมาก ในปัจจุบันปลาเสือตอชนิดนี้จึงถูกจัดเป็นปลาที่เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ.2535 แต่เนื่องจากปลาเสือตอชนิดต่างๆ มีลักษณะรูปร่างภายนอกที่ใกล้เคียงกันมาก ทำให้ยากต่อการจำแนกชนิด ประกอบกับปลาเสือตอลายใหญ่ซึ่งจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองที่ควบคุมการล่า การครอบครอง การเพาะพันธุ์ การค้า ตลอดจนการนำเข้าและส่งออก จึงมีความจำเป็นต้องจำแนกชนิดของปลาเหล่านี้ ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาใช้ร่วมในการจำแนกชนิดของปลา ได้แก่ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่นิยมใช้ ได้แก่ ยีน cytochrome c oxidase I (COI) เป็นยีนที่อยู่บนไมโตคอนเดรีย มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส (Hebert et al., 2003) ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีลักษณะเป็นเอกลักษณ์เฉพาะในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันเท่านั้น และแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ อย่างชัดเจน จึงสามารถใช้ตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิต แม้ว่าตัวอย่างที่ได้มานั้นไม่สมบูรณ์หรืออยู่ในระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ของพัฒนาการ เช่น ไข่ ลูกปลาวัยอ่อน หรือลูกปลาวัยรุ่นได้เป็นอย่างดี (Pegg et al., 2006; Ko et al., 2013) ในปัจจุบันมีการศึกษาการใช้ยีนนี้ในการจำแนกชนิดของปลา ได้แก่ ปลาในประเทศออสเตรเลีย (Ward et al., 2005) ปลาการ์ตูน (Steinke et al., 2009) ปลาชิว (ดุจฤดี และคณะ, 2556) ปลาเศรษฐกิจในแม่น้ำปิง (ประภาส และดุจฤดี, 2556) เป็นต้น

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดปลาวงศ์เสือตอ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ปลาเสือตอลายใหญ่ ปลาเสือตอลายเล็ก ปลาเสือตอลายคู่ และปลากะพงลาย ซึ่งข้อมูลที่ได้จะรวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาต่อไป

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างปลาและการสกัดดีเอ็นเอจากครีบปลาตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างปลาเสือตอลายใหญ่ (*D. pulcher*) ปลาเสือตอลายเล็ก (*D. undecimradiatus*) ปลาเสือตอลายคู่ (*D. microlepis*) และปลากะพงลาย (*D. polota*) ชนิดละ 5 ตัวอย่าง จากร้านค้าปลาสวยงาม จากนั้นนำตัวอย่างปลาที่ได้ไปจำแนกชนิดโดยใช้คู่มือวิเคราะห์พันธุ์ปลา (Kottelat, 1998; Nelson, 2006; Rainboth, 1996) และผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้าน แล้วนำไปแช่ในขวดพลาสติกที่มีเอทานอลบริสุทธิ์ จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอจากครีบของปลาตัวอย่างด้วยวิธี Phenol-chloroform extraction (Sambrook and Russell, 2001) และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี 1% agarose gel electrophoresis (Sambrook and Russell, 2001)

การเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยปฏิกิริยา PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยมีปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH_2O ปริมาตร 18.75 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาตร 2.25 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร, 0.01 mM COI primers ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 0.05 mM dNTPs ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 0.625 U *Taq* DNA Polymerase และดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาตร 0.5-2 ไมโครลิตร (Ward et al., 2005) และมีสภาวะการทำงานทั้งหมด 35 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จากการศึกษาของ Ward et al. (2005) (**Table 1**)

Table 1 Gene specific primers used for amplification COI gene of four fish species in *Datnioides*.

Primer names	Sequences from 5' to 3'
FishF1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC
FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA
FishR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA

Source: Ward et al. (2005)

จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan) และตรวจสอบคุณภาพโดยวิธี 1% agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิต PCR ที่บริสุทธิ์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยใช้ Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul et al., 1990) และ BOLD (Barcode of Life Data System; http://www.boldsystems.org) ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาแต่ละชนิดของปลาวงศ์เสือตอด้วยโปรแกรม ClustalW (Thomson et al., 1994) ศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ภายในและระหว่างชนิด ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007) และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการสกัดดีเอ็นเอจากครีบปลาด้วยวิธี Phenol-chloroform extraction แล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี มีแถบขนาดใหญ่ที่ชัดเจนปนเปื้อนด้วยโปรตีนและอาร์เอ็นเอเล็กน้อย (**Figure 1A**) สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน COI ต่อไปได้ด้วยปฏิกิริยา PCR ได้ผลผลิตที่มีขนาดประมาณ

650 คู่เบส (**Figure 1B**) และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาแต่ละชนิดด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่า ปลาวงศ์เสือตอทั้ง 4 ชนิดนี้มีความยาวของยีนไม่เท่ากัน โดยมีความยาวอยู่ในช่วง 621-636 คู่เบส (**Table 2**) ซึ่งมีความยาวสั้นกว่าที่มีรายงานในการศึกษาอื่นๆ ที่ผ่านมา เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการตรวจหาลำดับ นิวคลีโอไทด์เพียงทิศทางเดียวเท่านั้น คือ ทิศทางด้านปลาย 5' ของผลผลิต โดยใช้ไพรเมอร์ FishF1 และ FishF2 ในขณะที่การศึกษาของ Ward et al. (2005) เป็นการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้านของผลผลิต คือ ทิศทางทั้งด้านปลาย 5' และ 3' โดยใช้ไพรเมอร์ FishF1, FishF2, FishR1 และ FishR2 ทำให้ได้ยีนที่มีความยาวมากกว่า คือ 655 คู่เบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ Accession number KF753753-KF753772 (**Table 2**)

จากการศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ภายในชนิดเดียวกันของปลาวงศ์เสือตอด้วยโปรแกรม MEGA พบว่า ปลาทุกชนิดไม่มีความแตกต่างภายในชนิด ยกเว้นปลากะพงลายที่มีค่าความแตกต่างเท่ากับ 0.002 (**Table 2**) เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวด้วยโปรแกรม Genetyx (Genetyx Corp., Japan) พบว่า มีการแทนที่เบส (base substitution) จำนวน 2 ตำแหน่ง (เบส A เป็น C และเบส T เป็น A) และเบสดังกล่าวไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนในขบวนการแปลรหัส (Translation) ยังคงได้กรดอะมิโนชนิดเดียวกัน

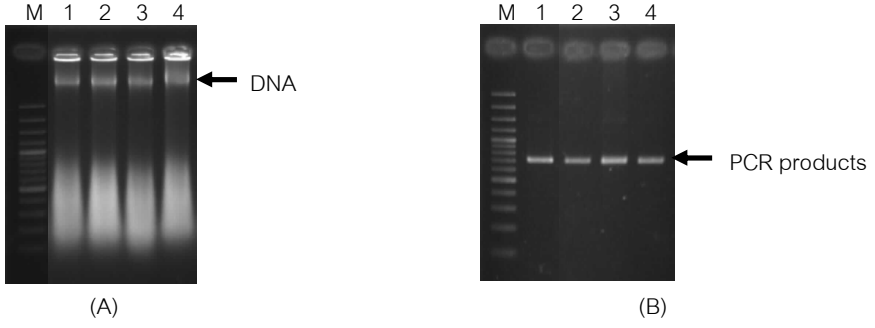

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of DNA (A) and PCR products (B) from *D. pulcher*, *D. undecimradiatus*, *D. microlepis* and *D. polota* (Lane 1-4). 100 bp DNA ladder was used as a marker (Lane M)

Table 2 Summary of COI sequences of four fish species in *Datnioides*

Species	Thai name	No. of samples	Sequences Length (bp)	Genetic distance	Accession number
D. pulcher	ปลาเสือตอลาย	5	627	0.000	KF753753-KF753757
D.	ใหญ่	5	630	0.000	KF753758-KF753762
undecimradiatus	ปลาเสือตอลายเล็ก	5	636	0.000	KF753763-KF753767
D. microlepis	ปลาเสือตอลายคู่	5	621	0.002	KF753768-KF753772
D. polota	ปลากะพงลาย				

เมื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ระหว่างชนิดของปลาวงศ์เสือตอทั้ง 4 ชนิด ด้วยโปรแกรม MEGA พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลากะพงลายต่างจากปลาเสือตอทั้งสามชนิด โดยมีค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.135, 0.150 และ 0.150 ในปลาเสือตอลายใหญ่ ปลาเสือตอลายเล็ก และปลาเสือตอลายคู่ ตามลำดับ ในขณะที่ปลาเสือตอลายเล็กและปลาเสือตอลายคู่มีความแตกต่างกันน้อยที่สุด โดยมีค่า 0.002 (**Table 3**)

Table 3 Genetic distance between the four fish species in *Datnioides*

	D. pulcher	*D. undecimradiatus*	*D. microlepis*
D. pulcher			
D. undecimradiatus	0.018		
D. microlepis	0.020	0.002	
D. polota	0.135	0.150	0.150

การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาวงศ์เสือตอ จำนวน 4 ชนิด กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD โดยพิจารณาจากค่า % similarity พบว่า ในฐานข้อมูลทั้งสองยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาทั้ง 4 ชนิด แสดงว่าในปัจจุบันนี้ยังไม่มีการศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาทั้ง 4 ชนิดนี้ ทำให้สามารถเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในฐานข้อมูลทั้งสองนี้ได้

นอกจากนี้ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ปลาเสือตอลายใหญ่ ปลาเสือตอลายเล็ก และปลาเสือตอลายคู่ มีความเหมือนกับปลา *Monotaxis grandoculis* มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นปลาที่อยู่ในอันดับเดียวกันคือ Perciformes สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลากะพงลายจะเหมือนปลากะพงดำ (*Lobotes surinamensis*) มากที่สุด มีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนอกจากจะเป็นปลาที่อยู่ในอันดับ Perciformes เดียวกันแล้ว ปลากะพงลายและปลากะพงดำยังเคยถูกจัดให้อยู่ในวงศ์เดียวกันอีกด้วย คือ Lobotidae โดยปลากะพงลายเคยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lobotes hexazona* (Bleeker, 1850) แต่ปัจจุบันได้ถูกแยกออกมาอยู่ในวงศ์ Datnioididae (Fishbase; http://www.fishbase.org/) ซึ่งผลจากการศึกษานี้เป็นการยืนยันว่าปลากะพงลายไม่ควรจัดอยู่ในวงศ์ Lobotidae เพราะมีค่าความคล้ายคลึงน้อยมาก (85 เปอร์เซ็นต์) ซึ่ง Wong and Hanner (2008) กล่าวว่าสิ่งมีชีวิตหนึ่งจะเป็นสิ่งมีชีวิตตามที่รายงานในฐานข้อมูลได้ต้องมีค่าความคล้ายคลึงมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาในสกุล *Datnioides* จำนวน 4 ชนิด โดยการสร้าง Phylogenetic tree และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาในสกุล *Lobotes* จำนวน 2 ชนิด เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI สามารถแยกปลาทั้ง 4 ชนิดในสกุล *Datnioides* ออกจากปลาในสกุล *Lobotes* ได้อย่างชัดเจน (**Figure 2**) ซึ่งเป็นการยืนยันว่าปลาทั้งสองสกุลนี้อยู่ต่างกลุ่มกัน นอกจากนี้ยังพบว่า ปลาวงศ์เสือตอทั้ง 4 ชนิดยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของปลากะพงลาย และกลุ่มของปลาเสือตอทั้ง 3 ชนิด เนื่องจากปลากะพงลายมีลักษณะภายนอกแตกต่างจากปลาเสือตอชนิดอื่นๆ

อย่างชัดเจน ได้แก่ จำนวนก้านครีบหลังและก้นที่น้อยกว่า (13-14 และ 8-9) จำนวนเกล็ดที่เส้นข้างลำตัวน้อยกว่า (40-70) และจำนวนซี่เหงือกที่มากกว่า (20-23) (โกศล, ม.ป.ป.) และยังพบว่าปลาเสือตอลายเล็กและปลาเสือตอลายคู่ยังมีความใกล้ชิดกันมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ระหว่างชนิดของปลาวงศ์เสือตอ (Table 3) แต่อย่างไรก็ตามการจัดตามอนุกรมวิธานพบว่า ปลาเสือตอลายคู่มีความใกล้ชิดกับปลาเสือตอลายใหญ่มากกว่าปลาเสือตอลายเล็ก ดังนั้นการจำแนกชนิดปลาวงศ์เสือตอทั้ง 4 ชนิดนี้ควรใช้ยีนอื่นๆ เช่น 12S ribosomal RNA, 16S ribosomal RNA, cytochrome b มาใช้ร่วมในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

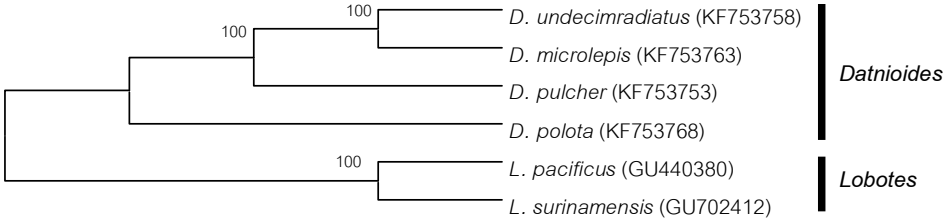

Figure 2 Phylogenetic tree of COI sequences from the four fish species of *Datnioides*. *L. pacificus* and *L. surinamensis* were used as an out group species

สรุป

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกชนิดปลาวงศ์เสือตอทั้ง 4 ชนิด และแยกความแตกต่างของปลาแต่ละชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน รวมทั้งสามารถใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้อีกด้วย ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะถูกรวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยพะเยา ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการกลาง สถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

โกศล ศรีพุฒินิพนธ์. ม.ป.ป. ชนิดพันธุ์ปลาเสือตอ. สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด กรมประมง. http://www.fisheries.go.th/if-center/web2/images/diversity/datnioides.pdf. ค้นเมื่อ 5 ตุลาคม 2556.

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์, บุษบง ศรีอ่อนคง และนนทรี ปานพรหมมินทร์. 2556. การจำแนกชนิดปลาชิววงศ์ย่อย Rasborinae 12 ชนิด โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด. แก่นเกษตร 41(ฉบับพิเศษ 1):459-465.

ประภาส ยมเกิด และดุจฤดี ปานพรหมมินทร์. 2556. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาเศรษฐกิจ 5 ชนิดในแม่น้ำปิง จังหวัดตาก. วารสารนเรศวรพะเยา 6(1):64-70.

Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.

Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, and J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B 270:313-321.

Ko, H.-L., Y.-T. Wang, T.-S. Chiu, M.-A. Lee, M.-Y. Leu, K.-Z. Chang, W.-Y. Chen, and K.-T. Shao. 2013. Evaluating the accuracy of morphological identification of larval fishes by applying DNA barcoding. PLoS ONE 8(1):e53451. doi:10.1371/journal.pone.0053451

Kottelat, M. 1998. Fishes of the Nam Theun and Xe Bangfai basin, Laos, with diagnoses of twenty-two new species (Teleostei: Cyprinidae, Balitoridae, Cobitidae, Coiidae and Odontobutidae). Ichthyol. Explor. Freshwater. 9:1-128.

Kottelat, M. 2000. The type species of the genus-group names *Coius* Hamilton, 1822 and *Datnia* Cuvier, 1829 and the type-genus of the family-group name *Datnioididae* Bleeker, 1858. J. South Asian Nat. Hist. 5(1):91-94.

Nelson, J.S. 2006. Fishes of the world. Fourth edition. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Pegg, G.G., B. Sinclair, L. Briskey, and W.J. Aspden. 2006. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. Scientia Marina 70S2:7-12.

Rainboth, W.J. 1996. Fish of the Cambodian Mekong. Department of Biology and Microbiology. University of Wisconsin Oshkosh, Wisconsin.

Sambrook, J., and D.W. Russell. 2001. Molecular cloning; A laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Steinke, D., S.Z. Tyler, and P.D.N. Hebert. 2009. Barcoding nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. Plos one 4(7):1-5.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol. 24:1596-1599.

Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680.

Ward, R.D., T.S. Zemlak, B.H. Innes, P.R. Last, and P.D.N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Phil. Trans. R. Soc. B:1-11.

Wong, E.H.K., and R.H. Hanner. 2008. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. Food Research International 41:828-837.