

การศึกษาบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลาสกุล *Oryzias* และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ
ของ *O. minutillus* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย

ปริญญานิพนธ์
ของ
สินัย สมิตธิคุณานนท์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มีนาคม 2553

การศึกษาบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลาสกุล *Oryzias* และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ
ของ *O. minutillus* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย

ปริญญานิพนธ์
ของ
สินัย สมิตธิคุณานนท์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มีนาคม 2553
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลาสกุล *Oryzias* และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ
ของ *O. minutillus* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย

บทคัดย่อ
ของ
สินัย สมิตธิคุณานนท์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มีนาคม 2553

สินชัย สมิตธิคุณานนท์. (2553). การศึกษาบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลาสกุล *Oryzias* และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *O. minutillus* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย. ปรินญาณพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร มากตุ่น, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ.

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *Oryzias minutillus*, *O. mekongensis*, *O. javanicus*, *O. dancena* และ *O. celebensis* พบ 3 domain ที่สำคัญได้แก่ domain I พบ termination-associated sequence (TAS) และ extended termination-associated sequence (ETAS) ใน domain II พบ central conserved sequence block 3 บริเวณ (CSB-F, CSB-E, CSB-D) และ domain III พบ conserved sequence block 3 บริเวณ (CSB1, CSB2, CSB3) ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย (domain II และ III) ของ *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด และใช้ *Cololabis saira* เป็น outgroup พบว่า *O. javanicus* และ *O. dancena* มีความใกล้ชิดกัน (BS = 100%) โดยมี *O. minutillus* เป็น sister group และในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *O. minutillus* จาก 11 แหล่งในประเทศไทยและจาก 1 แหล่งในประเทศกัมพูชา โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย (domain I) และใช้ *O. dancena* และ *O. celebensis* เป็น outgroup พบว่า *O. minutillus* จากทั้ง 12 แหล่ง สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 clade ที่สำคัญได้แก่ clade I (BS = 100%) ประกอบด้วย *O. minutillus* จากกลุ่มน้ำโดนเลสาบ (สุรินทร์ สระแก้ว และประเทศกัมพูชา) และจากกลุ่มน้ำภาคใต้ฝั่งตะวันออก (สงขลา และนครศรีธรรมราช) และ clade II (BS = 100%) ประกอบด้วย *O. minutillus* จากกลุ่มน้ำเจ้าพระยา (สุพรรณบุรี นครสวรรค์ สระบุรี และพระนครศรีอยุธยา) จากกลุ่มน้ำเพชรบุรี (เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์) และจากกลุ่มน้ำโขงตอนบน (เชียงราย) ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแสดงแนวโน้มในการจัดกลุ่ม *O. minutillus* ที่สอดคล้องกับรูปแบบของโครโมโซมกลุ่ม primitive type (clade I) และกลุ่ม developed type (clade II)

STUDIES OF THE MITOCHONDRIAL CONTROL REGION IN *ORYZIAS* AND
PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF *O. MINUTILLUS* USING NUCLEOTIDE
SEQUENCES OF THE PARTIAL MITOCHONDRIAL CONTROL REGION

AN ABSTRACT
BY
SINOTAI SMITTHIKUNANON

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Biology
at Srinakharinwirot University
March 2010

Sinotai Smitthikunanon. (2010). *Studies of the mitochondrial control region in Oryzias and phylogenetic relationships of O. minutillus using nucleotide sequences of the partial mitochondrial control region*. Master thesis, M.S. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Wichian Magtoon, Assist. Prof. Dr. Achariya Rangsiruji.

A study of the entire mitochondrial control region sequences from *Oryzias minutillus*, *O. mekongensis*, *O. javanicus*, *O. dancena* and *O. celebensis* revealed three important domains. Domain I consists of the termination-associated sequence (TAS) and extended termination-associated sequence (ETAS). Domain II contains three central conserved sequence blocks (CSB-F, CSB-E, CSB-D) and domain III comprises three conserved sequence blocks (CSB1, CSB2, CSB3). A phylogenetic study based on the mitochondrial control region (domains II and III) of these five *Oryzias* species using *Cololabis saira* as outgroup revealed a close relationship between *O. javanicus* and *O. dancena* (BS = 100%) with *O. minutillus* as a sister group. A study of phylogenetic relationships based on nucleotide sequences of the partial mitochondrial control region (domain I) of *O. minutillus* from 11 localities in Thailand and one locality from Cambodia using *O. dancena* and *O. celebensis* as outgroup revealed two important clades. Clade I (BS = 100%) comprises *O. minutillus* from Tonle Sap basin (Surin, Sakaeo and Cambodia) and from the eastern Peninsula basin (Songkhla and Nakhon Si Thammarat). Clade II (BS = 100%) consists of *O. minutillus* from Chao Phraya basin (Suphanburi, Nakorn Sawan, Saraburi and Ayutthaya), Phetchaburi basin (Phetchaburi and Prachuapkhirikhan) and upper Mekong basin (Chiang Rai). The results of phylogenetic study showed a tendency to classify *O. minutillus* according to their patterns of chromosomes as primitive type (clade I) and developed type (clade II).

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาบริเวณควบคุมไนโมโทคอนเดรียของปลาสกุล *Oryzias* และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ
ของ *O. minutillus* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมไนโมโทคอนเดรีย
ของ

สินิตย์ สมิตธิคุณานนท์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่.....เดือน เมษายน พ.ศ. 2553

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ประธาน

..... ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร มากตุ่น)

(รองศาสตราจารย์ ธวัช ดอนสกุล)

..... กรรมการ

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รั้งศิริจิ)

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร มากตุ่น)

..... กรรมการ

(ดร. อภิชาติ เต็มวิษชากร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รั้งศิริจิ)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์
จาก
งบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2552

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร มากตุ่น ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รั้งศิริจิ กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ แนะนำจนสำเร็จได้เป็นอย่างดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ. ธวัช ดอนสกุล และ ดร. อภิชาติ เต็มวิชาวกร กรรมการสอบปริญญานิพนธ์ ตลอดจนอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้และคำแนะนำแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาที่ศึกษาและทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณสุชีวรรณ บินชัย และคุณวิลาวัลย์ คำศรี ที่กรุณาให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาเทคนิคต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนความรู้ความสามารถที่ผู้วิจัยได้ซึมซับและนำมาประยุกต์ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คุณจิรวัฒน์ ผลเพิ่มพูน คุณณณท์ ผาณิตวงศ์ คุณละอองดาว ที่ฆาววงศ์ คุณพิงนภา ไกรชุมพล คุณสุนิดา อัญจิระโรจน์ คุณอุษา ผาสุข และคุณหทัยทิพย์ สุขสดใส คุณเบญจวิสา เรืองวารี สำหรับน้ำใจที่มีค่ายิ่ง อีกทั้งความช่วยเหลือต่างๆ ที่ผู้วิจัยได้รับทั้งทางตรงและทางอ้อม

คุณค่าและประโยชน์อันพึงได้รับจากการวิจัยในครั้งนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนบูรพาจารย์ ที่ให้การศึกษาอบรมสั่งสอน ให้สติปัญญาและคุณธรรมอันเป็นเครื่องชี้นำความสำเร็จในชีวิต

สินทัย สมิตธิคุณานนท์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
สมมติฐานในการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
สัณฐานวิทยาปลาสกุล <i>Oryzias</i> และการจำแนกชนิด.....	4
ชีววิทยาและการแพร่กระจายของปลาสกุล <i>Oryzias</i> ที่ใช้ในการศึกษา.....	8
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสกุล <i>Oryzias</i>	10
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ <i>Oryzias minutillus</i>	11
การศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลของปลาสกุล <i>Oryzias</i>	15
DNA ในไมโทคอนเดรียและบริเวณควบคุม.....	16
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
การเก็บตัวอย่างที่ศึกษา.....	21
การศึกษาด้านสัณฐานวิทยาและการระบุชนิด.....	22
อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา.....	22
วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ.....	25
อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา.....	25
วิธีดำเนินการวิจัย.....	26

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง.....	32
การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา.....	32
ลักษณะสัณฐานวิทยาบางประการของ <i>Oryzias</i> 5 ชนิด.....	33
การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุล.....	34
การสกัด DNA และการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย ด้วยเทคนิค PCR.....	34
การเพิ่มปริมาณ DNA บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย ด้วยเทคนิค PCR.....	35
การโคลนชิ้น PCR product เข้าสู่พลาสมิด.....	36
ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย.....	37
การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ <i>Oryzias</i> 5 ชนิด.....	39
การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ <i>O. minutillus</i>	44
 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	 51
 บรรณานุกรม.....	 55
 ภาคผนวก.....	 61
 ประวัติย่อผู้วิจัย.....	 64

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 กลุ่มรูปแบบโครโมโซมของปลาสกุล <i>Oryzias</i>	10
2 จำนวนและรูปแบบโครโมโซมของ <i>Oryzias minutillus</i>	12
3 ชนิดของปลา <i>Oryzias</i> และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง.....	21
4 ไพร์เมอร์สำหรับการทำ PCR และ DNA sequencing.....	26
6 ค่าการวัดและนับส่วนต่างๆ ของ <i>Oryzias</i> ทั้ง 5 ชนิด.....	34
7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเอกลักษณ์ของ <i>Oryzias</i> 5 ชนิด.....	38
8 จำนวนนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ <i>Oryzias</i> 5 ชนิด.....	39

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ลักษณะภายนอกและส่วนต่างๆ ของ <i>Oryzias latipes</i>	4
2 ลักษณะภายนอกของ <i>O. minutillus</i>	6
3 ลักษณะภายนอกของ <i>O. mekongensis</i>	6
4 ลักษณะภายนอกของ <i>O. javanicus</i>	7
5 ลักษณะภายนอกของ <i>O. dancena</i>	8
6 ลักษณะภายนอกของ <i>O. celebensis</i>	8
7 จำนวนโครโมโซม (2n) ของ <i>O. minutillus</i> และแหล่งที่เก็บตัวอย่างในประเทศไทย	13
8 ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งของแอลโลไซม์ของ <i>O. minutillus</i> ในประเทศไทย.....	14
9 Phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน tyrosinease, 12S rDNA และ 16S rDNA สำหรับ <i>Oryzias</i> 13 ชนิด และสกุล <i>Xenopoecilus</i> 2 ชนิด.....	15
10 โครงสร้างของ DNA ในไมโทคอนเดรียของปลา.....	17
11 DNA ในไมโทคอนเดรียของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และโครงสร้างของบริเวณควบคุม	18
12 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลา <i>Oryzias latipes</i> โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย.....	20
13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของปลาสกุล <i>Oryzias</i>	22
14 ตำแหน่งการจับของ primer บน DNA ของไมโทคอนเดรีย.....	27
15 แผนที่ของ pGEM®-T Easy Vector.....	28
16 ภาพสรุปวิธีดำเนินการวิจัย.....	31
17 ปลา <i>Oryzias</i> 5 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา.....	32
18 ขนาดของ PCR product บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ <i>Oryzias</i> 5 ชนิด.....	35
19 ขนาดของ PCR product บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ <i>O. minutillus</i>	36
20 ผลจากการตรวจสอบโคโลนีสีขาวที่มี recombinant DNA ด้วยเทคนิค PCR ของ บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย.....	37
21 บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ <i>Oryzias</i> 5 ชนิด ประกอบด้วย domain I, domain II และ domain III	39
22 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ <i>O. minutillus</i> , <i>O. javanicus</i> , <i>O. dancena</i> , <i>O. mekongensis</i> และ <i>O. celebensis</i> โดยมี <i>Cololabis saira</i> เป็น outgroup.....	40

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
23 Single most parsimonious tree (ความยาว 404 step) ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ <i>O. minutillus</i>, <i>O. javanicus</i>, <i>O. dancena</i>, <i>O. mekongensis</i> และ <i>O. celebensis</i> โดยมี <i>Cololabis saira</i> เป็น outgroup.....	44
24 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ <i>O. minutillus</i> จาก 12 แหล่งที่เก็บตัวอย่างโดย <i>O. dancena</i> และ <i>O. celebensis</i> เป็น outgroup	45
24 Single most parsimonious tree (ความยาว 440 step) ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ <i>O. minutillus</i> 12 แหล่งที่เก็บตัวอย่าง โดยมี <i>O. dancena</i> และ <i>O. celebensis</i> เป็น outgroup....	50

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปลาข้าวสาร (ricefish) หรือที่รู้จักในชื่อภาษาญี่ปุ่นว่า เมดากะ (medaka) จัดอยู่ในสกุล *Oryzias* (Order Belontiiformes; Family Adrianichthyidae) พบอาศัยตามแหล่งน้ำจืด ทั้งในนาข้าว ร่องน้ำ คลอง บ่อ ทะเลสาบ และในน้ำกร่อยบริเวณชายฝั่งทะเล (Berra. 2001: 312) ปัจจุบันพบ 24 ชนิด แพร่กระจายตั้งแต่อินเดียไปจนถึงญี่ปุ่น และลงมาทางใต้ถึงหมู่เกาะอินโด-ออสเตรเลีย ติมอร์ สุลาเวสี และลูซอน (Yamamoto. 1975: 27-28; Nelson. 2006: 276-277; Parenti. 2008: 494-495)

ปลาสกุล *Oryzias* เป็นปลาขนาดเล็ก ลำตัวแบนข้าง มีครีบหลังสั้นและค่อนข้างยาว มีครีบหางสั้นและค่อนข้างยาว มีความยาวมาตรฐานไม่เกิน 60 มิลลิเมตร มีจำนวนข้อกระดูกสันหลังทั้งหมด 24-34 ข้อ มีก้านครีบหลังจำนวน 5-14 ก้าน มีก้านครีบหางจำนวน 13-32 ก้าน (Parenti. 2008: 500-530)

ปลาในสกุลนี้ที่เป็นที่รู้จักกันดีคือ *Oryzias latipes* ซึ่งนิยมใช้เป็นตัวอย่างทดลองในห้องปฏิบัติการ (model organism) เนื่องจากมีวัฏจักรชีวิตสั้นประมาณ 2-3 เดือน มีขนาดเล็ก ทำให้ประหยัดพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง และสามารถแยกเพศได้จากลักษณะภายนอก โดยเพศผู้จะมีลักษณะของครีบหลังและครีบหางยาวและยื่นเป็นแฉกเด่นชัดกว่าเพศเมีย ปลาชนิดนี้มีความดกของไข่ (fecundity) สูง สามารถวางไข่ได้มากกว่า 10 ฟองต่อวัน ไข่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.25 มิลลิเมตร (Iwamatsu. 2004: 606) และใส ทำให้สามารถศึกษาการเจริญเติบโตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ดี จึงนิยมใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาด้านชีววิทยาการเจริญของสัตว์มีกระดูกสันหลัง นอกจากนี้ ปลาชนิดนี้ยังเป็นปลากระดูกแข็งที่มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมไว้อย่างสมบูรณ์ (complete genome sequence) ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงทำให้ *O. latipes* ถูกเลือกใช้เป็นตัวอย่างในการทดลองอย่างแพร่หลาย

ในประเทศไทยมีรายงานพบปลาสกุล *Oryzias* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *O. minutillus* (Smith. 1945: 425) *O. mekongensis* (Uwa; & Magtoon. 1986: 473-478) *O. javanicus* (Magtoon. 1986: 859-860) และ *O. melastigma* (หรือปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *O. dancena*) (วิเชียร มากต่น; อิโรชิ อุวะ. 2531: 229-233) โดย *O. minutillus* อาศัยในแหล่งน้ำจืดที่มีลักษณะเป็นน้ำนิ่ง เช่น ในหนอง บึงหรือแม้กระทั่งในห้วยน้ำขนาดเล็ก พบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย เช่นเดียวกับ *O. mekongensis* ที่พบตามแหล่งน้ำจืดแต่มีการแพร่กระจายทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือบริเวณลุ่มน้ำโขง และลุ่มน้ำมูลเท่านั้น ส่วน *O. javanicus* และ *O. dancena* อาศัยในน้ำกร่อยบริเวณป่าชายเลนทางภาคใต้ของประเทศไทย พบที่จังหวัดภูเก็ตและระนอง ในการศึกษาปลาสกุล *Oryzias* ครั้งนี้ นอกจากจะใช้ปลาทั้ง 4 ชนิดที่พบในประเทศไทยแล้วยังได้ใช้ *O. celebensis* ซึ่งพบที่บริเวณเกาะสุลาเวสี ประเทศอินโดนีเซียด้วย (Uwa; & Parenti. 1988: 159)

ปลา *Oryzias minutillus* หรือ Thai medaka มีขนาดเล็ก โดยมีความยาวมาตรฐานไม่เกิน 17 มิลลิเมตร พบแพร่กระจายในทุกภาคของประเทศไทย และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จากรายงานการศึกษาจำนวนโครโมโซมที่เป็นดิพลอยด์พบความแปรผันจาก 28 ถึง 42 และจากการศึกษาการโอโตไทป์ของปลาชนิดนี้พบว่า มีรูปแบบโครโมโซมทั้งที่จัดอยู่ในกลุ่ม fused chromosome type (Magtoon; & Uwa. 1985. 157-160; Uwa. 1986: 867-876) และกลุ่ม monoarmed chromosome type ด้วย (Magtoon; et al. 1992: 489-497) นอกจากนี้ผลจากการศึกษาด้านแอลโลไซม์ (allozyme) ยังแสดงถึงการแบ่ง *O. minutillus* เป็น 3 ประชากรกลุ่มย่อย (subpopulation) ตามระบบของแม่น้ำสายเจ้าพระยา แม่โขง และคาบสมุทรมหาสมุทรทางภาคใต้ด้วย (Takata; et al. 1993: 319-327) ดังนั้นการศึกษาระดับความคมในไมโทคอนเดรียของปลาสกุล *Oryzias* และใช้บริเวณนี้เป็นเครื่องหมาย DNA อาจทำให้เข้าใจความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และขอบเขตของชนิดของ *O. minutillus* ได้ดียิ่งขึ้น รวมทั้งสามารถจำแนกชนิดของปลาสกุล *Oryzias* ได้อีกด้วย

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อศึกษาระดับความคมในไมโทคอนเดรียของปลาสกุล *Oryzias* และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *O. minutillus* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณความคมในไมโทคอนเดรีย

ความสำคัญของการวิจัย

บริเวณความคมในไมโทคอนเดรียของปลาหลายชนิดได้รับความนิยมในการใช้เป็นเครื่องหมาย DNA เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแปรผันสูง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาระดับความคมในไมโทคอนเดรียของปลาสกุล *Oryzias* และนำมาใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกชนิดของปลาสกุลนี้และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *O. minutillus* จากแหล่งแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน

ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างปลาสกุล *Oryzias* ได้แก่ *O. mekongensis*, *O. dancena*, *O. javanicus* และ *O. celebensis* จากรายงานการพบในประเทศไทยและอินโดนีเซีย สำหรับ *O. minutillus* เก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในทุกภาคของประเทศไทยและบางส่วนจากประเทศกัมพูชา จำแนกชนิดของปลาโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สกัด DNA และเพิ่มขยายชิ้น DNA บริเวณความคมในไมโทคอนเดรียของ *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่ออธิบายโครงสร้างของบริเวณความคมในไมโทคอนเดรีย ส่วน *O. minutillus* นั้นใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณความคมในไมโทคอนเดรียเพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและกำหนดขอบเขตของชนิดด้วย

นิยามศัพท์เฉพาะ

Mitochondrial control region

เป็นบริเวณบน DNA ของไมโทคอนเดรียที่ไม่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีน (non-coding region) และพบอยู่ระหว่างยีน $tRNA^{Pro}$ และ $tRNA^{Phe}$ มีหน้าที่สำคัญคือมีจุดเริ่มต้นการจำลองตัวของ H-strand และควบคุมการถอดรหัสของ H-strand และ L-strand

Polymerase Chain Reaction (PCR)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ขึ้นสั้นๆ โดยใช้ oligonucleotide primer 2 สาย ไปจับที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับบริเวณ DNA ที่ต้องการ โดยมี 3 ขั้นตอนหลัก คือ denaturation, annealing และ extension

DNA cloning

การเพิ่มปริมาณ DNA ซึ่งประกอบด้วยการสกัดหรือแยกชิ้น DNA แล้วนำมาเชื่อมต่อกับ พาหะ DNA (DNA vector) ถ่ายลงในเซลล์แบคทีเรีย หรือสิ่งมีชีวิตอื่นที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มให้มีปริมาณมากขึ้น โดยใช้หลักการของการจำลองโมเลกุล DNA ภายในเซลล์

DNA sequencing

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายของ DNA โดยหลักการของ Sanger

Molecular phylogenetics

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยใช้ข้อมูลในระดับโมเลกุล

สมมติฐานในการวิจัย

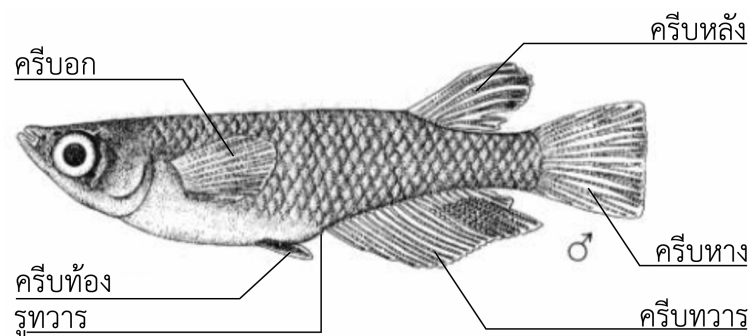
จากผลการศึกษาด้านคาร์โบไฮโปและแอลโลไซม์ในประชากรแต่ละกลุ่มของ *O. minutillus* พบว่ามีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง และมีบางส่วนของผลการทดลองที่ไม่สอดคล้องกัน ดังนั้น การศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยใช้บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียอาจสามารถอธิบายความหลากหลายทางพันธุกรรม ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและยืนยันขอบเขตของชนิดของ *O. minutillus* ได้ดียิ่งขึ้น

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สัณฐานวิทยาของปลาสกุล *Oryzias* และการจำแนกชนิด

ปลาสกุล *Oryzias* หรือปลาข้าวสาร (ricefish) เป็นปลาขนาดเล็ก แพร่กระจายในเขตร้อนชื้นและเขตอบอุ่น พบอาศัยทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย (Yamamoto. 1975: 27-28) โดยปลาในสกุลนี้ที่รู้จักกันดีคือ *Oryzias latipes* หรือ Japanese ricefish (medaka) เนื่องจากเป็น model organism ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งลักษณะทั่วไปของปลาสกุล *Oryzias* (ภาพประกอบ 1) คือ มีดวงตาขนาดใหญ่ ลำตัวแบนข้าง ครีบหลังสั้นและค่อนข้างยาวไปทางด้านหลังของลำตัว ไม่มีเส้นข้างลำตัว มีจำนวนข้อกระดูกสันหลังทั้งหมด 24-34 ข้อ มีก้านครีบหลังจำนวน 5-14 ก้าน มีก้านครีบหางจำนวน 13-32 ก้าน มีเกล็ดเป็นแบบไซคลอยด์ (cycloid) และมีความยาวมาตรฐานไม่เกิน 60 มิลลิเมตร (Parenti. 2008: 515)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะภายนอกของ *Oryzias latipes*

ที่มา: ดัดแปลงจาก Yamamoto, T. (1975). *Medaka (killifish): Biology and Strains*. p. 2.

คอตเทลลัต (Kottelat. 2001: 143-144) ได้อธิบายถึงปลาในสกุลนี้ในหนังสือ Fish of Laos ไว้ว่าปลาสกุลนี้จัดอยู่ในวงศ์ Adrianichthyidae และเป็นเพียงสกุลเดียวในวงศ์ย่อย Oryziinae (Berra. 2001: 312) เนลสัน (Nelson. 2006: 277) ได้จัดอนุกรมวิธานของปลาสกุล *Oryzias* ไว้ดังนี้

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Subclass Neopterygii

Order Belontiiformes

Family Adrianichthyidae

Subfamily Oryziinae

Genus *Oryzias*

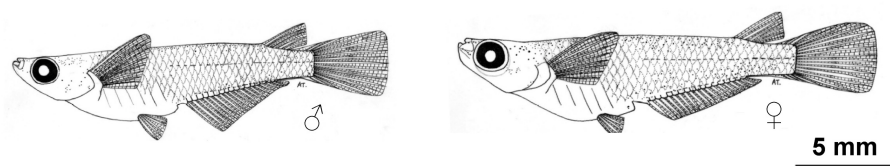
พาเรนต์ (Parenti. 2008: 515) จำแนกชนิดของปลาสกุล *Oryzias* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 85 ลักษณะ และแบ่งกลุ่มตามความยาวมาตรฐาน (standard length, SL) เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่มีขนาดใหญ่ (elongate) คือมีความยาวมาตรฐานมากกว่า 50 มิลลิเมตร แต่ไม่เกิน 60 มิลลิเมตร ได้แก่ *O. bonneorun*, *O. nigrimas*, *O. orthognathus* และ *O. sarasinorum* กลุ่มขนาดกลาง (intermediate) คือมีความยาวมาตรฐานมากกว่า 40 มิลลิเมตร แต่ไม่เกิน 50 มิลลิเมตร ได้แก่ *O. marmoratus*, *O. matanensis* และ *O. profundicola* กลุ่มขนาดเล็ก (small) คือมีความยาวมาตรฐานมากกว่า 26 มิลลิเมตร แต่ไม่เกิน 40 มิลลิเมตร ได้แก่ *O. carnaticus*, *O. celebensis*, *O. curvinotus*, *O. dancena*, *O. javanicus*, *O. latipes*, *O. luzonensis*, *O. nebulosus* และ *O. timorensis* และสุดท้ายกลุ่มขนาดเล็กจิ๋ว (miniature) คือมีความยาวมาตรฐานไม่เกิน 26 มิลลิเมตร ได้แก่ *O. haugiangensis*, *O. hubbsi*, *O. mekongensis*, *O. minutillus*, *O. pectoralis*, *O. setnai*, *O. sinensis* และ *O. uwai*

มากตุนและเต็มวิชชากร (Magtoon; & Termvidchakorn. 2009: 35-68) ศึกษาสัณฐานวิทยาและจำแนกชนิดของปลาสกุล *Oryzias* จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *O. minutillus*, *O. mekongensis*, *O. javanicus* และ *O. dancena* ในประเทศไทย *O. celebensis* ในประเทศอินโดนีเซีย และ *O. latipes* ในประเทศญี่ปุ่น โดยใช้ความยาวของลำตัวและจำนวนก้านครีบ และอธิบายไว้ว่าปลาทั้ง 6 ชนิดมีความแตกต่างกันในส่วนของจำนวนก้านครีบหัว ก้านครีบอก ก้านครีบท้อง จำนวนก้านครีบบริเวณฐานของครีบหาง และจำนวนข้อกระดูกสันหลังโดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ซึ่งลักษณะเหล่านี้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดได้

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างปลาสกุล *Oryzias* 5 ชนิด ได้แก่ *O. minutillus*, *O. mekongensis*, *O. javanicus*, *O. dancena* และ *O. celebensis* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังต่อไปนี้

Oryzias minutillus

ประเทศไทยมีการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาของ *O. minutillus* (ภาพประกอบ 2) ในภาคเหนือ ภาคกลาง (วิเชียร มากตุน 2530ก: 1-23) ภาคใต้ (วิเชียร มากตุน 2530ข: 6-7) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (วิลาวัณย์ คำศรี 2552: 39-47) โดยมีการรายงานลักษณะทั่วไปของ *O. minutillus* ว่าลำตัวมีลักษณะใส พบจุดสีดำเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วลำตัว โดยพบหนาแน่นบริเวณด้านบนของส่วนหัวและกระจายบางลงจนถึงครีบหาง ด้านข้างลำตัวมีจุดสีดำเรียงกันเป็นเส้นตั้งแต่ครีบอกจนถึงครีบหาง มีจำนวนเกล็ดตามยาวลำตัว 27-28 เกล็ด จำนวนเกล็ดตามขวางลำตัว 10 เกล็ด (Smith. 1945: 424-425) มีพื้นขนาดเล็กรูปกรวยเรียงเป็นแถวเดี่ยว ปลาเพศผู้มีขนาดเล็กกว่าปลาเพศเมีย (Scheel. 1969: 5-7) มีความยาวมาตรฐาน 11-16.5 มิลลิเมตร ความยาวเหยียด 13.5-20 มิลลิเมตร จำนวนก้านครีบหลัง 6-7 ก้าน จำนวนก้านครีบหัว 15-21 ก้าน (ประเสริฐ ผ่องใส 2548: 23-28; พิงนภา ไกรชุมพล 2550: 36-71; Magtoon; & Termvidchakorn. 2009: 47-50) นอกจากนี้ยังมีการศึกษา *O. minutillus* ในประเทศกัมพูชา (Roberts. 1998: 220) และประเทศลาว (Kottelat. 2001: 143) ซึ่งพบว่ามีความลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างกัน

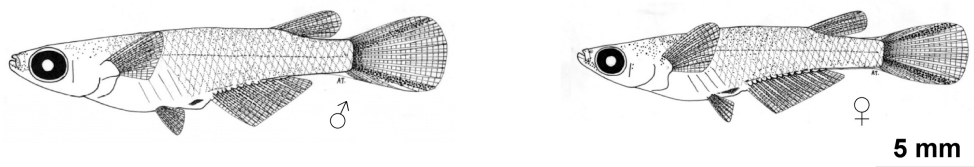


ภาพประกอบ 2 ลักษณะภายนอกของ *O. minutillus*

ที่มา: Magtoon, W. & Termvidchakorn, A. (2009). *The Natural History Journal of Chulalongkorn University*. 9(1): 48.

Oryzias mekongensis

อุวะและมากตุน (Uwa; & Magtoon. 1986: 473-478) พบและศึกษา *O. mekongensis* เป็นครั้งแรกและอธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ภาพประกอบ 3) ของปลาชนิดนี้ไว้ว่า เป็นปลาขนาดเล็กที่มีความยาวมาตรฐาน 11.5-14 มิลลิเมตร สำหรับปลาเพศผู้ที่บริเวณครีบทหางจะพบแถบสีแดงอมส้มเป็นแนวทั้งด้านบนและด้านล่าง ซึ่งแถบสีแดงอมส้มนี้ไม่ปรากฏชัดเจนในเพศเมีย ไม่พบ bony contact organ บริเวณก้านครีบทวารของปลาเพศผู้ *O. mekongensis* มีจำนวนก้านครีบทหลัง เท่ากับ 5-7(6) ก้าน จำนวนก้านครีบทวาร 13-16(14) ก้าน และมีจำนวนข้อกระดูกสันหลัง 28-31 ข้อ ในปี ค.ศ. 1998 มีรายงานการศึกษา *O. mekongensis* โดยโรเบิร์ตส (Roberts. 1998: 220-221) ซึ่งใช้ตัวอย่างจากประเทศลาวพบว่า มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างจากที่กล่าวมา และในปี ค.ศ. 2009 มีการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของปลาชนิดนี้ในประเทศไทยอีกครั้ง ซึ่งพบว่า *O. mekongensis* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างกัน มีเพียงจำนวนก้านครีบทวารเท่านั้นที่มีจำนวน 15-17(15) ก้าน (วิลาวัณย์ คำศรี 2552: 58-60; Magtoon; & Termvidchakorn. 2009: 51-53) ซึ่งต่างจากรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้

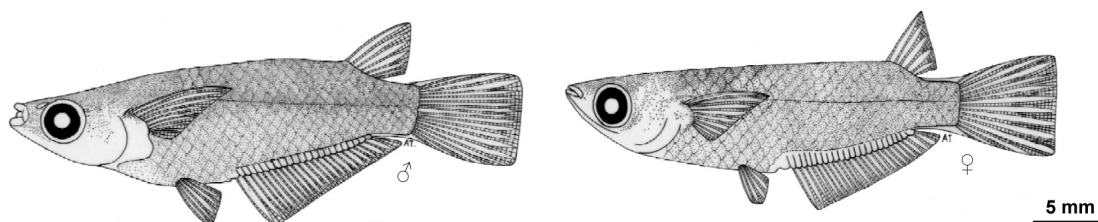


ภาพประกอบ 3 ลักษณะภายนอกของ *O. mekongensis*

ที่มา: Magtoon, W. & Termvidchakorn, A. (2009). *The Natural History Journal of Chulalongkorn University*. 9(1): 52.

Oryzias javanicus

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *O. javanicus* (ภาพประกอบ 4) ที่แตกต่างจากชนิดอื่น คือมี สีเหลืองบริเวณเกือบถึงขอบของครีบท้องและบริเวณส่วนด้านบนของครีบท้อง และครีบทวารของปลา เพศผู้พบ bony contact organ ลำตัวสีเทาใสจนถึงสีดำน้ำตาล ในประเทศไทยพบว่าปลาชนิดนี้มีความยาวมาตรฐานเฉลี่ย 26.6 มิลลิเมตร จำนวนก้านครีบท้อง 6-8(7) ก้าน จำนวนก้านครีบอก 10-12(11) ก้าน จำนวนก้านครีบทวาร 22-26(23) ก้าน และจำนวนข้อกระดูกสันหลัง 28-30(29) ข้อ (ประเสริฐ ผ่องใส 2548: 29-34; Magtoon; & Termvidchakorn. 2009: 38-44) มีรายงานการศึกษา สัณฐานวิทยาของปลาชนิดนี้โดยอิวามัตสึและคนอื่นๆ (Iwamatsu; et al. 1982: 190-198) ซึ่งใช้ ตัวอย่างจากประเทศอินโดนีเซีย สิงคโปร์ และมาเลเซีย พบว่ามีลักษณะไม่แตกต่างกัน มีเพียงความ ยาวมาตรฐานและจำนวนก้านครีบทวารที่แตกต่างกันในตัวอย่างแต่ละประเทศ โดยตัวอย่างจาก ประเทศอินโดนีเซียมีความยาวมาตรฐานเฉลี่ย 19.2 มิลลิเมตร และมีจำนวนก้านครีบทวาร 18-23(20) ก้าน จากประเทศสิงคโปร์มีความยาวมาตรฐานเฉลี่ย 24.7 มิลลิเมตร และมีจำนวนก้าน ครีบทวาร 20-24(21) ก้าน และจากประเทศมาเลเซียพบความยาวมาตรฐานเฉลี่ย 25.6 มิลลิเมตร และมีจำนวนก้านครีบทวาร 21-24(22) ก้าน

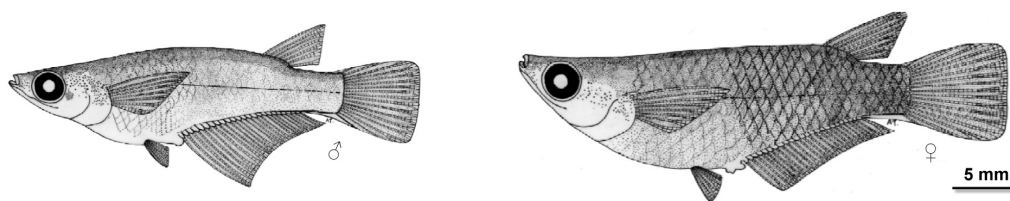


ภาพประกอบ 4 ลักษณะภายนอกของ *O. javanicus*

ที่มา: Magtoon, W. & Termvidchakorn, A. (2009). *The Natural History Journal of Chulalongkorn University*. 9(1): 42.

Oryzias dancena

สำหรับ *O. dancena* ในประเทศไทยได้มีนักวิจัยศึกษาด้านสัณฐานวิทยา (ภาพประกอบ 5) และอธิบายลักษณะของปลาชนิดนี้ไว้ดังนี้ คือ ปลาเพศเมียมีลำตัวสีน้ำตาลอ่อน ส่วนปลาเพศผู้มี ลำตัวสีเทาอมน้ำตาล ขอบของครีบท้องและครีบทวารเป็นสีขาวเหลืองเงิน และลำตัวมีความลึกมากที่สุดสำหรับในปลาสกุล *Oryzias* (Parenti. 2008: 515-516) มีจำนวนก้านครีบท้อง 7-8(7) ก้าน จำนวนก้านครีบทวาร 22-24 ก้าน มีความยาวมาตรฐาน 28.5-30.5 มิลลิเมตร จำนวนข้อกระดูกสัน หลัง 28-30 ข้อ (วิเชียร มากตุ่น; และ อิโรชิ อุวะ; 2531: 229-233; Magtoon; & Termvidchakorn. 2009: 44-46)

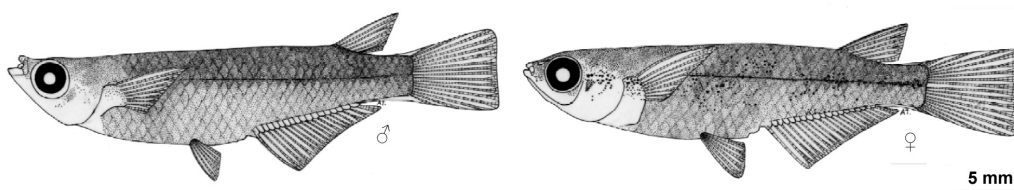


ภาพประกอบ 5 ลักษณะภายนอกของ *O. dancena*

ที่มา: Magtoon, W. & Termvidchakorn, A. (2009). *The Natural History Journal of Chulalongkorn University*. 9(1): 45.

Oryzias celebensis

ในส่วนของ *O. celebensis* มีรายงานอธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ภาพประกอบ 6) ไว้ว่าปลาชนิดนี้มีลำตัวสีเหลืองอ่อน มีแถบสีน้ำตาลเข้มบริเวณตลอดแนวข้างลำตัว บริเวณครีบทหางพบแถบสีเหลืองเข้มเป็นแนวทั้งด้านบนและด้านล่าง มีจำนวนก้านครีบทหลัง 8-9(9) ก้าน จำนวนก้านครีบทวาร 20-23(23) ก้าน ครีบท้องมีขนาดเล็กซึ่งประกอบด้วยจำนวนก้านครีบทเพียง 6 ก้าน จำนวนข้อกระดูกสันหลังมี 29-31 ข้อ มีความยาวมาตรฐานเฉลี่ย 27.5 มิลลิเมตร (Parenti. 2008: 557-559; Magtoon; & Termvidchakorn. 2009: 38-44)



ภาพประกอบ 6 ลักษณะภายนอกของ *O. celebensis*

ที่มา: Magtoon, W. & Termvidchakorn, A. (2009). *The Natural History Journal of Chulalongkorn University*. 9(1): 58.

ชีววิทยาและการแพร่กระจายของปลาสกุล *Oryzias* ที่ใช้ในการศึกษา

ปลาสกุล *Oryzias* อาศัยบริเวณผิวน้ำและอยู่รวมกันเป็นฝูง กินลูกน้ำและลูกแมลงเป็นอาหาร มีการวางไข่ตามพืชน้ำ เกือบทุกชนิดของปลาสกุลนี้มีการแสดงเพศที่โดดเด่น โดยเพศผู้จะมีสีเข้มและมีเส้นแฉกที่ครีบทหลังและครีบทวาร (Kottelat. 2001: 143-144) ปัจจุบันปลาสกุล *Oryzias* มีสมาชิกทั้งหมดมี 24 ชนิด (Parenti. 2008: 497) พบแพร่กระจายบริเวณเขตอากาศแบบร้อนชื้นและเขตอบอุ่นตั้งแต่ประเทศอินเดียจนถึงญี่ปุ่น และลงมาทางใต้จนถึงหมู่เกาะอินโด-ออสเตรเลียติมอร์ สุลาเวสี และลูซอน โดยส่วนมากจะอาศัยในน้ำจืด ซึ่งพบได้ในนาข้าว ลำธาร ร่องน้ำ คลอง บ่อ และทะเลสาบ และมีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่พบในน้ำกร่อย ป่าชายเลน และปากแม่น้ำ (Yamamoto. 1975: 27-28; Kottelat. 2001: 143-144; Berra. 2001: 312)

Oryzias minutillus

ในประเทศไทยมีการศึกษาปลาสกุล *Oryzias* ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1945 โดยสมิธ (Smith. 1945: 424-425) พบ *O. minutillus* บริเวณคลองในกรุงเทพมหานคร ซึ่งเป็นปลาที่มีขนาดเล็กที่สุดในปลาสกุลนี้และเชื่อว่าไม่น่าจะมีการแพร่กระจายมากนัก ต่อมาในปี ค.ศ. 1969 มีรายงานการศึกษาชีววิทยาบางประการของ *O. minutillus* เพิ่มเติม โดยชีล (Scheel. 1969: 5-7) ได้ทำการศึกษาจากตัวอย่างที่เก็บบริเวณคลองในกรุงเทพมหานครเช่นกัน ต่อมามากตุนและอุวะ (Magtoon; & Uwa. 1985: 157-160) รายงานการแพร่กระจายของ *O. minutillus* ในภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคใต้ของประเทศไทย และมีรายงานพบการแพร่กระจายของ *O. minutillus* ตามแหล่งน้ำจืดอื่นๆ เช่น ลำธาร บ่อน้ำ และนาข้าว ในจังหวัดต่างๆ ในภาคกลางพบที่จังหวัดปทุมธานี นนทบุรี อ่างทอง พระนครศรีอยุธยา นครปฐม ชัยนาท อุทัยธานี และสุพรรณบุรี ในภาคเหนือพบที่จังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย ในภาคใต้พบที่จังหวัดพังงา ภูเก็ต นครศรีธรรมราช สงขลา และปัตตานี ในภาคตะวันออกพบที่จังหวัดชลบุรี และในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบที่จังหวัดนครราชสีมา มหาสารคาม อุดรธานี กาฬสินธุ์ และบุรีรัมย์ (วิเชียร มากตุน. 2530ก: 7; 2530ข: 1-6; วิลาวรรณย์ คำศรี. 2552: 27-28; Magtoon. 1986: 859-860; Magtoon; et al. 1992: 489; Takata; et al. 1993: 319) และมีรายงานการแพร่กระจายของ *O. minutillus* ในมณฑลยูนนาน ประเทศจีน กรุงร่างกุ้ง ประเทศพม่า (Uwa & Parenti. 1988; 332-340) เมืองเสียมเรียบ ประเทศกัมพูชา (Roberts. 1998: 219) และบริเวณตอนกลางของกลุ่มน้ำโขงในประเทศลาวด้วย (Kottelat. 2001: 143)

Oryzias mekongensis

ในปี ค.ศ. 1986 มากตุน (Magtoon. 1986: 859-860) ได้พบตัวอย่างปลาในสกุลนี้ซึ่งขณะนั้นยังไม่สามารถระบุชนิดได้อย่างชัดเจน (*Oryzias* sp.) ในบริเวณกลุ่มน้ำโขงทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่จังหวัดร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ และกาฬสินธุ์ ภายในปีเดียวกันนี้ อุวะและมากตุน (Uwa; & Magtoon. 1986: 473-478) ได้ศึกษาปลา *Oryzias* sp. อย่างละเอียด และให้ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryzias mekongensis* ต่อมา มีรายงานการแพร่กระจายของปลาชนิดนี้บริเวณกลุ่มน้ำโขงในจังหวัดอุดรธานี และสกลนคร (วิลาวรรณย์ คำศรี. 2552: 27-28; Magtoon; & Termvidchakorn. 2009: 51-53) และบริเวณกลุ่มน้ำโขงในประเทศลาว (Roberts. 1998: 219; Kottelat. 2001: 143)

Oryzias javanicus

สำหรับ *O. javanicus* มีรายงานการแพร่กระจายในประเทศอินโดนีเซีย สิงคโปร์ และมาเลเซีย (Iwamatsu; et al. 1982: 190-198) นอกจากนี้ยังพบการแพร่กระจายในแหล่งน้ำกร่อยบริเวณชายฝั่งทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทยอีกด้วย โดยพบที่จังหวัดภูเก็ต (Magtoon. 1986: 859-860; Magtoon; & Termvidchakorn. 2009: 38-44) และจังหวัดระนอง (วิเชียร มากตุน; และอิโรชิ อุวะ; 2531: 229-233)

Oryzias dancena

วิเชียร มากตุ่น และ อิโรชิ อุวะ (2531: 229-233) ได้รายงานการแพร่กระจายของ *O. dancena* ในประเทศไทยที่จังหวัดระนอง รายงานดังกล่าวได้อธิบายไว้ว่าปลาชนิดนี้มีการแพร่กระจายมาจากประเทศอินเดียผ่านประเทศพม่ามาสู่ประเทศไทย และพบปลาชนิดนี้อยู่ร่วมกับ *O. javanicus* ในบริเวณป่าชายเลนที่เป็นน้ำกร่อยอีกด้วย

Oryzias celebensis

ในการศึกษาครั้งนี้ยังให้ความสนใจแก่ *O. celebensis* ซึ่งพบแพร่กระจายบริเวณเกาะสุลาเวสีและทางตะวันตกของเกาะติมอร์ในประเทศอินโดนีเซีย (Uwa; & Parenti. 1988: 159)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสกุล *Oryzias*

การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetics) ของปลาสกุล *Oryzias* พบว่ามีจำนวนโครโมโซมที่เป็นดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 28-48 ซึ่งอุวะ (Uwa. 1986: 867-876) กำหนดให้จำนวนโครโมโซมที่เป็นดิพลอยด์พื้นฐานของปลาสกุลนี้เท่ากับ 48 และได้จัดกลุ่มปลาสกุลนี้เป็น 3 กลุ่มโดยใช้รูปแบบของโครโมโซม คือ กลุ่มโมโนอาร์ม (monoarmed) กลุ่มไบอาร์ม (biarmed) และกลุ่มฟิวส์ (fused) โดยมีรายงานการศึกษาคาร์ิโอไทป์ในปลาสกุลนี้ไว้ทั้งหมด 13 ชนิด ดังตาราง 1

ตาราง 1 รูปแบบโครโมโซม ชนิดของปลาในสกุล *Oryzias* จำนวนโครโมโซม (2n) จำนวนแขนโครโมโซม (NF) และ DNA

รูปแบบโครโมโซม	ชนิดของปลา	2n	NF	DNA (pg per nucleus)	เอกสารอ้างอิง
Monoarmed	<i>O. dancena</i>	48	48	1.8	Uwa. 1986, 1991
	<i>O. javanicus</i>	48	48	1.8	Uwa. 1986
	<i>O. hubbsi</i>	48	48	1.7	Uwa; & Iwata. 1981
Monoarmed/Fused	<i>O. minutillus</i>	28-42	42-44	1.5	Magtoon; & Uwa. 1985
Biarmed	<i>O. mekongensis</i>	48	58	1.5	Uwa. 1986
	<i>O. curvinotus</i>	48	64-82	1.5	Uwa. 1991
	<i>O. latipes</i>	48	68-70	1.7	Uwa. 1986
	<i>O. luzonensis</i>	48	96	1.9	Uwa. 1986
	<i>O. sinensis</i>	46	68-70	1.7	Chen; Uwa; & Chu. 1989
Fused	<i>O. celebensis</i>	36	48	1.7	Uwa; Iwamatsu; & Ojima. 1981
	<i>O. nigrimas</i>	38	48	1.7-1.8	Uwa. 1986, 1991
	<i>O. marmoratus</i>	42	48	-	Naruse. 1996
	<i>O. matanensis</i>	42	48	-	Naruse. 1996

ซาไกซุมิ (Sakaizumi. 1985: 521-522) ใช้การวิเคราะห์ตำแหน่งของแอลโลไซม์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาสกุล *Oryzias* 5 ชนิด ได้แก่ *O. javanicus*, *O. melastigma* (*O. dancena*), *O. latipes*, *O. luzonensis* และ *O. celebensis* โดยใช้โปรตีน parvalbumin ซึ่งสามารถแยกปลาทั้ง 5 ชนิด ได้เป็น 3 กลุ่ม จากการแสดงออกของแถบโปรตีน โดยกลุ่มแรกพบแถบโปรตีน MP2 เพียงแถบเดียว คือ *O. melastigma* (*O. dancena*) และ *O. javanicus* กลุ่มที่สองพบแถบโปรตีน MP2 และ MP3 ใน *O. latipes* และ *O. luzonensis* ส่วนกลุ่มสุดท้ายพบแถบโปรตีน MP2, MP4 และแถบ MP3 บางๆ ได้แก่ *O. celebensis*

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Oryzias minutillus*

ปลา *Oryzias minutillus* พบแพร่กระจายในทุกภาคของประเทศไทย และจากรายงานการศึกษาด้านพันธุกรรมพบว่ามีความแปรผันภายในชนิดเดียวกันสูง (high intra-specific variation) โดยมีรายงานการศึกษาดังต่อไปนี้

มากตุนและอุวะ (Magtoon; & Uwa. 1985: 157-160) ศึกษาการโอโทปีของ *O. minutillus* โดยเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างในภาคกลาง (กรุงเทพมหานคร) และภาคเหนือ (เชียงใหม่) ของประเทศไทย พบว่าตัวอย่างจากภาคกลางมีจำนวนโครโมโซม $2n = 34$ และจากภาคเหนือมีโครโมโซม $2n = 30$

อาซิดะและอุวะ (Ashida; & Uwa. 1987: 1003) ศึกษาการโอโทปีของ *O. minutillus* ในภาคใต้ (ภูเก็ต) ของประเทศไทย พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 42$ ซึ่งสอดคล้องกับการโอโทปีของ *O. minutillus* จากมณฑลยูนนาน ในประเทศจีน (Uwa; Wang; & Chen. 1988: 332-340) จึงเป็นไปได้ว่า *O. minutillus* จะมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานที่เป็นดิพลอยด์เท่ากับ 42

สึยูกิและอุวะ (Tsuyuki; & Uwa. 1988: 1224) ศึกษาสาเหตุของความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมของ *O. minutillus* ในประเทศไทย โดยดูจากจำนวนโครโมโซมในการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส (meiosis) ในระยะเมทาเฟส I (metaphase I) ของ *O. minutillus* จากกรุงเทพมหานคร เชียงใหม่ และภูเก็ต โดยศึกษาปลาลูกผสมระหว่างกรุงเทพมหานครกับภูเก็ต และกรุงเทพมหานครกับเชียงใหม่ พบว่าลูกผสมระหว่างกรุงเทพมหานครกับภูเก็ต มีจำนวนโครโมโซม $2n = 38$ และลูกผสมระหว่างกรุงเทพมหานครกับเชียงใหม่มีจำนวนโครโมโซม $2n = 32$ และอธิบายว่าความผิดปกติของโครโมโซมของ *O. minutillus* ในประเทศไทยอาจเกิดขึ้นจากกระบวนการ Robertsonian centric fusion

มากตุนและคนอื่นๆ (Magtoon; et al. 1992: 489-497) ศึกษาการโอโทปีของ *O. minutillus* จาก 18 แหล่งทั่วประเทศไทย (ตาราง 2 และภาพประกอบ 7) และอธิบายว่าปลาชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานที่เป็นดิพลอยด์เท่ากับ 42 จำนวนแขนของโครโมโซมเท่ากับ 42 มี nucleolar organizer region (NOR) บนโครโมโซมแบบอะโครเซนทริก และการเกิดวิวัฒนาการของโครโมโซมทำให้มีจำนวนแขนเท่ากับ 44 และมี NOR บนโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก โดยสามารถแบ่งรูปแบบของโครโมโซมเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม primitive type ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีจำนวนโครโมโซม

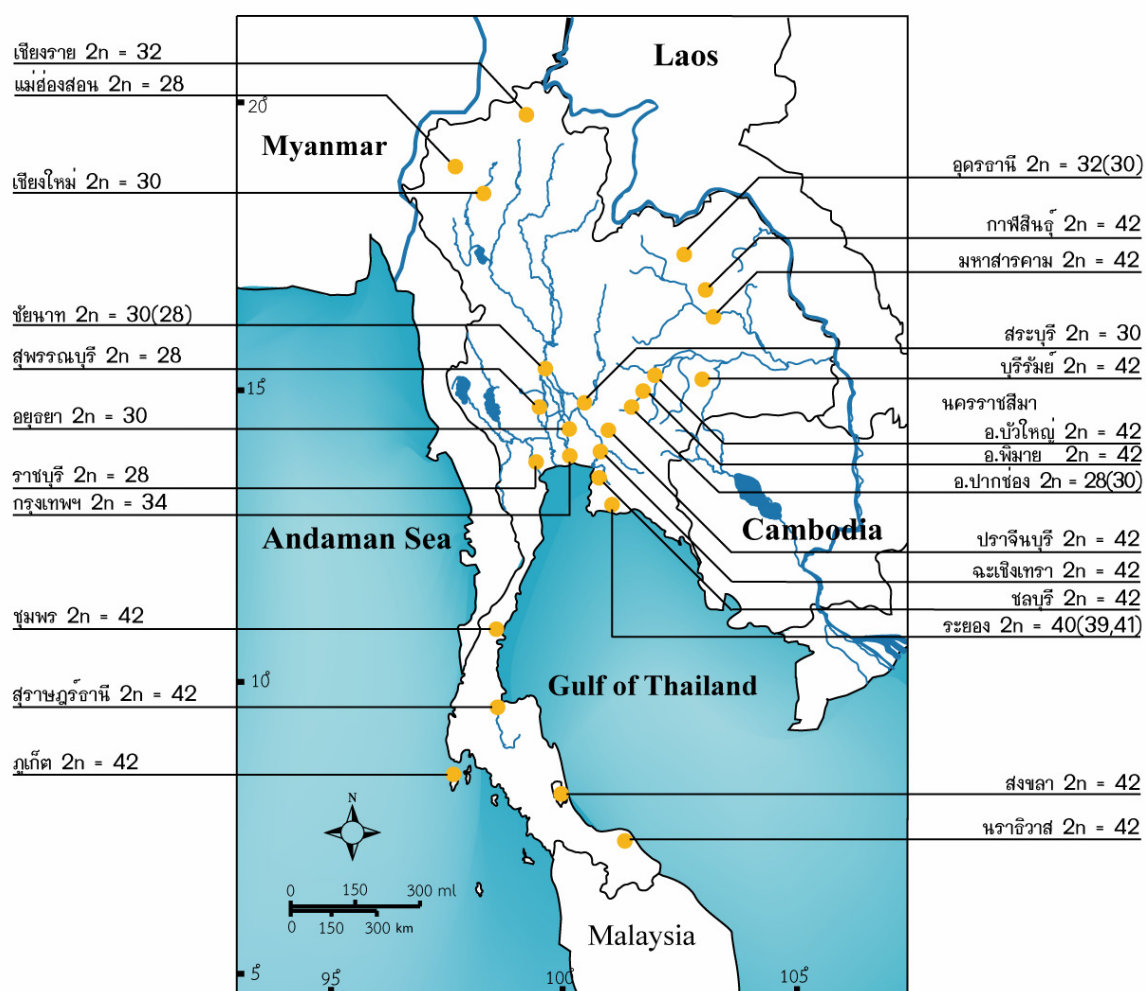
2n = 40-42 และมีรูปแบบโครโมโซมเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 0-2 คู่ โดยพบในตัวอย่างจากภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และกลุ่ม developed type ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 28-34 และมีรูปแบบโครโมโซมเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 8-14 คู่ พบในตัวอย่างจากภาคกลาง และภาคเหนือ

ตาราง 2 แหล่งที่เก็บตัวอย่าง จำนวนโครโมโซม (2n) จำนวนแขนโครโมโซม (NF) ลักษณะคาริโอไทป์ และรูปแบบโครโมโซมของ *O. minutillus*

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	2n	NF	ลักษณะคาริโอไทป์	โครโมโซมขนาดใหญ่	NOR	เอกสารอ้างอิง
แม่ฮ่องสอน	28	46	16M+2SM+10A	16	-	Magtoon; et al. 1995
เชียงราย	32	44	10M+2SM+20A	10	SM	Magtoon; et al. 1992
เชียงใหม่	30	44	12M+2SM+16A	12	SM	Magtoon; & Uwa. 1985
ชัยนาท	30(28)	44	12M+2SM+16A	12	SM	Magtoon; et al. 1992
สุพรรณบุรี	28	44	14M+2SM+12A	14	SM	Magtoon; et al. 1992
สระบุรี	30	44	12M+2SM+16A	12	SM	Magtoon; et al. 1992
ราชบุรี	28	44	14M+2SM+12A	14	SM	Magtoon; et al. 1992
กรุงเทพมหานคร	34	44	8M+2SM+24A	8	SM	Magtoon; & Uwa. 1985
พระนครศรีอยุธยา	30	44	12M+2SM+16A	12	SM	Magtoon; et al. 1995
มหาสารคาม	42	42	42A	0	A	Magtoon; et al. 1992
นครราชสีมา						
อ.บัวใหญ่	42	42	42A	0	A	Magtoon; et al. 1992
อ.พิมาย	42	42	42A	0	A	Magtoon; et al. 1992
อ.ปากช่อง	28(30)	44	14M+2SM+12A	14	SM	Magtoon; et al. 1992
อุดรธานี	32	44	10M+2SM+20A	10	SM	Magtoon; et al. 1995
	30	44	12M+2SM+16A	12	-	วิลาวัณย์ คำศรี 2552
กาฬสินธุ์	42	42	42A	0	-	วิลาวัณย์ คำศรี 2552
บุรีรัมย์	42	42	42A	0	-	วิลาวัณย์ คำศรี 2552
ชุมพร	42	42	42A	0	A	Magtoon; et al. 1992
สุราษฎร์ธานี	42	42	42A	0	A	Magtoon; et al. 1992
สงขลา	42	42	42A	0	A	Magtoon; et al. 1992
ภูเก็ต	42	42	42A	0	A	Ashida; & Uwa. 1987
นราธิวาส	42	42	42A	0	A	Magtoon; et al. 1995
ฉะเชิงเทรา	42	44	2SM+40A	0	SM	Magtoon; et al. 1992
ปราจีนบุรี	42	44	2SM+40A	0	SM	Magtoon; et al. 1992
ระยอง	40(39, 41)	44	2M+2SM+36A	2	SM	Magtoon; et al. 1992
ชลบุรี	42	44	2SM+40A	0	SM	Magtoon; et al. 1995

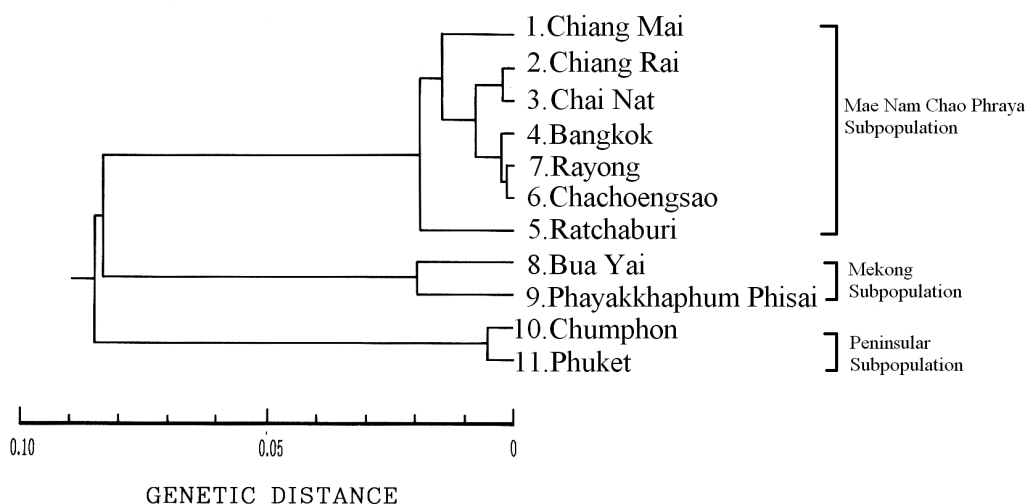
หมายเหตุ: M = เมทาเซนตริก; SM = ซับเมทาเซนตริก; A = อะโครเซนตริก

ต่อมาในปี ค.ศ. 1995 มากตุนและคนอื่นๆ (Magtoon; et al. 1995: 137-147) ศึกษาการไอบีของ *O. minutillus* โดยเปรียบเทียบตัวอย่างจาก 5 กลุ่มน้ำในประเทศไทย ได้แก่ กลุ่มน้ำสาละวิน (แม่ฮ่องสอน) กลุ่มน้ำเจ้าพระยา (พระนครศรีอยุธยา) กลุ่มน้ำโขง (อุดรธานี) กลุ่มน้ำภาคตะวันออก (ชลบุรี และระยอง) และกลุ่มน้ำภาคใต้ (นครศรีธรรมราช) พบว่า *O. minutillus* จากกลุ่มน้ำสาละวินมีจำนวนโครโมโซม $2n = 28$ จากกลุ่มน้ำเจ้าพระยามีจำนวนโครโมโซม $2n = 30$ จากกลุ่มน้ำโขงมีจำนวนโครโมโซม $2n = 32$ จากกลุ่มน้ำภาคตะวันออกมีจำนวนโครโมโซม $2n = 42$ และจากกลุ่มน้ำภาคใต้มีจำนวนโครโมโซม $2n = 42$ และในปี พ.ศ. 2552 มีการศึกษาการไอบีของ *O. minutillus* เฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (วิลาวุธย์ คำศรี; 2552: 117-126) โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่าง *O. minutillus* ออกเป็น 3 กลุ่มน้ำ ได้แก่ กลุ่มน้ำโขง (อุดรธานี) พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 30$ ในขณะที่ *O. minutillus* จากกลุ่มน้ำชี (กาฬสินธุ์) และจากกลุ่มน้ำมูล (บุรีรัมย์) มีจำนวนโครโมโซม $2n = 42$ โดยมีรายละเอียดดังตาราง 2 และภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 จำนวนโครโมโซม ($2n$) ของ *O. minutillus* และแหล่งที่เก็บตัวอย่างในประเทศไทย

ในปี ค.ศ. 1993 ทากาตะและคนอื่นๆ (Takata; et al. 1993: 319-327) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *O. minutillus* ในประเทศไทย โดยใช้ตัวอย่างจาก 11 แหล่งทั่วประเทศ ทั้งในภาคเหนือ (เชียงใหม่ และเชียงราย) ภาคกลาง (กรุงเทพมหานคร ชัยนาท และราชบุรี) ภาคตะวันออก (ฉะเชิงเทรา และระยอง) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นครราชสีมา และมหาสารคาม) และภาคใต้ (ชุมพร และภูเก็ต) โดยใช้การวิเคราะห์ตำแหน่งของแอลโลไซม์ พบว่าสามารถแยก *O. minutillus* ได้เป็น 3 ประชากรกลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มประชากรบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยา กลุ่มประชากรบริเวณแม่น้ำโขง และกลุ่มประชากรบริเวณลุ่มน้ำทางภาคใต้ ดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 8 ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งของแอลโลไซม์ของ *O. minutillus* ในประเทศไทยซึ่งแสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างปลาจาก 11 แหล่ง โดยสามารถแบ่ง *O. minutillus* เป็น 3 ประชากรกลุ่มย่อย

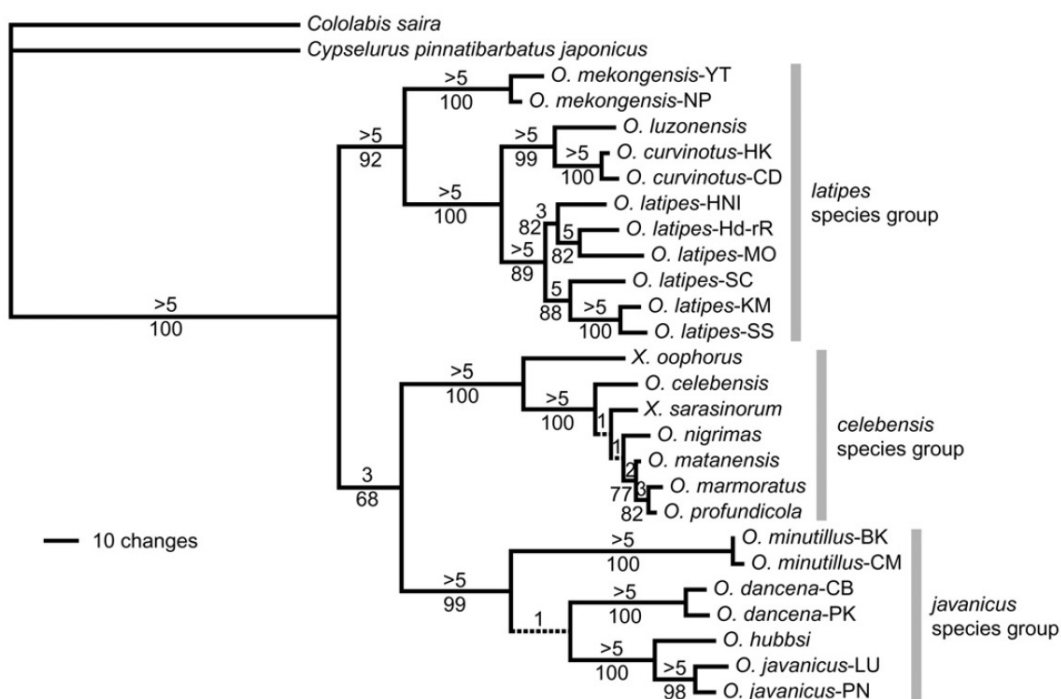
ที่มา: Takata, K.; et al. (1993). *Japanese Journal of Ichthyology*. (39): 324.

จากรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *O. minutillus* พบว่าผลจากการวิเคราะห์ตำแหน่งของแอลโลไซม์ระหว่างกลุ่มประชากรบริเวณลุ่มแม่น้ำโขง และกลุ่มประชากรบริเวณลุ่มน้ำทางภาคใต้มีระยะห่างทางพันธุกรรมสูงถึง 6.8-10.2% ในขณะที่ผลจากการศึกษาด้านคาริโอไทป์พบว่า ตัวอย่างจากแหล่งดังกล่าวมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ $2n = 42$ และมีรูปแบบของโครโมโซมเป็นอะโครเซนทริกทั้งหมด จึงเห็นได้ว่าผลการศึกษาด้านแอลโลไซม์และด้านคาริโอไทป์ของ *O. minutillus* มีความไม่สอดคล้องกัน ดังนั้นการศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลอาจสามารถอธิบายความหลากหลายทางพันธุกรรม ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและยืนยันขอบเขตของชนิดของ *O. minutillus* ได้ดียิ่งขึ้น

การศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลของปลา *Oryzias*

ปัจจุบันมีการศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลของปลาสกุล *Oryzias* จำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *O. latipes* ซึ่งได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมอย่างสมบูรณ์ในปี ค.ศ. 2007 (Kasahara; et al. 2007: 714-719) และได้มีรายงานการศึกษาอื่นๆ ด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในครั้งนี้อย่างต่อเนื่องต่อไป

ในปี ค.ศ. 1996 นารุเซ (Naruse. 1996: 5-7) ได้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาสกุล *Oryzias* โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน cytochrome *b* และ 12S rDNA ในไมโทคอนเดรีย และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี neighbour-joining พบว่าได้ผลสอดคล้องกับของ ทาเคฮานะ นารุเซ และซาไกซุมิ (Takehana; Naruse; & Sakaizumi. 2005: 417-428) ซึ่งได้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณยีน tyrosinase ในนิวเคลียส ยีน 12S rDNA และยีน 16S rDNA ในไมโทคอนเดรีย และสามารถแบ่งปลาสกุลนี้ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม *latipes* species กลุ่ม *celebensis* species และกลุ่ม *javanicus* species (ภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 Phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน tyrosinase, 12S rDNA และ 16S rDNA สำหรับ *Oryzias* 13 ชนิด และ *Xenopoecilus* 2 ชนิด

ที่มา: Takehana, Y.; Naruse, K.; & Sakaizumi, M. (2005). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 36:421.

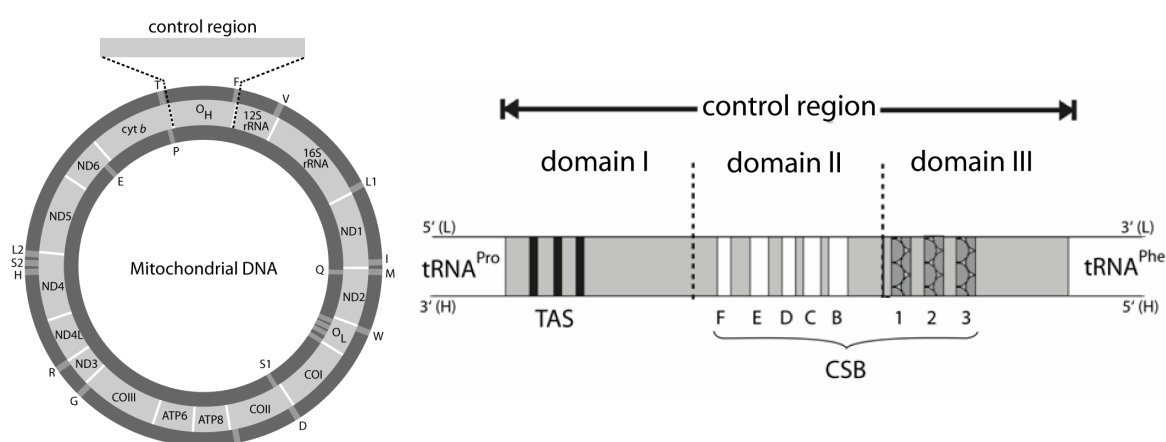
นอกจากนี้ ทาเคฮานะและคนอื่นๆ (Takehana; et al. 2004: 484-491) ยังได้ศึกษาความหลากหลายของ DNA บริเวณยีน cytochrome *b* ในไมโทคอนเดรียของปลา *O. latipes* ในประเทศเกาหลี และประเทศจีน ร่วมกับเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยการนำ phylogenetic tree พบว่าสามารถแบ่งปลา *O. latipes* เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มที่ 1 พบในประเทศจีน และทางฝั่งตะวันตกประเทศเกาหลี และกลุ่มที่ 2 พบทางตอนใต้และฝั่งตะวันออกของประเทศเกาหลี ข้อมูลที่ได้นี้ใช้เป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการแยกปลา *O. latipes* ของประเทศเกาหลี และประเทศจีนออกจาก *O. latipes* ของประเทศญี่ปุ่นได้

DNA ในไมโทคอนเดรีย และบริเวณควบคุม

การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลนั้นนอกจากจะศึกษาโดยใช้ DNA ในนิวเคลียสแล้ว ยังมีการศึกษา DNA ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA หรือ mtDNA) ด้วย ลักษณะของ DNA ในไมโทคอนเดรียเป็นวงแหวนสายคู่ โดยสายหนึ่งเรียกว่า H-strand (heavy strand) และอีกสายหนึ่งเรียกว่า L-strand (light strand) ซึ่งเรียกตามผลการปั่นเหวี่ยงของ DNA ในไมโทคอนเดรียในสภาวะเสียสภาพ (denature) DNA ในไมโทคอนเดรียประกอบด้วยยีนทั้งหมด 37 ยีน โดยมียีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน 13 ยีน ยีนสำหรับสร้าง rRNA 2 ยีน และยีนสำหรับสร้าง tRNA 22 ยีน นอกจากนี้ยังมีส่วนที่ไม่มีรหัสสำหรับยีนใดๆ (non-coding region) แต่เป็นบริเวณควบคุมที่เรียกว่า control region หรือ displacement loop (D-loop) ในสัตว์มีกระดูกสันหลังโดยทั่วไป รวมทั้งปลาชนิดต่างๆ มีโครงสร้างของ DNA ในไมโทคอนเดรียคล้ายกัน (ภาพประกอบ 10) และมีขนาดใกล้เคียงกัน ประมาณ 16000 คู่เบส สำหรับปลาหลายชนิดได้มีการรายงานการศึกษาขนาดของ DNA ในไมโทคอนเดรีย อาทิ spotted green pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*) มีขนาด 16488 คู่เบส (Yamanoue; et al. 2006: 29-39) zebrafish (*Danio rerio*) มีขนาด 16596 คู่เบส (Broughton; Milam; & Roe. 2001: 1958-1967) และปลาเมดากะ (*Oryzias latipes*) มีขนาด 16714 คู่เบส (Miya; et al. 2003: 121-138)

ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสัตว์นั้นนิยมใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน DNA ในไมโทคอนเดรีย เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสมหลายประการ เช่น ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ DNA ในไมโทคอนเดรียจะถ่ายทอดผ่านทางแม่เท่านั้น ทำให้สามารถโยงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาได้ และ DNA ในไมโทคอนเดรียมีอัตราการกลายสูงกว่า DNA ในนิวเคลียสประมาณ 5-10 เท่า ทำให้มีความหลากหลายมากกว่า จึงสามารถระบุความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันมากได้ดีกว่า (อุทัยรัตน์ ณ นคร; และ วงศ์ปฐม กมลรัตน์ 2551: 51-52)

บริเวณควบคุมนี้แบ่งเป็น 3 domain หลัก (ภาพประกอบ 11) ได้แก่ domain I: the termination-associated sequence (TAS), domain II: central conserved sequence block (CSB-F, CSB-E, CSB-D, CSB-C, CSB-B) และ domain III: conserved sequence block (CSB1, CSB2, CSB3) โดย TAS ซึ่งพบบริเวณปลาย 3' จะทำหน้าที่เป็นสัญญาณในการหยุดการสังเคราะห์ D-loop (Doda; Wright; & Clayton. 1981: 6116-6120) ส่วน CSB ที่พบบริเวณปลาย 5' (domain III) ทำหน้าที่เป็นสัญญาณในกระบวนการสังเคราะห์ RNA primer ที่จำเป็นในการเริ่มต้นการจำลองตัวของ H-strand (Bennet; & Clayton. 1990: 2191-2201) การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลาได้มีรายงานไว้ดังนี้



ภาพประกอบ 11 DNA ในไมโทคอนเดรียของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และโครงสร้างของบริเวณควบคุมซึ่งประกอบด้วย 3 domain ได้แก่ termination-associated sequence (TAS); central conserved sequence block (CSB-F, CSB-E, CSB-D, CSB-C, CSB-B) และ conserved sequence block (CSB1, CSB2, CSB3)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ruokonen, M. (2001). *Phylogeography and Conservation Genetics of the Lesser White-Fronted Goose (Anser erythropus)*. p. 18.

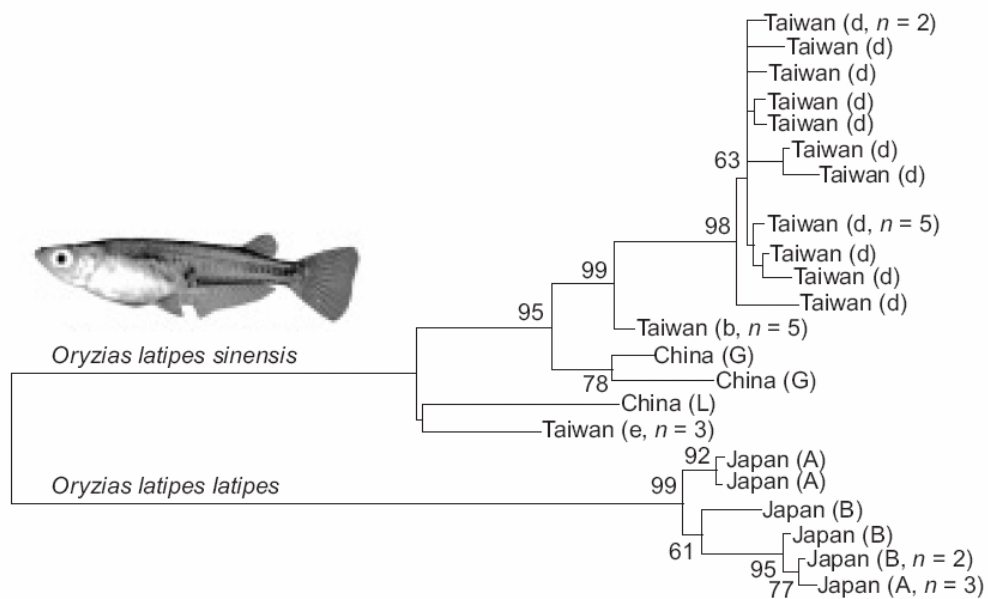
โนแอ็ค ซาร์โตยาและเมเยอร์ (Noack; Zardoya; & Meyer. 1996: 1165-1180) ศึกษา DNA ในไมโทคอนเดรียของปลา *Polypterus ornatipinnis* โดยอธิบายในส่วนของบริเวณควบคุมว่าที่บริเวณปลาย 3' พบ TAS (TACAT) และ palindromic motif (ATGTA) ซ้ำกัน 4 และ 3 ชุดตามลำดับ นอกจากนี้ในส่วนกลางของบริเวณควบคุมพบ CSB-D และปลาย 5' พบ CSB1, CSB2, และ CSB3 โดย CSB1 นั้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งคล้ายคลึงกับใน lungfish และในกบ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ cytochrome *b* และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี neighbour-joining และ maximum parsimony พบว่า *P. ornatipinnis* นั้นมีความใกล้ชิดกับ lungfish และ tetrapod มากกว่าในจำพวกปลาด้วยกัน

ยู หลิวและออบาน (Yue; Liew; & Orban. 2006: 1-13) อธิบายโครงสร้างของบริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียของปลา Asian arowana (*Scleropages formosus*) ซึ่งแบ่งเป็น 3 domain โดยมีรายละเอียดดังนี้ domain I มีขนาด 400 คู่เบส ประกอบด้วยบริเวณ TAS และ palindromic motif หลายชุดที่สามารถจับกันเป็นลักษณะ hairpin loop ได้ ส่วน domain II พบ conserved sequence block ที่มีความคล้ายคลึงกับของปลา rainbow trout และ sturgeon และ domain III พบ TA-dinucleotide microsatellite repeat, CSB1 และ CSB3

เขาและคนอื่นๆ (Zhao; et al. 2006: 793-799) ศึกษาโครงสร้างของบริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียของปลา sinipercine 7 ชนิด พบว่าใน domain I ประกอบด้วย TAS ซึ่งมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิด โดยใน *Siniperca chuatsi*, *S. Kneri*, *S. undulate* และ *Coreosiniperca roulei* พบ 4 ชุด ใน *S. obscura* พบ 3 ชุด ใน *Coreoperca whiteheadi* พบ 2 ชุด และใน *S. scherzeri* พบ 5 ชุด ส่วนใน domain II พบ CSB-F, CSB-E และ CSB-D และใน domain III พบ CSB1, CSB2 และ CSB3 ในปลาที่ศึกษาทุกชนิด นอกจากนี้เขาและคนอื่นๆ ยังได้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาทั้ง 7 ชนิด โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียโดยวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbour-joining และ maximum parsimony และพบว่าปลากลุ่ม *Siniperca* และกลุ่ม *Coreoperca* เป็น 2 กลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก

ด้วยคุณสมบัติของบริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียที่มีอัตราการเกิดวิวัฒนาการที่สูงกว่าบริเวณอื่น จึงมีความเหมาะสมในการใช้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาในระดับ intra-specific ตัวอย่างเช่น เซงและคนอื่นๆ (Tzeng; et al. 2006: 285-297) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียของ *Oryzias latipes* จากทางตอนเหนือของประเทศไต้หวัน ภาคตะวันออกภาคใต้ของประเทศจีน และทางภาคตะวันออกของประเทศญี่ปุ่น และจากการสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี neighbour joining (ภาพประกอบ 12) พบว่า *O. latipes* จากประเทศจีนและไต้หวันมีสายวิวัฒนาการแยกออกจาก *O. latipes* จากประเทศญี่ปุ่นอย่างชัดเจน ทำให้สามารถยืนยันการจัดจำแนกปลาชนิดนี้เป็น 2 subspecies ได้แก่ *O. latipes latipes* และ *O. latipes sinensis*

ดังนั้นจากรายงานวิจัยดังกล่าวแสดงว่าบริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียอาจสามารถใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลา *Oryzias* ในประเทศไทย รวมทั้งการแพร่กระจายและขอบเขตของชนิดใน *O. minutillus* ได้



ภาพประกอบ 12 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลา *Oryzias latipes* โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย ซึ่งวิเคราะห์ผลด้วยวิธี neighbour-joining และทำ bootstrap 5000 ครั้ง จากภาพแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 60% เท่านั้น

ที่มา: Tzeng, C.-S.; et al. (2006). *Zoological Studies* 45: 289.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างปลาที่ศึกษา

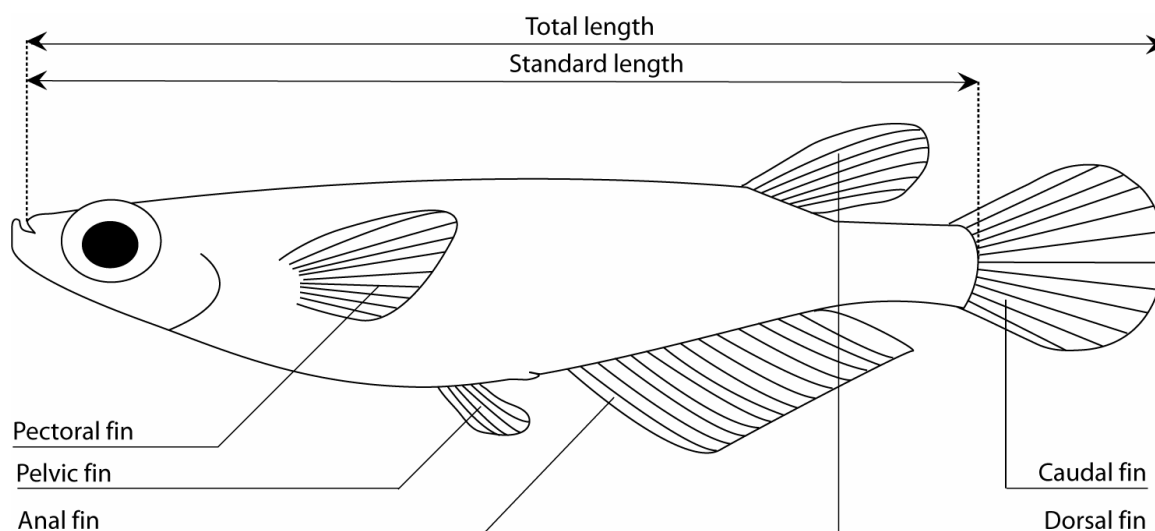
เก็บตัวอย่างปลา *Oryzias* 5 ชนิด เพื่อนำมาศึกษา ได้แก่ *Oryzias minutillus*, *O. mekongensis*, *O. javanicus*, *O. dancena* และ *O. celebensis* โดยมีรายละเอียดแหล่งที่เก็บตัวอย่างปลาแต่ละชนิดแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ชนิดของปลา *Oryzias* และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

ชนิดของปลา	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
<i>Oryzias minutillus</i>	จ. เชียงราย
<i>O. minutillus</i>	จ. สุรินทร์
<i>O. minutillus</i>	จ. สุพรรณบุรี
<i>O. minutillus</i>	จ. นครสวรรค์
<i>O. minutillus</i>	จ. สระบุรี
<i>O. minutillus</i>	จ. พระนครศรีอยุธยา
<i>O. minutillus</i>	จ. สระแก้ว
<i>O. minutillus</i>	จ. เพชรบุรี
<i>O. minutillus</i>	จ. ประจวบคีรีขันธ์
<i>O. minutillus</i>	จ. สงขลา
<i>O. minutillus</i>	จ. นครศรีธรรมราช
<i>O. minutillus</i>	โตนเลสาบ ประเทศกัมพูชา
<i>O. mekongensis</i>	จ. หนองคาย
<i>O. javanicus</i>	จ. ภูเก็ต
<i>O. dancena</i>	จ. ระนอง
<i>O. celebensis</i>	ประเทศอินโดนีเซีย

การศึกษาด้านสัณฐานวิทยาและการระบุชนิด

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของตัวอย่างปลา *Oryzias* ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ ความยาวเหยียด (total length) ความยาวมาตรฐาน (standard length) จำนวนก้านครีบอก (pectoral fin) ครีบท้อง (pelvic fin) ครีบหลัง (dorsal fin) ครีบทวาร (anal fin) และครีบหาง (caudal fin) และระบุชนิดของตัวอย่างตามวิธีของมากตุนและเติมวิชชากร (Magtoon; & Termvichakorn. 2009: 37)



ภาพประกอบ 13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของปลาสกุล *Oryzias* ประกอบด้วยความยาวเหยียด (total length) ความยาวมาตรฐาน (standard length) ครีบอก (pectoral fin) ครีบท้อง (pelvic fin) ครีบหลัง (dorsal fin) ครีบทวาร (anal fin) และครีบหาง (caudal fin)

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ เช่น ปีกเกอร์ กระบอกตวง จานเพาะเชื้อ แท่งคนสาร
2. ปากคีบ
3. แวนชยาย
4. เข็มเขี่ย
5. คาลิเปอร์เวอร์เนียร์ (digimatic caliper) รุ่น absolute digimatic
6. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
7. เครื่องชั่ง

สารเคมี

1. ฟอร์มาลิน 5%
2. เอทิลแอลกอฮอล์ 75%, 95%
3. สารละลายแอลเชียน บลู (alcian blue solution) (แอลเชียน บลู 0.02 กรัม ต่อกรดน้ำส้ม (30% ในเอทิลแอลกอฮอล์) 100 มิลลิลิตร)
4. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์
5. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
6. สารละลายอะลิซารีน เรด (alizarine red solution) (อะลิซารีน เรด 0.1 กรัม ต่อโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (0.01%) 100 มิลลิลิตร)
7. ทริปซิน (trypsin)
8. ผงโซเดียมบอเรต
9. กลีเซอริน
10. น้ำกลั่น
11. ไทมอล (thymol)

วิธีดำเนินการวิจัย

การวัดขนาด

นำตัวอย่างปลา *Oryzias* บางส่วนดองในฟอร์มาลินเข้มข้น 5% ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ 75% วัดขนาดของตัวอย่างตามวิธีการของฮับส์และแลกเลอร์ (Hubbs; & Lagler. 1967: 24-26) และนากาโบ (Nagabo. 2002: xxix-xxx) โดยใช้คาลิเปอร์เวอร์เนียร์ ที่มีความละเอียด 0.01 mm ในการวัดดังนี้

1. ความยาวมาตรฐาน วัดจากปลายสุดของปากบนไปจนถึงกระดูกหางข้อสุดท้าย
2. ความยาวเหยียด วัดจากปลายสุดของปากบนไปจนถึงปลายสุดของแพนหาง

การนับจำนวนก้านครีบ

ในการนับจำนวนก้านครีบนั้นจะใช้วิธีนับผ่านกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ หรือใช้วิธีการดองใสและย้อมสีกระดูกซึ่งดัดแปลงจากวิธีของดิงเกอร์คัสและอูลเลอร์ (Dingerkus; & Uhler. 1977: 229-232) ร่วมกับวิธีของพอททอฟ (Potthoff. 1984: 35-37) เพื่อให้เห็นจำนวนก้านครีบที่ชัดเจนโดยมีขั้นตอนดังนี้

1. กำจัดน้ำออกจากตัวปลาโดยนำตัวอย่างปลาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 75% แล้วเปลี่ยนเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ตามลำดับ ขั้นตอนละ 24 ชั่วโมง
2. นำตัวอย่างมาย้อมสีกระดูกอ่อนด้วยการแช่ในสารละลายแอลเชียน บลู เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3. ปรับระดับ pH ของสารละลายให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมบอโรอิมตัว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. ฟอกสีตัวปลาด้วยสารละลายซึ่งประกอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% ปริมาตร 15 ml ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.2% ปริมาตร 85 ml เป็นระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง

5. จากนั้นต้องใส่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.1% หรือแช่ในสารละลายทริปซิน จนกระทั่งกล้ามเนื้อของตัวอย่างค่อนข้างใส

6. ย้อมสีกระดูกแข็งด้วยสารละลายอะลิซาริน เรด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. ล้างสีออกจากกล้ามเนื้อของปลาให้เหลือติดเฉพาะที่กระดูกด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1% หรือแช่ในสารละลายทริปซิน จนกระทั่งกล้ามเนื้อของตัวอย่างใส

8. เก็บรักษาตัวอย่างในกลีเซอริน โดยค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นจาก 50%, 70% และ 100% ตามลำดับ เติมกลีเซอรินลงไปเล็กน้อยเพื่อป้องกันเชื้อรา

การนับจำนวนก้านครีบกจะใช้วิธีการของฮับส์และแลกเลอร์ (Hubbs; & Lagler. 1967: 19-21) และนากาโบ (Nagabo. 2002: xxx-xxxviii) ซึ่งมีหลักการดังนี้

1. จำนวนก้านครีบอก นับจำนวนก้านครีบก้านแรกจนถึงก้านครีบก้านสุดท้ายของครีบอก
2. จำนวนก้านครีบท้อง นับจำนวนก้านครีบก้านแรกจนถึงก้านครีบก้านสุดท้ายของครีบท้อง
3. จำนวนก้านครีบลึง นับจำนวนก้านครีบก้านแรกจนถึงก้านครีบก้านสุดท้ายของครีบลึง
4. จำนวนก้านครีบทวาร นับจำนวนก้านครีบก้านแรกจนถึงก้านครีบก้านสุดท้ายของครีบทวาร
5. จำนวนก้านครีบทาง โดยนับจำนวนก้านครีบก้านนี้

5.1 จำนวนก้านครีบก้านบนของครีบทาง (upper caudal fin ray) นับจำนวนก้านครีบก้านที่แตกแขนงของฐานด้านบนของครีบทาง

5.2 จำนวนก้านครีบก้านล่างของครีบทาง (lower caudal fin ray) นับจำนวนก้านครีบก้านที่แตกแขนงของฐานด้านล่างของครีบทาง

6. จำนวนข้อกระดูกสันหลัง โดยนับจำนวนข้อกระดูกสันหลังดังนี้

6.1 จำนวนข้อกระดูกสันหลังทั้งหมด (total vertebrae) นับจำนวนข้อกระดูกสันหลังจากกระดูกสันหลังข้อแรกที่ส่วนหัวจนถึงข้อกระดูกสันหลังข้อสุดท้ายก่อนกระดูกฐานครีบทาง

6.2 จำนวนข้อกระดูกสันหลังหน้าทวาร (abdominal vertebrae) นับจำนวนข้อกระดูกสันหลังจากกระดูกสันหลังข้อแรกที่ส่วนหัวจนถึงข้อกระดูกสันหลังตรงตำแหน่งที่ตั้งฉากกับก้านครีบทวารก้านแรก

6.3 จำนวนข้อกระดูกสันหลังหลังทวาร (caudal vertebrae) นับจำนวนข้อกระดูกสันหลังจากตำแหน่งที่ตั้งฉากกับก้านครีบทวารก้านแรกจนถึงข้อกระดูกสันหลังข้อสุดท้ายก่อนกระดูกฐานครีบทาง

7. จำนวนกระดูกค้ำจุนเหงือก (branchiostegal rays หรือ BOG) นับจำนวนซี่กระดูกค้ำจุนเหงือกซึ่งอยู่ใต้กระดูกปิดเหงือก

การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

อุปกรณ์

1. Micropipette
2. Microcentrifuge tube
3. Microcentrifuge
4. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (MiniCycler™ MJ Research)
5. ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส
6. UV transilluminator
7. กล้องถ่ายรูป Vilber Lourmat
8. ตู้เย็น 4°C และ -20°C
9. Water bath
10. เต้าไมโครเวฟ

สารเคมี

1. Agarose
2. Ampicillin
3. Boric acid
4. DNeasy® Tissue Kit
5. dNTPs (deoxynucleoside triphosphates)
6. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)
7. Ethidium bromide
8. 2-Log DNA Ladder
9. IPTG (isopropylthiogalactoside)
10. Isopropanol
11. LB broth (tryptone (1%, w/v), Bacto™ yeast extract (0.5%, w/v), NaCl (1%, w/v))
12. Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2% sodium dodecyl sulphate)
13. Nuclease-free water
14. PCR buffer
15. pGEM®-T Easy Vector System I
16. Potassium acetate
17. Proteinase K
18. QIAGEN® Plasmid Mini Kit

19. QIAquick™ Gel Extraction Kit
20. RNase A
21. *Taq* DNA polymerase
22. X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside)

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัด DNA โดยใช้ DNeasy® Tissue Kit

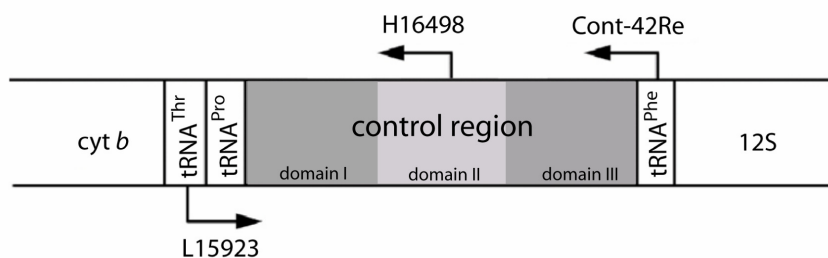
นำตัวอย่างปลาแต่ละตัวมาบด จากนั้นเติม lysis buffer ปริมาตร 180 µl และ proteinase K ปริมาตร 20 µl บดต่อให้ละเอียดแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นเติม RNase A ปริมาตร 4 µl ทิ้งไว้ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมนัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากัน เติมนิวคลีโอซอล์สมบูรณ์ 200 µl ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน DNeasy column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5220 xg เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง เติมนัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5220 xg เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติมนัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 16000 xg เป็นเวลา 3 นาที สะ DNA ออกด้วยการเติมนิวคลีโอซอล์-free water 100 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5220 xg เป็นเวลา 1 นาที นำ DNA ที่ได้เก็บไว้ในตู้เย็น -20°C

การเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณ DNA บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลา *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ดังตาราง 4 โดยภาพประกอบ 14 แสดงตำแหน่งการจับของ primer บน DNA ของไมโทคอนเดรียอย่างคร่าวๆ แต่ละ PCR reaction มีปริมาตร 25 µl ซึ่งประกอบด้วย สารต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 50 ng genomic DNA template, 1X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 1 µM forward primer, 1 µM reverse primer และ 0.5 unit *Taq* DNA polymerase

ตาราง 4 Primer สำหรับการทำ PCR และ DNA sequencing

Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer 5' → 3'	ทิศทาง	เอกสารอ้างอิง
L15923	5'-TTA AAG CAT CGG TCT TGT AA-3'	forward	Iguchi; & Nishida. 2000
H16498	5'-CCT GAA GTA GGA GGA ACC AGA TG-3'	reverse	Iguchi; & Nishida. 2000
Cont-42Re	5'-CTT AAC ATC TTC AGT GTT ATG CTT T-3'	reverse	Kang; et al. 2005



ภาพประกอบ 14 ตำแหน่งการจับของ primer บน DNA ของไมโทคอนเดรีย

นำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง MiniCycler™ MJ Research โดยกำหนด อุณหภูมิและเวลาดังต่อไปนี้

	คู่ primer		คู่ primer	
	L15923 และ H16498		L15923 และ Cont-42Re	
ขั้นที่ 1 Initial heating	94°C	2 นาที	94°C	2 นาที
ขั้นที่ 2 Denaturation	94°C	1 นาที	94°C	1 นาที
ขั้นที่ 3 Annealing	50°C	1 นาที	55.4°C	1 นาที
ขั้นที่ 4 Extension	72°C	1 นาที	72°C	1 นาที
ขั้นที่ 5 Final extension	72°C	2 นาที	72°C	10 นาที

สำหรับ PCR reaction ทั้งหมด ทำซ้ำในขั้นที่ 2 ถึงขั้นที่ 4 จำนวน 30 รอบ จากนั้นนำ PCR product บางส่วนมาตรวจโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดของ PCR product กับ DNA มาตรฐาน (2-Log DNA Ladder)

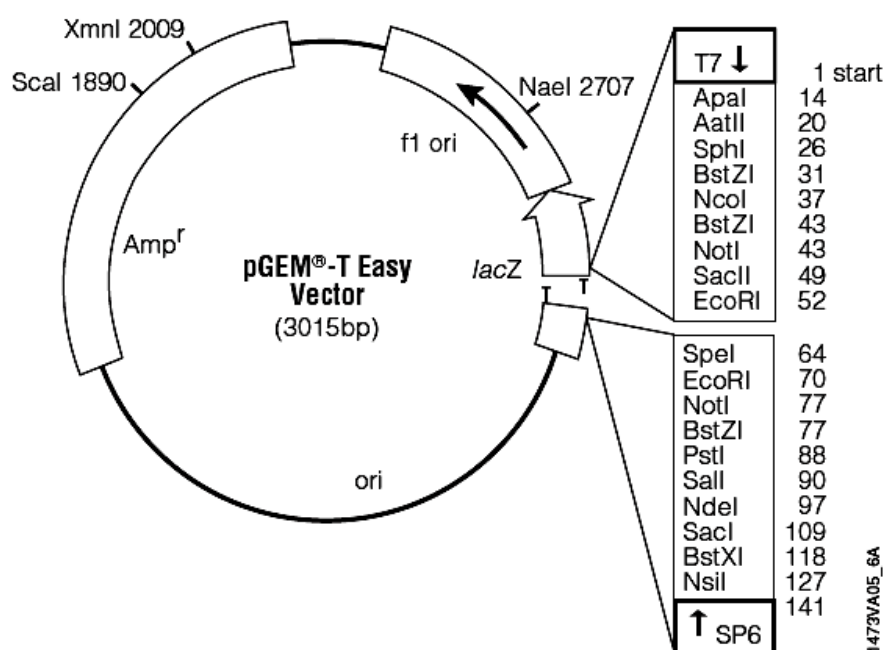
การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

จากการตรวจดูผล PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis เลือกตัดแถบ ขนาดของชิ้น DNA ที่ต้องการ จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick™ Gel Extraction Kit ด้วยวิธีตามคู่มือดังต่อไปนี้ เติมน้ำบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักริโบนิวคลีอิกที่ตัดได้ ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 10 นาที จนเจลละลายหมด จากนั้นเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 10 µl และ isopropanol ปริมาตรเท่ากับน้ำหนักริโบนิวคลีอิก ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน QIAquick column นำไปปั่นเหวี่ยง นาน 2 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่าน column ทั้งหมด เติมน้ำบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 µl ทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่าน column ทั้งหมด เติมน้ำบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 µl ตั้งทิ้งไว้ 2-5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่าน column ทั้งหมด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาทีอีกครั้ง นำ column ไปวางบน microcentrifuge

tube ขนาด 1.5 ml ชะ DNA ออกด้วยการเติม nuclease-free water ปริมาตร 35 μ l ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง เป็นเวลา 1 นาที ในการปั่นเหวี่ยงแต่ละครั้งใช้ความเร็ว 13800 xg นำ DNA ที่ได้ไปตรวจสอบอีกครั้งด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

การโคลนชิ้น PCR product

เลือกใช้พลาสมิด pGEM[®]-T Easy Vector ในการโคลนชิ้น PCR product ที่ได้จากคู่ primer L15923 และ Cont-42Re โดยแผนที่ของพลาสมิดที่ใช้แสดงในภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 แผนที่ของ pGEM[®]-T Easy Vector

ที่มา: คู่มือ pGEM[®]-T Easy Vector System I

การเชื่อมต่อกัน PCR product กับ DNA vector

การเชื่อมต่อกัน PCR product บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียที่ได้จากคู่ primer L15923 และ Cont-42Re ของ *O. minutillus*, *O. mekongensis*, *O. javanicus*, *O. dancena* และ *O. celebensis* กับ pGEM[®]-T Easy Vector ทำใน reaction ปริมาตร 15 μ l โดยใช้ molar ratio ที่เหมาะสมระหว่าง DNA vector กับ insert พร้อมด้วย 3 units ของ T₄ DNA ligase และ 1X Rapid Ligation Buffer เติม nuclease-free water เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 15 μ l ผสมส่วนผสมทั้งหมดเบาๆ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ recombinant DNA

การนำ recombinant DNA เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและคัดเลือกโดยวิธี blue-white

การนำ recombinant DNA เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue มีขั้นตอนดังนี้ ผสม ligation mixture ปริมาตร 15 μ l และ competent cell ปริมาตร 150 μ l ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42°C นาน 2 นาที แล้วย้ายกลับไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 20 นาที เติม LB broth ปริมาตร 1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไป spread ลงบน LB agar ที่เติม ampicillin (100 μ g/ml), X-gal (40 mg/ μ l) และ IPTG (200 ng/ml) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน

คัดเลือกโคโลนีที่มี recombinant DNA ด้วยวิธี blue-white โดยอาศัยหลักการที่พลาสมิด pGEM®-T Easy Vector มีบริเวณสำหรับการโคลนอยู่ในยีน *lacZ* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -galactosidase ที่สามารถย่อย X-gal และทำให้เปลี่ยนจากไม่มีสีให้เป็นสีน้ำเงิน ดังนั้นโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่ปราศจาก recombinant DNA จะมีสีน้ำเงิน เนื่องจากยังมียีน *lacZ* ที่สมบูรณ์ ในขณะที่โคโลนีที่ได้รับชิ้น recombinant DNA จะมีสีขาว เนื่องจากไม่มีการสร้างเอนไซม์ β -galactosidase เพื่อย่อย X-gal

เลือกโคโลนีสีขาว 10-15 โคโลนี มา streak บนอาหาร LB agar ที่มี ampicillin (100 μ g/ml) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน

การตรวจสอบ recombinant DNA ที่ต้องการและการสกัดพลาสมิด

การตรวจสอบ recombinant DNA ที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบ recombinant DNA ที่ต้องการโดยการนำโคโลนีสีขาวที่เลือกไว้มาทำ PCR โดยใช้คู่ primer L15923 และ Cont-42Re พร้อมด้วยอุณหภูมิและเวลาตามที่กล่าวแล้วข้างต้น จากนั้นนำ PCR product บางส่วนมาตรวจโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis

การสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAGEN Plasmid Mini Kit

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มี recombinant DNA ที่ต้องการของ *O. minutillus*, *O. mekongensis*, *O. javanicus*, *O. dancena* และ *O. celebensis* ชนิดละ 2 โคโลนี (1 โคโลนี จากปลา 1 ตัว) นำไปเลี้ยงต่อในอาหาร LB broth ปริมาตร 3 ml พร้อมด้วย ampicillin (100 μ g/ml) บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่า จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาที แล้วเทอาหารทิ้ง ใส่บัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 300 μ l และบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 300 μ l ผสมเบาๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติimbัฟเฟอร์ P3 ปริมาตร 300 μ l นำสารละลายที่ได้แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงนาน 10 นาที นำสารละลายที่ได้ใส่ใน QIAGEN-tip ที่เตรียมไว้ (โดยการเติimbัฟเฟอร์ QBT 1 ml) รอจนสารละลายค่อยๆ หยดจนหมด จากนั้นล้าง QIAGEN-tip ด้วยบัฟเฟอร์ QC 2 ml 2 ครั้ง ย้าย QIAGEN-tip มาวางใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ใส่บัฟเฟอร์ QF ปริมาตร 800 μ l ผ่าน QIAGEN-tip เติม isopropanol ปริมาตร 560 μ l นำไป

ปั่นเหวี่ยงนาน 30 นาที ค่อยๆ เทสารละลายทิ้ง ล้าง DNA pellet ด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 70% 1 ml ทิ้งให้แห้ง จากนั้นเติม nuclease-free water 35 μ l เก็บ DNA ที่ได้ในตู้เย็น -20°C ในการปั่นเหวี่ยงแต่ละครั้งใช้ความเร็ว 13800 xg

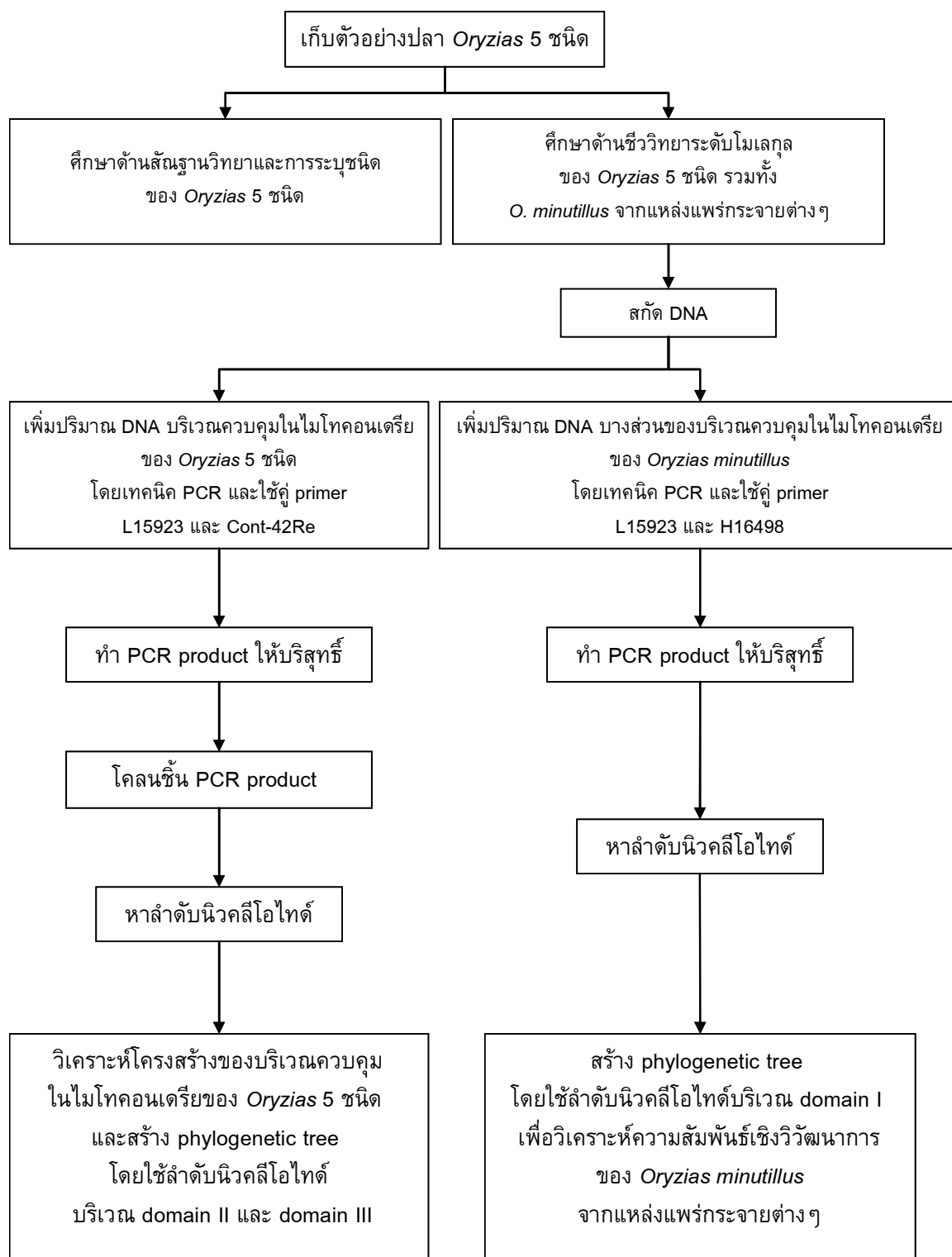
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ PCR product ที่บริสุทธิ์ของ *O. minutillus* ที่ได้จากคู่ primer L15923 และ H16498 และพลาสมิดที่มีชิ้น DNA ที่ต้องการของ *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิดที่ได้จากคู่ primer L15923 และ Cont-42Re ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเทคนิค DNA sequencing ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) และการสร้าง phylogenetic tree

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลา *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด โดยในแต่ละชนิดใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเอกฉันท์ (consensus sequence) จากทั้ง 2 โคลน ด้วยโปรแกรม Clustal X (Jeanmougin; et al. 1998: 403-405) และวิเคราะห์โครงสร้างของบริเวณควบคุมทั้ง 3 domain โดยเทียบกับบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลาในกลุ่มปลาเก๋า (sinipercine) (Zhao; et al. 2006: 793-799) ปลาการ์ฟ และ zebrafish (Guo; Liu; & Liu. 2003: 25-38) ในการสร้าง phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม PAUP* version 4.0b (Swofford. 1998) โดยวิธี parsimony (branch-and-bound search) ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะใน domain II และ domain III ซึ่งมีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เข้ากันได้อย่างชัดเจน (ไม่มี ambiguous site) และใช้ *Cololabis saira* (GenBank accession number AP002932) เป็น outgroup

สำหรับ *O. minutillus* ที่ได้จากแหล่งแพร่กระจายต่างๆ นั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย (domain I) มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Clustal X และสร้าง phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม PAUP*version 4.0b ด้วยวิธีเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ใช้ *O. dancena* และ *O. celebensis* เป็น outgroup



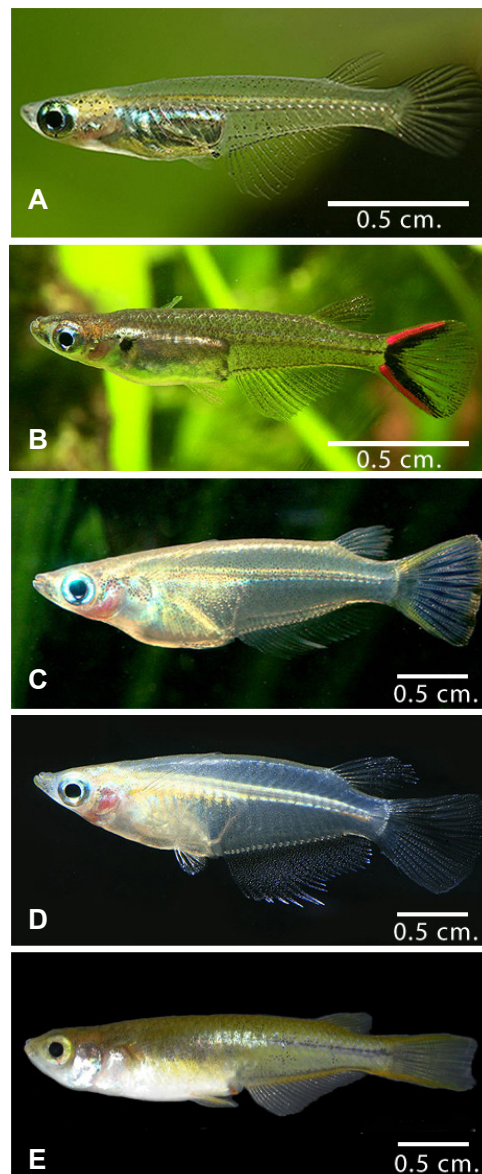
ภาพประกอบ 16 ภาพสรุปวิธีดำเนินการวิจัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของปลาสกุล *Oryzias minutillus*, *O. mekongensis*, *O. javanicus*, *O. dancena* และ *O. celebensis* ดังภาพประกอบ 17



ภาพประกอบ 17 ปลา *Oryzias* 5 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษา *Oryzias minutillus* (A), *O. mekongensis* (B), *O. javanicus* (C), *O. dancena* (D), และ *O. celebensis* (E)

ลักษณะสัณฐานวิทยาบางประการของ *Oryzias* 5 ชนิด

Oryzias minutillus

มีความยาวมาตรฐานเฉลี่ย 11.98 มิลลิเมตร และความยาวเหยียดเฉลี่ย 15.18 มิลลิเมตร ลำตัวใสไม่มีสีตลอดทั้งลำตัว มีจำนวนก้านครีบอก 6-8(7) ก้าน จำนวนก้านครีบท้อง 4-5(5) ก้าน จำนวนก้านครีบท้อง 5-6(6) ก้าน จำนวนก้านครีบทวาร 17-21(18) ก้าน จำนวนก้านครีบทวารที่แตกแขนงของฐานด้านบนของครีบทวาร 3 ก้าน ส่วนจำนวนก้านครีบทวารที่แตกแขนงของฐานด้านล่างของครีบทวาร 4 ก้าน จำนวนกระดูกสันหลังทั้งหมด 24-27(25) ข้อ แบ่งเป็นกระดูกสันหลังหน้าทวาร 9-11(10) ข้อ และกระดูกสันหลังหลังทวาร 15-16(16) ข้อ และมีจำนวนกระดูกค้ำจุนเหงือก (branchiostegal rays หรือ BOG) 4 คู่

Oryzias mekongensis

มีความยาวมาตรฐานเฉลี่ย 12.15 มิลลิเมตร และความยาวเหยียดเฉลี่ย 15.42 มิลลิเมตร มีจำนวนก้านครีบอก 7-8(7) ก้าน จำนวนก้านครีบท้อง 6 ก้าน จำนวนก้านครีบท้อง 6-7(6) ก้าน จำนวนก้านครีบทวาร 15-16(16) ก้าน จำนวนก้านครีบทวารของฐานด้านบนของครีบทวาร ก้านครีบทวารที่แตกแขนง 4 ก้าน ส่วนจำนวนก้านครีบทวารของฐานด้านล่างของครีบทวาร มีจำนวนก้านครีบทวารที่แตกแขนง 5 ก้าน มีจำนวนกระดูกสันหลังทั้งหมด 26-29(27) ข้อ แบ่งเป็นกระดูกสันหลังหน้าทวาร 11-12(11) ข้อ และกระดูกสันหลังหลังทวาร 15-17(16) ข้อ และมีจำนวนกระดูกค้ำจุนเหงือก 4 คู่

Oryzias javanicus

มีความยาวมาตรฐานเฉลี่ย 25.69 มิลลิเมตร และความยาวเหยียดเฉลี่ย 31.87 มิลลิเมตร มีจำนวนก้านครีบอก 10-12(12) ก้าน จำนวนก้านครีบท้อง 6 ก้าน จำนวนก้านครีบท้อง 7 ก้าน จำนวนก้านครีบทวาร 23-24(23) ก้าน จำนวนก้านครีบทวารของฐานด้านบนของครีบทวาร มีจำนวนก้านครีบทวารที่แตกแขนง 4-5(4) ก้าน ส่วนจำนวนก้านครีบทวารของฐานด้านล่างของครีบทวาร มีจำนวนก้านครีบทวารที่แตกแขนง 5 ก้าน มีจำนวนกระดูกสันหลังทั้งหมด 28-29(29) ข้อ แบ่งเป็นกระดูกสันหลังหน้าทวาร 11 ข้อ และกระดูกสันหลังหลังทวาร 17-18(18) ข้อ และมีจำนวนกระดูกค้ำจุนเหงือก 5 คู่

Oryzias dancena

มีความยาวมาตรฐานเฉลี่ย 24.75 มิลลิเมตร และความยาวเหยียดเฉลี่ย 31.01 มิลลิเมตร มีจำนวนก้านครีบอก 10-11(11) ก้าน จำนวนก้านครีบท้อง 6 ก้าน จำนวนก้านครีบท้อง 7-8(7) ก้าน จำนวนก้านครีบทวาร 22-24(22) ก้าน จำนวนก้านครีบทวารของฐานด้านบนของครีบทวาร มีจำนวนก้านครีบทวารที่แตกแขนง 4-5(4) ก้าน ส่วนจำนวนก้านครีบทวารของฐานด้านล่างของครีบทวาร มีจำนวนก้านครีบทวารที่แตกแขนง 4-5(5) ก้าน มีจำนวนกระดูกสันหลังทั้งหมด 27-28(28) ข้อ แบ่งเป็นกระดูกสันหลังหน้าทวาร 11 ข้อ และกระดูกสันหลังหลังทวาร 16-17 ข้อ และมีจำนวนกระดูกค้ำจุนเหงือก 5 คู่

Oryzias celebensis

มีความยาวมาตรฐานเฉลี่ย 27.94 มิลลิเมตร และความยาวเหยียดเฉลี่ย 34.03 มิลลิเมตร มีจำนวนก้านครีบอก 8-9(9) ก้าน จำนวนก้านครีบท้อง 6 ก้าน จำนวนก้านครีบท้อง 7-9(8) ก้าน จำนวนก้านครีบทวาร 20-22(22) ก้าน จำนวนก้านครีบทวารของฐานด้านบนของครีบทวาร มีจำนวนก้านครีบทวารที่แตกแขนง 4-5(5) ก้าน ส่วนจำนวนก้านครีบทวารของฐานด้านล่างของครีบทวาร มีจำนวนก้านครีบทวารที่แตกแขนง 4-5(4) ก้าน มีจำนวนกระดูกสันหลังทั้งหมด 29-31(30) ข้อ แบ่งเป็นกระดูกสันหลังหน้าทวาร 11-12(11) ข้อ และกระดูกสันหลังหลังทวาร 18-19(19) ข้อ และมีจำนวนกระดูกค้ำจุนเหงือก 5 ซี่

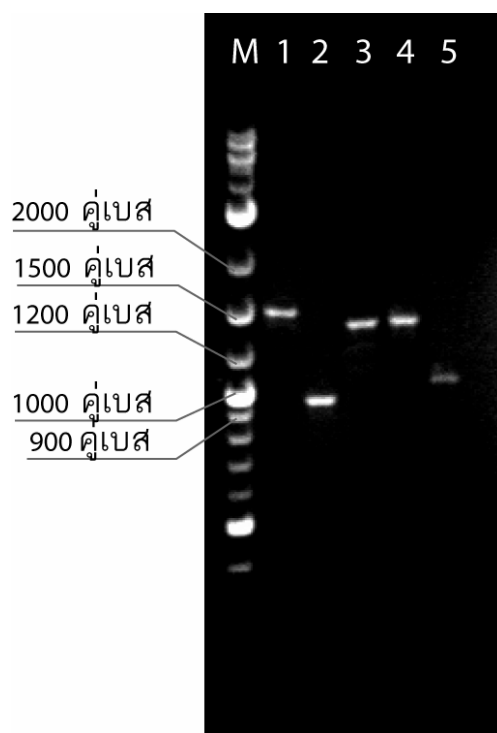
ตาราง 6 สรุปค่าการวัดและนับส่วนต่างๆ ของ *Oryzias* 5 ชนิด

	<i>O. minutillus</i>	<i>O. mekongensis</i>	<i>O. javanicus</i>	<i>O. dancena</i>	<i>O. celebensis</i>
ความยาวมาตรฐาน (มม.)	11.98	12.15	25.69	24.75	27.94
ความยาวเหยียด (มม.)	15.18	15.42	31.87	31.01	34.03
จำนวนก้านครีบทวาร					
ครีบทวาร (ก้าน)	6-8(7)	7-8(7)	10-12(12)	10-11(11)	8-9(9)
ครีบท้อง (ก้าน)	4-5(5)	6	6	6	6
ครีบท้อง (ก้าน)	5-6(6)	6-7(6)	7	7-8(7)	7-9(8)
ครีบทวาร (ก้าน)	17-21(18)	15-16(16)	23-24(23)	22-24(22)	20-22(22)
ครีบทวาร (ก้าน)					
ก้านที่แตกแขนงของฐานครีบทวารส่วนบน (ก้าน)	3	4	4-5(4)	4-5(4)	4-5(5)
ก้านที่แตกแขนงของฐานครีบทวารส่วนล่าง (ก้าน)	4	5	5	4-5(5)	4-5(4)
จำนวนข้อกระดูกสันหลังทั้งหมด (ข้อ)	24-27(25)	26-28(27)	28-29(29)	27-28(28)	29-31(30)
จำนวนข้อกระดูกสันหลังด้านท้อง (ข้อ)	9-11(10)	11-12(11)	11	11	11-12(11)
จำนวนข้อกระดูกสันหลังด้านหาง (ข้อ)	15-16(16)	15-17(16)	17-18(18)	16-17	18-19(19)
จำนวนกระดูกค้ำจุนเหงือก (ซี่)	4	4	5	5	5

การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุล

การสกัด DNA และการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียด้วยเทคนิค PCR

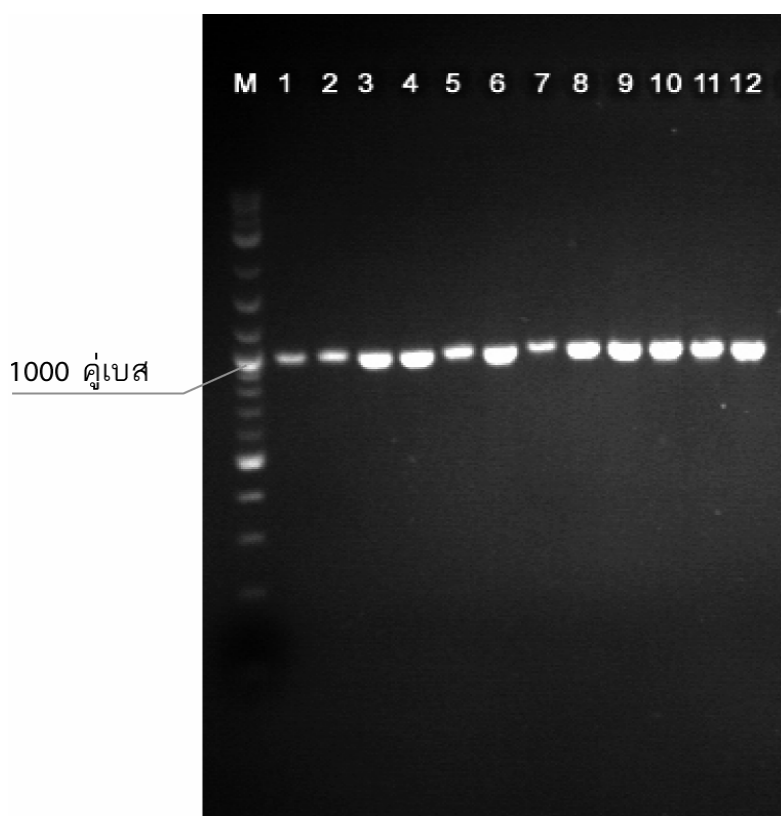
การสกัด DNA จาก *Oryzias* 5 ชนิด โดยใช้ DNeasy Tissue Kit™ และเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลา *Oryzias* 5 ชนิด จากการทำ PCR โดยใช้คู่ primer L15923 และ Cont-42Re ได้ PCR product ของ *Oryzias* แต่ละชนิดที่มีขนาดที่แตกต่างกัน (ดังภาพประกอบ 18) คือ *O. minutillus* มีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส *O. mekongensis* มีขนาดประมาณ 1000 คู่เบส *O. javanicus* มีขนาดประมาณ 1400 คู่เบส *O. dancena* มีขนาดประมาณ 1400 คู่เบส และ *O. celebensis* มีขนาดประมาณ 1100 คู่เบส



ภาพประกอบ 18 PCR product บริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียของ *Oryzias* 5 ชนิดโดยใช้คู่ primer L15923 และ Cont-42Re แสดงดังนี้ lane 1: *O. minutillus* lane 2: *O. mekongensis* lane 3: *O. javanicus* lane 4: *O. dancena* lane 5: *O. celebensis* โดย lane M คือ 2-Log DNA Ladder

การเพิ่มปริมาณ DNA บางส่วนของบริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียด้วยเทคนิค PCR

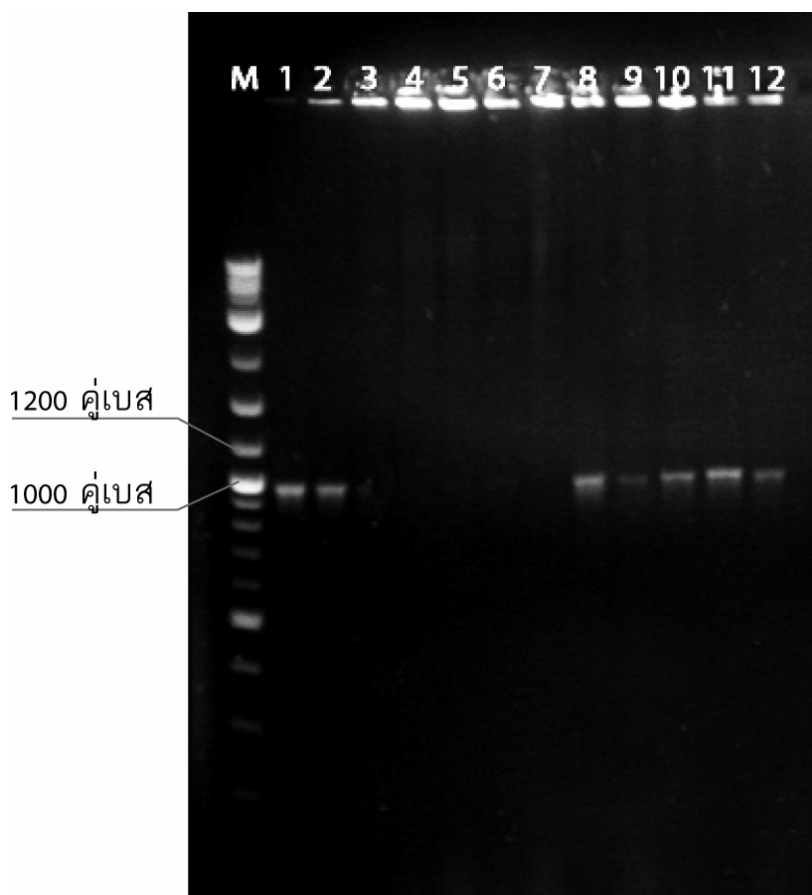
เพิ่มปริมาณ DNA บริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียของ *O. minutillus* 11 แหล่งในประเทศไทย และ 1 แหล่งจากประเทศกัมพูชา ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ primer L15923 และ H16498 ได้ PCR product ของ *O. minutillus* แต่ละแหล่ง มีขนาดประมาณ 1000 คู่เบส (ภาพประกอบ 19)



ภาพประกอบ 19 PCR product บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *O. minutillus* ในแต่ละแหล่งโดยใช้คู่ primer L15923 และ H16498 แสดงดังนี้ lane 1: จ. เชียงราย lane 2: จ. สุรินทร์ lane 3: จ. สุพรรณบุรี lane 4: จ. นครสวรรค์ lane 5: จ. สระบุรี lane 6: จ. พระนครศรีอยุธยา lane 7: จ. สระแก้ว lane 8: จ. เพชรบุรี lane 9: จ. ประจวบคีรีขันธ์ lane 10: จ. สงขลา lane 11: จ. นครศรีธรรมราช lane 12: โตนเลสาบ ประเทศกัมพูชา โดย lane M คือ 2-Log DNA Ladder

การโคลนชิ้น PCR product เข้าสู่พลาสมิด

นำชิ้น PCR product ที่บริสุทธิ์ของ *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้คู่ primer L15923 และ Cont-42Re เชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy จากนั้นนำ recombinant DNA ที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue คัดเลือกโคโลนีด้วยวิธี blue-white โดยเลือกโคโลนีสีขาว และตรวจสอบโคโลนีสีขาวที่มี recombinant DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ primer ข้างต้น ตรวจสอบผล PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ภาพประกอบ 20) นำโคโลนีที่พบ recombinant DNA มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAGEN Plasmid Mini Kit และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพประกอบ 20 ตัวอย่างผลจากการตรวจสอบโคลนีสีขาวที่มี recombinant DNA ด้วยเทคนิค PCR ของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียใน *O. mekongensis* โดย lane ที่ 1-2 และ 8-12 พบ recombinant DNA ที่ต้องการ ประกอบด้วยบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียขนาดประมาณ 1000 คู่เบส

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *O. minutillus*, *O. javanicus*, *O. dancena*, *O. celebensis*, และ *O. mekongensis* มีขนาด 1305, 1256, 1226, 841 และ 786 คู่เบส ตามลำดับ โดยพบนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิด (ชนิดละ 2 โคลน) ดังนี้ *O. minutillus* พบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ 6 ตำแหน่ง *O. mekongensis* พบ 22 ตำแหน่ง *O. dancena* พบ 15 ตำแหน่ง *O. javanicus* พบ 4 ตำแหน่ง และ *O. celebensis* ไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด แสดงในตาราง 7 และรายละเอียดของนิวคลีโอไทด์แสดงในตาราง 8

ตาราง 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเอกพันธ์ของ *Oryzias* 5 ชนิด ที่ได้จาก PCR product โดยใช้คู่ primer L15923 และ Cont-42Re

O. minutillus

CCGAGATCTGCCCCACGACTAATTTTCGCTTAAAGTTGACTATATTTTTCAGACCTAAAAATCCAACCCACGCGATCGTTATCGRTGA
GTTTACCAGACTCTTCCAAAAATGACCCCTYTAACCCACGACTTATCCAATATCAAAAAATTGAGAGACTAAACCCGTCCGAGGGGTGCG
CGAGTACCGCCCTATTTTCCCGAGCCCCGCCACAGCCAAAATCAATCGGCGAAATTTCTCAAAAATTGGGTCAAAATGCGGAGCT
CTTCCAAAAAATGGCCAAAAAATGGCCAAAAAGCTGCCGAGTACCGCCCGAAAATTTTCTACTAAAAAACATAGGCGCGAGGCC
TTCAATTTTTTTTTATGCAAGTACATATATGTATATAGGCGATAAATTTGAATGAGGCACATCCTCGATTGGCTCATAAAGTTAATGGTT
GACAAGACTTCAAGGAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAAATGCACCTCTCTTAATTAAGCATAGATCGGTGTGAATGTTTTGTTCCAT
GATCGATAGAAATCAATAGAAGAAATCATTCACTCAAAACAGCACTTCTTAATATCTGGCATACCTAAAAATGTAAGCATCCTTTCAC
AAGTCTCCTCATCATTCAAAGGTTGTACTTATTGTATCCTTGTGTTGAGCCCAATRACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGATAAGTAC
ATATTCCGTCGAGACACCGTCAATCAGTTATAACTTAAAGTTAACTCTTATTGAAAGGTCAGGGTCCACATCTTGGGGGTGACACACC
AGTGAACATTACTGGCATCTGGTTCCTATTTTCAGGTCCATTYRCCATTAATACTCATTCTGTTCTTGAACCTGACATAAGTTAATGG
TGGAGTACATATTCTGAAGTTACCCACCATGCCGAGCATCTTTCCATAGGGCTATGGGTTTTTTTTTCTAAATTTTACCTGGCAT
CTCACAGTGCAGCGCTAAGGCTAACTAAACAGGCTGTACATCTAGACAATCTGCCGCTAATAATGTTGATAGTAAAGATATT
CGTTTTTAAATTCGACATACTGATCTAGAGCATAAATCATAAAATGAAACTCTTAAATTTCTATGATTTTTCCCCCGGCTTTTGC
GGGTCAAACCCCCCTACCCCCCAATCTCGAGAGATGACTATGACTCTGCAAACCCCCCGGAACAGGAAAAATCCCTACTAGTATT
TTTTGATGCCCCCTTTGTAAAATTTTGGCGTGTATTTACACTATTAATAATGCAAAAT

O. mekongensis

CCGGGCTCTGCCCCARGGCCGATTTTTGTCCCTAAATACTTATATGTAATATCACCATTAAATAGAWYTAAACCATTTTTGCCTAGTATAYAMGTCCATGC
ATCCAAATTTATTTTACCATAGGGTACATACCTACGATTGGTTTAAATCGGCACAAGTGTGCCACAGCTAGTTTCAAGTCATCCACATCTTCTTTCGATT
GTTACTTAATGTAGTAAGAGACCACCATCAGTTGATTCTTAATGCTAACGTTTCTTGATGGTCAGGGACAGAAATYGTGGGGGTTTCACTTAGTGAACAT
TCCTGGCATTGGTTCCTATTTCCAGKCCATATWRACCTTATTACCCATACGTTCTTTGAAGCTTGCTAAGTTAATGGTGGAGTACATATCTCTGTTACC
CACCATGCCGGGCGTTCTTTCTAATGGGCAACGGGTTTTTTTTTCKATTTCCTTTCACCTTGCCATTTCAGAGTGCACACGGTATRAACAARACAGGKTGAR
CATTTAGAAATCGCGCGCAAGAAATATTGGTGAATWGTGTATATGACTTTGATAGAWCATAGCATAACTGATATCATGAGCATAAAGAGTATTGAATCTA
GAAGAACTCTATGAATTCYWCCTCGGCTTTTGGGGTCAAACCCCCCTACCCCCCAATACTAGTGAGATATCTGCTATTCTGCAAACCCCCCGGAA
CAGGAAAAATCCCTACTTGTATTTTTGTTTTCCCTTGTGTTGTGATTTTACATTATTGCAAAATATTGCAAAA

O. javanicus

CCGAGCTCTGCCTGCAACCAACCTACAGAAGTACCCCYAAACACCTCTCAAAAATTTGGTTATTACTTGTGTCACAACTAACTTGACATAAAAATTCGCCAA
AAACGTCACCTCTGACTTTTCCCTGACCGACCTCCGAGTACTTCCAAAAAGCACTACCAATCCCCGGCATCTCTAACACTAAAAATTGAGCGCAAAACCC
GTCTACAGGGTAGCCAAATACCGCCCTATTTGGGCGGAGCTCCGCTTTGGTCAAAAAGGTCTGTAATTTCTCCGTCAAAAATTTCCCTAAAAACCGCGGAGG
CCCGCCAAAAAAGCCCAAAAAACGCAAAAATTTGCCGGACACTGCCGGATGACCAAAACCCCTTCAAGCGCTCACCTTAAAGCCCCCGGCCCTTTT
TGTCAATTACGACATATATGTATAATCCGCATACGTTCAATGAGGGAGCATCCGCGATTGGCACAAAACTTAACGGTTTGGCGACTTCATTAGAAGATT
CATTCAATCAATAAATACACTCTCTTAGTCTGGCTTAGATCGTGAATCCAAATCTTTCAAGATATCAACATTCAACAAAAATAACCCCACTTATCC
TTGATAATCAGGGACAGAACTGTGGGGATTTCACAAGGTGAATATTACTGGCATATTTCCGCAAGAGCCCACTCAGTTGATACTTAAATGTTAACAGAC
CTTGAAGGTCAAGGACCCCACTTTGGGGGTTTCACACCAAGTGAATATTCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAAGGCCAYACGTTTTATTAACCCCTACATAG
TTCAAGTAACCTGACATAAGTTATTGGTGGAGTTCACTCTCGGATTTACCCACCATGCGGGGCGTTCTTTCCATCGGGCTACTGGTTCTTTTTTTTATT
CTTTTCCACCTGGCATTACAGAGTGAACCTAAGGTTAACTAAACAGGCTGACATTTAGAGATCGGGCGAAAGAAATATAGTGGAAATTTTATGATATTC
TTTTTTTTAATTGCTTAACTGATATCAAGAGCATAAATCAACAAGTGAACCTCTAAGAAATCCCTGTGATTTTCCCCCGGCTTTTGGGGTCAAACCCCC
CTACCCCCCAACACTAGAGAGATTTCACACTTCTGCAAAACCCCCCGGAAACAGAAAAATCCCTACTAATATTTTTTTTCCCAATTTTGTAAATTTTT
GGGTGATTTTACACTATTAATAATGTAAT

O. dancena

CCGAGCTCCGCATGAACGTAATYACTCTAATAACCTTYATAMCGCCTCATCCATTCTTCTCACCCCYCCCTAAATTTTTASRCTCCCTCTTTGTAAAG
TTTTCAGAGCTCYGCCAAAAAGCCCTATAAACCCCTGACATATCTAATACTAAAAATTGAGCGYCAAAACCCCTACCACACCCCGCCGAATACCGCCCTA
TTTTTCCGAGCTCTCCCTTTGGCCAAAAAGGTCTGGGAAAAATCCGTCGGAATTCCTTAAAAATTGCCGAACCTTGCCAAAAAAGCCGCAAAAAACG
CAAAAAAATGGCGAGCACTTCCAATGACCATTTGGCACTAAAGGGCTCACCTTTAAAGGGCGACTATTTTATGTCAATTTTCGACATATATGTATAATCC
ACATACGTTCAATGAGGGGACATCCGCTATTGGCACAAAAAGTTAACGGTTTGGCAAACTTAATTGAAGAGTTTCATTCTATTAACTAAATACACTCTCTTA
GTCTGGCAAGAGTCGTTAGCTCCAAATCCTTTCCAAARAAATCAACATCATTTCAAAATAAACACCCCACTTATCCTTGATARTCAGGGACAATAACCGTGGG
ATATCACAGGGTGAACATTACTGACATATTCGGTAAGAGCCACCATCAGTTGATAACTTAATGTTAACAGTCTTGTAAAGTCAAGGACCCACATCTTGGG
GGTTGTACACCACTGAACTTTCTGGCATCTGGTTCCCTATTTTCAGGTTTCACAAATTTATTAATCTCATTCTCTCTAAGCTGACATAAGTTATTGGTG
GAGTTCACTCTCTGTTACCCACCATGCGGGCGTTCTTTCCATCGGGCTACTGTTCTTTTTTTTATTCTTCACTTCCGATTACAGAGTGAACCTCT
AAGGTTAACTAAAGGCTGTACATTTAGAGATCGGGCGCAAAATAATATAGTAGTGAGATATTGAAAGATATTCTTTTTTTTATTGTCATACTGATATCAAGA
GCATAAATCATCAAAAGAACTCTTAAAGTTTCTATGATTTATTTCGCCGCTTTTGGGGTTAAACCCCCCTACCCCCCACTAGAGAGATTCTAT
CACTCTGCAAAACCCCGGAAACAGGAAATCCCTACTAATATTTTTTTTCCCAATTTTGTAAATTTTGGGTGATTTTACACTATTGAAATATGTA
AT

O. celebensis

CCGAGCTCCGCCTCTCCCCAACAATAGATGTAAAATTTTACCTTATACTTGTATGTAATATAACCAATTAATTTAATTAACCAATTAATGCCTAGTACACTT
TAATTAATGATGTTAAATAAAAAATGAATAAATACTATAACTTAATAAATACATATGTATAAACCCCATAAAAATAAGAAATGCTAAGAGATTTATATA
TAACCTATACTTGTTTAAACTAGTTTCAAGTCAACCCACATCCTTCTTCAATGATATTCTTAATGTAGTAAGAGACCCACTCAGTTGATTAATGATGCC
AACGGTTCTGATGGTCAGGACAGTTATTGTGGGGTTTCCAGTGTGAACATTTCTGGCAATTTGGTTCCTTATTCAGGGCCATACGTTTCATTATTACT
CACACGTTCCCTTGACGCTTGCTAAGTTAATGGTGGAGTACATATGACGGGAGCACCCTCCATGCGGGGCGTTCTTTCTAATGGGCAACTGGTATTTTTTT
TTTTCTTTTCACTTGGCATTTCACAGTGCACACTAAAGTTAGCTGACAAGGTTGAACATTTAGAAATCGGGCGCAAAATAATTTGGTGGAGTTATGAAAGA
TATTAATAGATAACTTACATAACTGATATCAAGAGCATAAATACCAAAATGAACACTAAAGTTTCTATTATTTTCCCCCGGCTTTTGGGGTCAAACCC
CCCCCTACCCCCCAATACTAGTAAGATTCTATCATTCTGCAACCCCCCGGAAACAGGAAACCCCTACTAATATTTTTTTTTTTCGCTTGTGTTTCAT
ATTTACATTATTGCAAAATGTAATA

ตัวอักษร R = A/G, Y = C/T, M = A/C, K = G/T, S = C/G และ W = A/T

ตาราง 8 จำนวนนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *Oryzias* 5 ชนิด

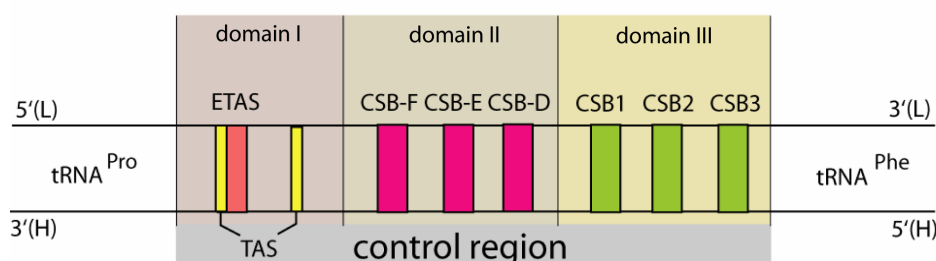
ชนิด <i>Oryzias</i>	จำนวนนิวคลีโอไทด์ (เปอร์เซ็นต์)										
	รวม	A	T	C	G	Y	R	W	S	M	K
<i>O. minutillus</i>	1305	404(31.0)	375(28.7)	302(23.2)	218(16.7)	3(0.2)	3(0.2)	-	-	-	-
<i>O. mekongensis</i>	786	206(26.2)	248(31.6)	175(22.3)	135(17.2)	6(0.7)	6(0.7)	5(0.6)	-	2(0.3)	3(0.4)
<i>O. javanicus</i>	1256	383(30.5)	340(27.1)	329(26.2)	200(15.9)	3(0.2)	1(0.1)	-	-	-	-
<i>O. dancena</i>	1226	372(30.3)	362(29.5)	298(24.3)	179(14.6)	6(0.5)	7(0.6)	-	1(0.1)	1(0.1)	-
<i>O. celebensis</i>	841	272(32.4)	275(32.7)	171(20.3)	123(14.6)	-	-	-	-	-	-

ตัวอักษร R = A/G, Y = C/T, M = A/C, K = G/T, S = C/G และ W = A/T

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Oryzias* 5 ชนิด

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Oryzias* 5 ชนิด และ outgroup

ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด ด้วยโปรแกรม Clustal X โดยใช้ *Cololabis saira* เป็น outgroup พบว่าบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียมี 3 domain ดังต่อไปนี้ domain I พบบริเวณ TAS (TACAT), palindromic motif (ATGTA) และ ETAS โดเมน II พบ CSB-F, CSB-E และ CSB-D และโดเมน III พบ CSB1, CSB2 และ CSB3 (ภาพประกอบ 21, 22)



ภาพประกอบ 21 บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *Oryzias* 5 ชนิด: domain I ประกอบด้วย ETAS; domain II ประกอบด้วย CSB-F, CSB-E, CSB-D และ domain III ประกอบด้วย CSB1, CSB2 และ CSB3

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100
<i>O. minutillus</i>		CCGAGATCTGCCCCCA	-CGACTAATTTGCG	-----	CTAAAAGTTGACTAT	-----	-----	-----	ATTTTTCAGACCTA	
<i>O. dancena</i>		CCGAGCTCCGCCATGAAACG	--TAATYACT	-----	CTAAATAACCTTYATAMCGCCRTCATCCATTCTTCTCACCCCYCCCTAAATTTTTASRCTCCC					
<i>O. javanicus</i>		CCGAGCTCTGCC	-TGCAACCACCCTACAGAAGTACCCCYAAACACCTCTCAAAAAATTGGTTATTACTTGTTGCACAACTAACTTGACATAAAATTCGC							
<i>O. mekongensis</i>		CCGGGCTCTGCCCCCARGCCCGATT	TTTGT	-----	CCCTAAA	-----	-----	-----	-----	
<i>O. celebensis</i>		CCGAGCTCCGCCTCTCCCAACAATAG	<u>AT</u>	-----	<u>GT</u> AAAATTTATACCTTA	-----	-----	-----	-----	
<i>Cololabis saira</i>		TAATA	<u>TACAT</u>	TATATATAATATCCACATATTATGGTTTATACCATAAT	<u>ATGTA</u>	ATTAATAGG	-----	-----	-----	
	*	120	*	140	*	160	*	180	*	200
<i>O. minutillus</i>		AAATCCAACCCACGCGATCGTTATCGRTGAGTTTACCGAGCTCTTCCAAAAATGACCCCYTAAACCCAGACTTATCCAATATCAAAAAATTGAGAGACTA								
<i>O. dancena</i>		-----	-----	TTCTTTGTAAGTTYTCCGAGCTCYGCCAAAAAGCCCTATAAACCCCTGACATATCTAATACTAAAAATTGAGCGYCAA						
<i>O. javanicus</i>		CAAAAACGTCACCTCTGACTTTCCCTGACCGACCTCCGAGTACTTCCAAAAAGCACTACCAATCCCCGGCATCTCTAACACTAAAAATTGAGCGCCAA								
<i>O. mekongensis</i>		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>O. celebensis</i>		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>Cololabis saira</i>		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	*	220	*	240	*	260	*	280	*	300
<i>O. minutillus</i>		AACCCTGCCGAGGGGTCGCCGAGTACCGCCCTATTTTTCCCGAGCCCGCCACAGCCAAATCAATCGGCGAAATTTCTTCAAAAAATTGGGTCAAAATT								
<i>O. dancena</i>		AACCCTACCACACCCCGCCGAATACCGCCCTATTTTTCCGAGCTCTGCCTTTGGCCAAAAAGGTCTGGGAAATCCGTCGGAAATTCCTTAAAAATT								
<i>O. javanicus</i>		ACCCGCTCTACAGGGTAGCCAAATACCGCCCTATTTGGGCGGAGCTCCGCCTTTGGTCAAAAAAGGTCTGTAATTCTCCGTCAAATTTCCCTAAAAACC								
<i>O. mekongensis</i>		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>O. celebensis</i>		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>Cololabis saira</i>		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

ภาพประกอบ 22 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *O. minutillus*, *O. javanicus*, *O. dancena*, *O. mekongensis* และ *O. celebensis* โดยมี *Cololabis saira* เป็น outgroup ส่วนที่แรเงาประกอบด้วย extended termination-associated sequence (ETAS), central conserved sequence block (CSB-F, CSB-E, CSB-D) และ conserved sequence block (CSB1, CSB2, CSB3) บริเวณที่ขีดเส้นใต้แสดง termination-associated sequence (TAS; TACAT) และบริเวณที่ขีดเส้นคู่แสดง palindromic motif (ATGTA) ตัวอักษร R = A/G, Y = C/T, M = A/C, K = G/T, S = C/G และ W = A/T

	*	320	*	340	*	360	*	380	*	400
<i>O. minutillus</i>	GCCGAGCTCTTCCAAAAAATGGCCAAAAAATGGCCAAAAAAGCTGCCGAGTACCGCCCGAAAA---TTTTTCTACTAAAAAACAATAGGCGCGAGGCC									
<i>O. dancena</i>	GCCGAACTCTGCCAAAAAACGCCAAAAAACGC-AAAAA-TTGCCGAGCACTTCCARATGACCATTGCGACTAAAAGGCCTCACCTTTAAAGGCC									
<i>O. javanicus</i>	GCCGAGGCCCGCCAAAAAACGCCAAAAAACGC--AAAAATTGCCGACACTGCCGGATGACCAAACACCCTTCAAGCGRCTCACCTAAAGCCCC									
<i>O. mekongensis</i>	-----									
<i>O. celebensis</i>	-----									
<i>Cololabis saira</i>	-----									

ETAS

	*	420	*	440	*	460	*	480	*	500
<i>O. minutillus</i>	TTCATTTTTTTTTATGCAAGTACATATATGTATATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCTCGATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTT									
<i>O. dancena</i>	GACTATTTTTATGTCAATTTGACATATATGTATAATCCACATACGTTCAATGAGGGGACATCCGCRATTGGCACAAAAAGTTAACGGTTTGCGAAACTT									
<i>O. javanicus</i>	GGCCCTTTTTATGTCAATTACGACATATATGTATAATCCGCATACGTTCAATGAGGGGAGCATCCGCGATTGGCACAAAACTTAACGGTTTGCG-CACTT									
<i>O. mekongensis</i>	-----TACTTATATGTAATATCACCATTAATAGAWYTAA--ACCAT---TTTGCCTAGTATAYAMMGTCATGCAT-CCAAA									
<i>O. celebensis</i>	-----TACTTGTATGTAATATAACCATTAATTTAATTAA--ACCAT---TAATGCCTAGTACACTTAATTAATGATGTTAAA									
<i>Cololabis saira</i>	-----GACATATATGTATTATCAACATTAACCTATATTA--ACCAT---TAAT--CAAGTGCATAATAATGAAAATCACCAAC									

	*	520	*	540	*	560	*	580	*	600
<i>O. minutillus</i>	CAAG-GAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAATGCACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGGTGTGAATGTTTTGTTTCCATGATCGATAGAAATCAATAGA									
<i>O. dancena</i>	AATT-GAAGAGTTTCATTCAATTAA-CT-AAATACACTCTCTTAGTCTGGCAAAGATCGTTAGCTCCAA-----									
<i>O. javanicus</i>	CATTAGAAGAGTTTCATTCAATCAA-AT-AAATACACTCTCTTAGTCTGGCTTAGATCGTGAAATCCAA-----									
<i>O. mekongensis</i>	-----TTATTTTTTACCATA-----GGGTACATACACCTACGATTGGTTTAAATCGGCACAAGTGTGCC-----									
<i>O. celebensis</i>	-TAAAAAATGAATAATAAACTATAACTT-AAATAAAATACATATGTAATAACCCCATAAAAATAATGAAATGCTAAGAGATTTATATATAACCTATAACTT									
<i>Cololabis saira</i>	C-TATTTTTT--TAATAAATCTTTGAGACATTTGATCCAAAATAACAATAAAATTAGTATTACACAAATATCATCTTGCGCCAGTCGAAAGTTTAAGACC									

	*	620	*	640	*	660	*	680	*	700
<i>O. minutillus</i>	AGAAAAATCATTTCAGTCAAACAAGCACTTCCTAATAATCTGGCATACTAAAATGTAAAGCATCCTTTCACAAGTCTCCTCATCTTCAAAGGTTGTACTTA									
<i>O. dancena</i>	-----ATCCTTTCACAARAATCAACATCATTCAAATAAACACCCA									
<i>O. javanicus</i>	-----ATCCTTTCACAAGTATCAACATTCAACAAAATAACACCCA									
<i>O. mekongensis</i>	-----									
<i>O. celebensis</i>	GTTT-----									
<i>Cololabis saira</i>	GAACACAAAATCACAAG-----									

ภาพประกอบ 22 (ต่อ)

	CFB-F									
	*	720	*	740	*	760	*	780	*	800
<i>O. minutillus</i>	TTGTATCCTTGTT	--TTGAGCCCAAT	-RACAGTAGATA	AAGACATAAGGT	GAGATAAGTAC	----	ATATTCCGTC	-GAGA-CACCGTC	CATCAGTT	-ATA
<i>O. dancena</i>	ACT-TATCCTTGAT	ARTCAGGGACAAT	-AACCGTGGGGAT	ATACAGGGTGA	ACTAT-TACTGAC		ATATTCCGTA	AAGAGCCACC	---	ATCA-GTT GATA
<i>O. javanicus</i>	ACT-TATCCTTGATA	AATCAGGGACAGA	-AACTGTGGGGATT	TACAAGGTGAA	ATAT-TACTGGC		ATATTCCGCA	AAGAGCCCACC	---	ATCA-GTT GATA
<i>O. mekongensis</i>	-----	ACAGCTAGTTT	CAAGTCATCC	ATCCTTCTCG	ATTGTT-TACT	---	TAATGCTAGT	AAAGACCACC	---	ATCA-GTT GATT
<i>O. celebensis</i>	-----	AAAAGTAGTTT	CAAGTCACCC	ACATCCTTCT	CAATGAT-TACT	---	TAATGTAGTA	AAGAGACCACC	---	ATCA-GTT GATT
<i>Cololabis saira</i>	-----	TTAAGTTATAC	CAAGTAACCA	CCATCCTACT	AATTGAAAA--TACT	---	TAATGTAGTA	AAGAGACCACC	---	ATCA-GTT GATT

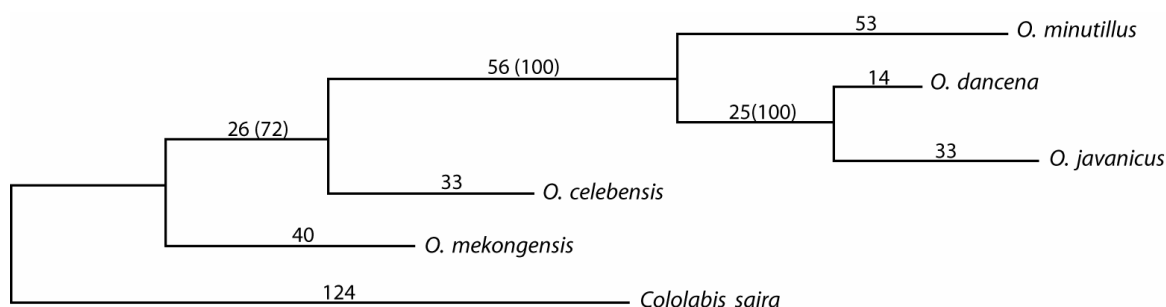
	*	920	*	940	*	960	*	980	*	1000
<i>O. minutillus</i>	YRTCCATTAATACTCATTCGTTCTTT	----	GAACCTGACATAAGTTAATGGTGGAGTACATATTCTGAAGTTACCCACCATGCCGAGCATTCTTTCCATA							
<i>O. dancena</i>	AATTTATTAATACTCATTCATTCTCTC	----	TAACCTGACATAAGTTATTGGTGGAGTTCATACTCTCTC	GTTACCCACCATGCCGGGCGTTCTTTCCATC						
<i>O. javanicus</i>	CGTTTATTAACCCCTCATACGTTCAAG	----	TAACCTGACATAAGTTATTGGTGGAGTTCATACTCCGATGTTACCCACCATGCCGGGCGTTCTTTCCATC							
<i>O. mekongensis</i>	WTRACCTTATTACCCATACGTTCTCTT	----	GAAGCTTGCATAAGTTAATGGTGGAGTACATATCTCTC	GTTACCCACCATGCCGGGCGTTCTTTCTAAT						
<i>O. celebensis</i>	CGTTTCATTATTACTCACAGTTCCTT	----	GACGCTTGCATAAAGTTAATGGTGGAGTACATATGACGGGAGACCCCCCATGCCGGGCGTTCTTTCTAAT							
<i>Cololabis saira</i>	AATTGAT-GTTACTC-CCCATCTTTCTCTTGAAGCTGGCATAAGTTAATGGTGGAAATACATATTACCCTGTCACCCACCATGCCGGGCATTCTTTCTAAG									

	CFB1									
	*	1120	*	1140	*	1160	*	1180	*	1200
<i>O. minutillus</i>		AATAATATGGTGATAGTTAATGAAAGATATTCGTTTTTTTAAATTGC		ATAACTGATATCTAGAGCATAAA		ATCATAAAATGAAACTCTTAAATTTCTATGA				
<i>O. dancena</i>		ATAATATAGTGGAGATA--TTGAAAGATATTCCTTTTTTTTATTTCG		ATAACTGATATCAAGAGCATAAA		ATCATCAAATGAAACTCTTAAAGTTTCTATGA				
<i>O. javanicus</i>		AGAATATAGTGGAAATTA--TTTTATGATATTCCTTTTTTTTAAATTGC		TTAACTGATATCAAGAGCATAAA		ATCAACAAGTGAAACTCTTAAAGAAATCCCTGT				
<i>O. mekongensis</i>		AGAATATTGGTGAAWTG--TTATATGACTTTGATAGAAWCATA-GC		ATAACTGATATCATGAGCATAAA		ARGAGTAGTTTGAATCTAGAAGAAYCTCTATGA				
<i>O. celebensis</i>		ATAATATTGGTGAGTTA--TTGAAAGATATTAATAGATAACTT-AC		ATAACTGATATCAAGAGCATAAA		ATAACCAAATGAAACTACTAAAGTTTCTATTA				
<i>Cololabis saira</i>		CCGTAATAATTGTTAATGTTGATAAGATATTACTTGAAGAATT-GC		ATTACTGATATCAAGAGCATAAA		TATGACTAGTGTTACTCCTAACATCTCTGTTA				
	CFB2					CFB3				
	*	1220	*	1240	*	1260	*	1280	*	1300
<i>O. minutillus</i>		TTTTTCCCCCGGCTTTTGCGGGT		CAAACCCCCCTACCCCC		CAATACTCGAGAGATGACTATGACTCC		TGCAAACCCCCCGGAAACA		AGGAAAATCCCT
<i>O. dancena</i>		TTTATTTCCCCCGGCTTTTGCGGGT		TAAACCCCCCTACCCCC		CAACACTAGAGAGATTTCTATCACTCC		TGCAAACCCCCCGGAAACA		AGGAAAATCCCT
<i>O. javanicus</i>		GATTTCCCCCGGCTTTTGCGGGT		CAAACCCCCCTACCCCC		CAACACTAGAGAGATTTCCAACACTTC		TGCAAACCCCCCGGAAACA		GAAAAATCCCT
<i>O. mekongensis</i>		AATTCYWCCCCGGCTTTTGCGGGT		CAAACCCCCCTACCCCC		CAATACTAGTGAGATATCTGTCAATTCC		TGCAAACCCCCCGGAAACA		AGGAAAATCCCT
<i>O. celebensis</i>		TATTTCCCCCGGCTTTTGCGGGT		CAAACCCCCCTACCCCC		CAATACTAGTAAGATTTCTATCATTCC		TGCAAACCCCCCGGAAACA		AGGAAAACCCCT
<i>Cololabis saira</i>		TCTCCCCCTCTGGTTTACACGCGT		TAAACCCCCC-ACCCCC		--TTACTCGTAAGATCCTTATTATTTCT		TGCAAACCCCC-TAAACA		GAGAAGCTCCT
	*	1320	*	1340	*	1360				
<i>O. minutillus</i>		ACTAGTATTTTTTGATGCCCCCTTTGTAAATTTTTTGCGTGTATTTACACTATTAAATAATGCAAAT					[1305]			
<i>O. dancena</i>		ACTAATATTTTTTTTTCCCAATTTTGTAAATTTTTTGCGTGTATTTACACTATTGAAATAATGTAAAT					[1226]			
<i>O. javanicus</i>		ACTAATATTTTTTTTTYCCCAATTTTGTAAATTTTTTGCGTGTATTTACACTATTAAATAATGTAAAT					[1256]			
<i>O. mekongensis</i>		ACTTGTATTTTTGTTTTCCCTTGTTTGTTGTGTATTTACATTATTGCAAA-TATTGCAAAA-----					[786]			
<i>O. celebensis</i>		ACTAATATTTTTTTTTTCGCTTGTTTGT-----TCATATTTACATTATTGCAAAA-TGTA AAA					[841]			
<i>Cololabis saira</i>		ACTCATAATTTTTATCCCTAAAAAT-GTTTATTTATA-TAATATAATATTT-----					[859]			

ภาพประกอบ 22 (ต่อ)

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Oryzias* 5 ชนิด และ outgroup

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของนิวคลีโอไทด์บริเวณ domain II และ domain III ของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *Oryzias* 5 ชนิด และ *Cololabis saira* เป็น outgroup โดยใช้โปรแกรม Clustal X และ PAUP*version 4.0 b พบว่ามีความยาวเท่ากับ 603 คู่เบส ซึ่งจำแนกเป็นประเภทของลักษณะ (character) ได้ดังนี้: constant character = 330 คู่เบส (54.73%), parsimony-uninformative character = 149 คู่เบส (24.71%), และ parsimony-informative characters = 124 คู่เบส (20.56%) ผลจากการสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี parsimony (branch-and-bound search) ได้ most parsimonious tree (ภาพประกอบ 23) ที่มีความยาว 404 step ซึ่งแสดง clade ที่สำคัญ 1 clade ประกอบด้วย *O. dancena* และ *O. javanicus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (bootstrap support, BS = 100%) และปลาทั้ง 2 ชนิดนี้ยังมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *O. minutillus* ด้วย (BS = 100%) และมี *O. celebensis* เป็น sister group (BS = 72%) *O. mekongensis* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Oryzias* ทั้ง 4 ชนิดที่กล่าวมาแล้วน้อยที่สุด



ภาพประกอบ 23 Single most parsimonious tree (ความยาว 404 step) ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียบริเวณ domain II และ domain III ของ *O. dancena*, *O. javanicus*, *O. minutillus*, *O. celebensis* และ *O. mekongensis* โดยมี *Cololabis saira* เป็น outgroup และใช้วิธี parsimony (branch-and-bound search) ข้อมูลทางสถิติเกี่ยวกับ tree มีดังนี้: CI = 0.856, RI = 0.635 และ RC = 0.544 ตัวเลขที่อยู่บนกิ่งแสดง ความยาวของกิ่ง (branch length) และตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บแสดง bootstrap support (%) จาก 1000 ซ้ำ

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *O. minutillus*

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ *O. minutillus* จากแหล่งต่าง ๆ และ outgroup

ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย (domain I) ใน *O. minutillus* 11 แหล่งในประเทศไทย และ 1 แหล่งจากประเทศกัมพูชา โดยมี *O. dancena* และ *O. celebensis* เป็น outgroup แสดงภาพประกอบ 24

		*	20	*	40	*	60	*	80	*	100
<i>O. minutillus</i> (Cambodia)	CCAGCATCTGCCCCT	----	GTTAATTTAACCTAAAAA	-	GTTAAATAA	-----	-----	-----	-----	ATTATT	CAGATCCAAAAAT
<i>O. minutillus</i> (Surin)	CCAACATATGCCCC	----	GTTAATTTAACCTAAAAA	-	GTTAAATAA	-----	-----	-----	-----	ATTATT	CAGATCCAAAAAT
<i>O. minutillus</i> (Sakaeo)	CCAGCATCTGCCCCT	----	GTTAATTTAACCTAAAAA	-	GTTAAATAA	-----	-----	-----	-----	ATTATT	CAGATCCAAAAAT
<i>O. minutillus</i> (Songkla)	CCAGCATCTGCCTCT	----	GCTGATTTAACCTAAAAAGTTAAATAA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	ATTATT	CAGATCCAAAAAT
<i>O. minutillus</i> (NakhonSiThammarat)	CCAGCATCTGCCTCT	----	GCTGATTTAACCTAAAAAGTTAAATAA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	ATTATT	CAGATCCAAAAAT
<i>O. minutillus</i> (Suphanburi)	CCGAGATCTGCCCCCA	-	CGACTAATTTGCGCTAAAAA	-	GTTGACTAT	-----	-----	-----	-----	ATTTTTC	CAGACCTAAAAAT
<i>O. minutillus</i> (NakhonSawan)	CCGAGATCTGCCCCCA	-	CGACTAATTTGCGCTAAAAA	-	GTTGACTAT	-----	-----	-----	-----	ATTTTTC	CAGACCTAAAAAT
<i>O. minutillus</i> (Saraburi)	CCGAGATCTGCCCCCA	-	CGACTAATTTGCGCTAAAAA	-	GTTGACTAT	-----	-----	-----	-----	ATTTTTC	CAGACCTAAAAAT
<i>O. minutillus</i> (Phetchaburi)	CCGAGATCTGCCCCCA	-	CGACTAATTTGCGCTAAAAA	-	GTTGACTAT	-----	-----	-----	-----	ATTTTTC	CAGACCTAAAAAT
<i>O. minutillus</i> (Prachuapkirikhun)	CCGAGATCTGCCCCCA	-	CGACTAATTTGCGCTAAAAA	-	GTTGACTAT	-----	-----	-----	-----	ATTTTTC	CAGACCTAAAAAT
<i>O. minutillus</i> (ChiangRai)	CCGAGATCTGCCCCCA	-	CGACTAATTTGCGCTAAAAA	-	GTTGACTAT	-----	-----	-----	-----	ATTTTTC	CAGACCTAAAAAT
<i>O. minutillus</i> (Ayutthaya)	CCGAGATCTGCCCCCA	-	CGACTAATTTGCGCTAAAAA	-	GTTGACTAT	-----	-----	-----	-----	ATTTTTC	CAGACCTAAAAAT
<i>O. dancena</i>	CCGAGCTCCGCCATGAAACG	--	TAATTACT-CTAAAT	--	AACCTTTATAACGCCGTATCCATTCTTCTCACCCCTCCCTAAATTTTACACT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>O. celebensis</i>	CCGAGCTCCGCCCTCTCCCAACAATAGAT	--	GTAAAA	--	TTTATACCTTA	-----	-----	-----	-----	-----	-----

		*	120	*	140	*	160	*	180	*	200
<i>O. minutillus</i> (Cambodia)	CTAACCCGTCGAGGTTACAATCGGCAAGCTTACCAGAGCTCTTCCAGAAAAGACCCCTTAAACCCCGGCTTATCCAATATCAAAAAATTGAGAGACTAAAC										
<i>O. minutillus</i> (Surin)	CTAACCCACCGAGGTTACAATCGGCAAGCTTACCAGAGCTCTTCCAGAAAAGACCCCTTAAACCCCGGCTTATCCAATATCAAAAAATTGAGAGACTAAAC										
<i>O. minutillus</i> (Sakaeo)	CTAGCCCACCAAGGTTACAATCGGCAAGCTTACCAGAGCTCTTCCAGAAAAGACCCCTTAAACCCCGGCTTATCCAATATCAAAAAATTGAGAGACTAAAC										
<i>O. minutillus</i> (Songkla)	CTGACTCATACGGGTTACAACCGGCAGGCTTACCAGAGCTCTTCCAGAAAAGACCCCTTAAACCCCGGCTTATCCAATATAGAAAAATTGAGAGACTAAAC										
<i>O. minutillus</i> (NakhonSiThammarat)	CTGACTCATACGGGTTACAACCGGCAGGCTTACCAGAGCTCTTCCAGAAAAGACCCCTTAAACCCCGGCTTATCCAATATAGAAAAATTGAGAGACTAAAC										
<i>O. minutillus</i> (Suphanburi)	CCAACCCA-CGTGATCGTTATCGGTGAGTTTACCAGAGCTCTTCCAAAAATGACCCCTTAAACCCAGACTTATCCAATATCAAAAAATTGAGAGACTAAAC										
<i>O. minutillus</i> (NakhonSawan)	CCAACCCA-CGCGATCGTTATCGGTGAGTTTACCAGAGCTCTTCCAAAAATGACCCCTTAAACCCAGACTTATCCAATATCAAAAAATTGAGAGACTAAAC										
<i>O. minutillus</i> (Saraburi)	CCAACCCA-CGCGATCGTTATCGGTGAGTTTACCAGAGCTCTTCCAAAAATGACCCCTTAAACCCAGACTTATCCAATATCAAAAAATTGAGAGACTAAAC										
<i>O. minutillus</i> (Phetchaburi)	CCAACCCA-CGCGATCGTTATCGGTGAGTTTACCAGAGCTCTTCCAAAAATGACCCCTTAAACCCAGACTTATCCAATATCAAAAAATTGAGAGACTAAAC										
<i>O. minutillus</i> (Prachuapkirikhun)	CCAACCCA-CGCGATCGTTATCGGTGAGTTTACCAGAGCTCTTCCAAAAATGACCCCTTAAACCCAGACTTATCCAATATCAAAAAATTGAGAGACTAAAC										
<i>O. minutillus</i> (ChiangRai)	CCAACCCA-CGCGATCGTTATCGGTGAGTTTACCAGAGCTCTTCCAAAAATGACCCCTTAAACCCAGACTTATCCAATATCAAAAAATTGAGAGACTAAAC										
<i>O. minutillus</i> (Ayutthaya)	CCAACCCA-CGCGATCGTTATCGGTGAGTTTACCAGAGCTCTTCCAAAAATGACCCCTTAAACCCAGACTTATCCAATATCAAAAAATTGAGAGACTAAAC										
<i>O. dancena</i>	-----CCCTTCTTTGTAAGTTTTCGAGCTCCGCCAAAAAGCCCTTAAACCCCTGACATATCTAATACTAAAAATTGAGCGCCAAAAAC										
<i>O. celebensis</i>	-----										

ภาพประกอบ 24 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย (domain I) ของ *O. minutillus* 12 แหล่ง โดยมี *O. dancena* และ *O. celebensis* เป็น outgroup

[illegible]

		*	420	*	440	*	460	*	480	*	500
<i>O. minutillus</i> (Cambodia)	ATTTTTTTTTT	TGCAAGTACATATATGTACATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCCCGATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTTCAA									
<i>O. minutillus</i> (Surin)	ATTTTTTTTTT	TGCAAGTACATATATGTACATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCCCGATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTTCAA									
<i>O. minutillus</i> (Sakaeo)	ATTTTTTTTTT	TGCAAGTACATATATGTACATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCCCGATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTTCAA									
<i>O. minutillus</i> (Songkla)	ATTTTTTTTTT	TGCAAGTACATATATGTACATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCCCGATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTTCAA									
<i>O. minutillus</i> (NakhonSiThammarat)	ATTTTTTTTTT	TGCAAGTACATATATGTACATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCCCGATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTTCAA									
<i>O. minutillus</i> (Suphanburi)	ATTTTTTTTTT	TGCAAGTACATATATGTATATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCTCGATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTTCAA									
<i>O. minutillus</i> (NakhonSawan)	ATTTTTTTTTT	TGCAAGTACATATATGTATATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCTCGATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTTCAA									
<i>O. minutillus</i> (Saraburi)	ATTTTTTTTTT	TGCAAGTACATATATGTATATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCTCGATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTTCAA									
<i>O. minutillus</i> (Phetchaburi)	ATTTTTTTTTT	TGCAAGTACATATATGTATATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCTCGATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTTCAA									
<i>O. minutillus</i> (Prachuapkirikhun)	ATTTTTTTTTT	TGCAAGTACATATATGTATATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCTCGATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTTCAA									
<i>O. minutillus</i> (ChiangRai)	ATTTTTTTTTT	TGCAAGTACATATATGTATATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCTCGATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTTCAA									
<i>O. minutillus</i> (Ayutthaya)	ATTTTTTTTTT	TGCAAGTACATATATGTATATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCTCGATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTTCAA									
<i>O. dancena</i>	TATTTTTTATG	TCAATTCGACATATATGTATAATCCACATACGTTCAATGAGGGGACATCCGCGATTGGCACAAGTTAACGGTTTGCGAAACTTAAT									
<i>O. celebensis</i>	-----	TACTTGATGTAATATAACCATTAATTTAATTAA--ACCAT---TAATGCCTAGTACACTTTAATTAATGATGTTAA--TA									

		*	520	*	540	*	560	*	580	*	600
<i>O. minutillus</i> (Cambodia)	G-GAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAATGC	CACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGTTATGAATGTTTTGTTTCCATGATTAAGAAATCAATAGAAGA									
<i>O. minutillus</i> (Surin)	G-GAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAATGC	CACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGTTATGAATGTTTTGTTTCCATGATTAAGAAATCAATAGAAGA									
<i>O. minutillus</i> (Sakaeo)	G-GAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAATGC	CACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGTTATGAATGTTTTGTTTCCATGATTAAGAAATCAATAGAAGA									
<i>O. minutillus</i> (Songkla)	G-GAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAATGC	CACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGTTATGAATGTTTTATTTCATGATCAAGAAATCAATAGAAGA									
<i>O. minutillus</i> (NakhonSiThammarat)	G-GAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAATGC	CACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGTTATGAATGTTTTATTTCATGATCAAGAAATCAATAGAAGA									
<i>O. minutillus</i> (Suphanburi)	G-GAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAATGC	CACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGGTGTGAATGTTTTGTTTCCATGATCGATAGAAATCAATAGAAGA									
<i>O. minutillus</i> (NakhonSawan)	G-GAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAATGC	CACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGGTGTGAATGTTTTGTTTCCATGATCGATAGAAATCAATAGAAGA									
<i>O. minutillus</i> (Saraburi)	G-GAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAATGC	CACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGGTGTGAATGTTTTGTTTCCATGATCAATAGAAATCAATAGAAGA									
<i>O. minutillus</i> (Phetchaburi)	G-GAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAATGC	CACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGGTGTGAATGTTTTGTTTCCATGATCGATAGAAATCAATAGAAGA									
<i>O. minutillus</i> (Prachuapkirikhun)	G-GAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAATGC	CACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGGTGTGAATGTTTTGTTTCCATGATCGATAGAAATCAATAGAAGA									
<i>O. minutillus</i> (ChiangRai)	G-GAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAATGC	CACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGGTGTGAATGTTTTGTTTCCATGATTGATAGAAATCAATAGAAGA									
<i>O. minutillus</i> (Ayutthaya)	-GAAGTATTGCACACGGTTATGCTCAAATGC	CACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGGTGTGAATGTTTTGTTTCCATGATCGATAGAAATCAATAGAAGA									
<i>O. dancena</i>	T-GAAGAGTTTCATTCA	TTTAA-CT-AAATACACTCTCTTAGTCTGGCAAAGATCGTTAGCTCCAA-----									
<i>O. celebensis</i>	AAAAATGAATAATAA	ACTTAAATAACATATGTATAAACCCCATAAAAATAATGAAATGCTAAGAGATTATATATAACCTATAACTTGT									

ภาพประกอบ 24 (ต่อ)

		*	620	*	640	*	660	*	680	*	700
<i>O. minutillus</i>	(Cambodia)	AAATCATT	CAGTCAAACAAGCACTTCCTAATAATCTGGCATACTAAAAATGTTAACATCCTTT	CACAAGTCTCCTCATCATTCAAAGGTTGTACTTTATAC							
<i>O. minutillus</i>	(Surin)	AAATCATT	CAGTCAAACAAGCACTTCCTAATAATCTGGCATACTAAAAATGTTAACATCCTTT	CACAAGTCTCCTCATCATTCAAAGGTTGTACTTTATAC							
<i>O. minutillus</i>	(Sakaao)	AAATCATT	CAGTCAAACAAGCACTTCCTAATAATCTGGCATACTAAAAATGTTAACATCCTTT	CACAAGTCTCCTCATCATTCAAAGGTTGTACTTTATAC							
<i>O. minutillus</i>	(Songkla)	AAATCATT	CAGTCAAACAAGCACTTCCTAATAATCTGGCATACTAAAAATGTTAACATCCTTT	CACAAGTCTCCTCATCATTCAAAGGTTGTACTTTATAC							
<i>O. minutillus</i>	(NakhonSiThammarat)	AAATCATT	CAGTCAAACAAGCACTTCCTAATAATCTGGCATACTAAAAATGTTAACATCCTTT	CACAAGTCTCCTCATCATTCAAAGGTTGTACTTTATAC							
<i>O. minutillus</i>	(Suphanburi)	AAATCATT	CAGTCAAACAAGCACTTCCTAATAATCTGGCATACTAAAAATGTTAACATCCTTT	CACAAGTCTCCTCATCATTCAAAGGTTGTACTTTATTT							
<i>O. minutillus</i>	(NakhonSawan)	AAATCATT	CAGTCAAACAAGCACTTCCTAATAATCTGGCATACTAAAAATGTTAACATCCTTT	CACAAGTCTCCTCATCATTCAAAGGTTGTACTTTATTT							
<i>O. minutillus</i>	(Saraburi)	AAATCATT	CAGTCAAACAAGCACTTCCTAATAATCTGGCATACTAAAAATGTTAACATCCTTT	CACAAGTCTCCTCATCATTCAAAGGTTGTACTTTATTT							
<i>O. minutillus</i>	(Phetchaburi)	AAATCATT	CAGTCAAACAAGCACTTCCTAATAATCTGGCATACTAAAAATGTTAACATCCTTT	CACAAGTCTCCTCATCATTCAAAGGTTGTACTTTATTT							
<i>O. minutillus</i>	(Prachuapkirikhun)	AAATCATT	CAGTCAAACAAGCACTTCCTAATAATCTGGCATACTAAAAATGTTAACATCCTTT	CACAAGTCTCCTCATCATTCAAAGGTTGTACTTTATTT							
<i>O. minutillus</i>	(ChiangRai)	AAATCATT	CAGTCAAACAAGCACTTCCTAATAATCTGGCATACTAAAAATGTTAACATCCTTT	CACAAGTCTCCTCATCATTCAAAGGTTGTACTTTATTT							
<i>O. minutillus</i>	(Ayutthaya)	AAATCATT	CAGTCAAACAAGCACTTCCTAATAATCTGGCATACTAAAAATGTTAACATCCTTT	CACAAGTCTCCTCATCATTCAAAGGTTGTACTTTATTT							
<i>O. dancena</i>		-----ATCCTTTTACAAGAATCAACATCATTAAAAATAACACCCAACT									
<i>O. celebensis</i>		T-----									

		*	720	*	740	*	760	*	780	*	800
<i>O. minutillus</i>	(Cambodia)	TGATCCTTGTT--TTGAGCCCAAT-GACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGCTAAGTAC----	ATATTCCGTC-GAGA-CACCGTCATCACGTT-ATAACT								
<i>O. minutillus</i>	(Surin)	TGATCCTTGTT--TTGAGCCCAAT-GACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGCTAAGTAC----	ATATTCCGTC-GAGA-CACCGTCATCACGTT-ATAACT								
<i>O. minutillus</i>	(Sakaao)	TGATCCTTGTT--TTGAGCCCAAT-GACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGCTAAGTAC----	ATATTCCGTC-GAGA-CACCGTCATCACGTT-ATAACT								
<i>O. minutillus</i>	(Songkla)	TTATCCTTGTT--TTGAGCCCAAC-AACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGATAAGTAC----	ATACTACGTC-GAGA-CACCGTCATCACGTT-ATAACT								
<i>O. minutillus</i>	(NakhonSiThammarat)	TTATCCTTGTT--TTGAGCCCAAC-AACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGATAAGTAC----	ATACTACGTC-GAGA-CACCGTCATCACGTT-ATAACT								
<i>O. minutillus</i>	(Suphanburi)	GTATCCTTGTT--TTGAGCCCAAT-AACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGATAAGTAC----	ATATTCCGTC-GAGA-CACCGTCATCACGTT-ATAACT								
<i>O. minutillus</i>	(NakhonSawan)	GTATCCTTGTT--TTGAGCCCAAT-AACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGATAAGTAC----	ATATTCCGTC-GAGA-CACCGTCATCACGTT-ATAACT								
<i>O. minutillus</i>	(Saraburi)	GTATCCTTGTT--TTGAGCCCAAT-AACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGATAAGTAC----	ATATTCCGTC-GAGA-CACCGTCATCACGTT-ATAACT								
<i>O. minutillus</i>	(Phetchaburi)	GTATCCTTGTT--TTGAGCCCAAT-GACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGATAAGTAC----	ATATTCCGTC-GAGA-CACCGTCATCACGTT-ATAACT								
<i>O. minutillus</i>	(Prachuapkirikhun)	GTATCCTTGTT--TTGAGCCCAAT-GACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGATAAGTAC----	ATATTCCGTC-GAGA-CACCGTCATCACGTT-ATAACT								
<i>O. minutillus</i>	(ChiangRai)	GTATCCTTGTT--TTGAGCCCAAT-AACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGATAAGTAC----	ATATTCCGTC-GAGA-CACCGTCATCACGTT-ATAACT								
<i>O. minutillus</i>	(Ayutthaya)	GTATCCTTGTT--TTGAGCCCAAT-AACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGATAAGTAC----	ATATTCCGTC-GAGA-CACCGTCATCACGTT-ATAACT								
<i>O. dancena</i>		-TATCCTTGATAGTCAGGGACAAT-AACCGTGGGGATATCACAGGGTGAACATAT-TACTGACATATTCGGTAAGAGCCCACT--ATCA-GTTGATAACT									
<i>O. celebensis</i>		-----AAAAGTAGTTTCAAGTCACCCACATCCTTCTTCAATGAT--TACT---TAATGTAGTAAGAGACCACC---ATCA-GTTGATTACT									

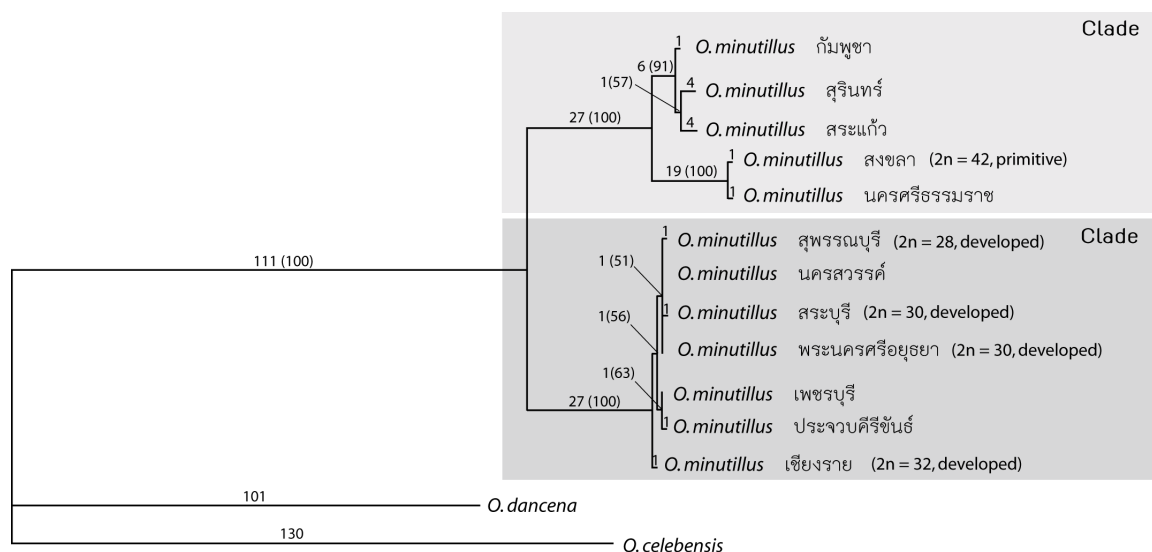
ภาพประกอบ 24 (ต่อ)

	*	
<i>O. minutillus</i> (Cambodia)	TAAGGTAACTCTTAT	[761]
<i>O. minutillus</i> (Surin)	TAAGGTAACTCTTAT	[760]
<i>O. minutillus</i> (Sakaeo)	TAAGGTAACTCTTAT	[761]
<i>O. minutillus</i> (Songkla)	TAAGGTAACTCTTAT	[762]
<i>O. minutillus</i> (NakhonSiThammarat)	TAAGGTAACTCTTAT	[762]
<i>O. minutillus</i> (Suphanburi)	TAAGGTAACTCTTAT	[763]
<i>O. minutillus</i> (NakhonSawan)	TAAGGTAACTCTTAT	[763]
<i>O. minutillus</i> (Saraburi)	TAAGGTAACTCTTAT	[763]
<i>O. minutillus</i> (Phetchaburi)	TAAGGTAACTCTTAT	[763]
<i>O. minutillus</i> (Prachuapkirikhun)	TAAGGTAACTCTTAT	[763]
<i>O. minutillus</i> (ChiangRai)	TAAGGTAACTCTTAT	[763]
<i>O. minutillus</i> (Ayutthaya)	TAAGGTAACTCTTAT	[763]
<i>O. dancena</i>	TAATGTTAACAGTCCT	[688]
<i>O. celebensis</i>	TAATGCCAACGGTTCT	[315]

ภาพประกอบ 24 (ต่อ)

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *O. minutillus* จากแหล่งต่าง ๆ และ outgroup

ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน domain I ของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *O. minutillus* จากแหล่งแพร่กระจายทั้ง 12 แหล่ง พบว่ามีความยาวเท่ากับ 879 คู่เบส ที่สามารถจัดเรียงเข้ากันได้ดี (ไม่มี ambiguous site) ซึ่งจำแนกเป็นประเภทของลักษณะได้ดังนี้: constant character = 504 คู่เบส (57.34%), parsimony-uninformative character = 273 คู่เบส (31.06%), และ parsimony-informative characters = 102 คู่เบส (11.60%) ในการสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี parsimony (branch-and-bound search) และใช้ *O. dancena* และ *O. celebensis* เป็น outgroup พบ 1 most parsimonious tree (ภาพประกอบ 25) ที่มีความยาว 440 step พบ 2 clade ที่สำคัญคือ clade I (BS = 100%) ประกอบด้วย *O. minutillus* 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มแรก (BS = 91%) ประกอบด้วย *O. minutillus* จากจังหวัดสุรินทร์ สระแก้ว และประเทศกัมพูชา โดยที่ *O. minutillus* จากจังหวัดสุรินทร์ และสระแก้วมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่า (BS = 57%) และกลุ่มที่ 2 (BS = 100%) ประกอบด้วย *O. minutillus* จากจังหวัดสงขลา และนครศรีธรรมราช ใน clade II (BS = 100%) ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อยเช่นกัน คือ กลุ่มแรก (BS = 51%) ประกอบด้วย *O. minutillus* จากจังหวัดสุพรรณบุรี นครสวรรค์ สระบุรี และพระนครศรีอยุธยา และกลุ่มที่ 2 (BS = 63%) ประกอบด้วย *O. minutillus* จากจังหวัดเพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งมี *O. minutillus* จากจังหวัดเชียงรายเป็น sister group ของทั้ง 2 กลุ่ม



ภาพประกอบ 25 Single most parsimonious tree (ความยาว 440 step) ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย (domain I) ของ *O. minutillus* 12 แหล่ง โดยมี *O. dancena* และ *O. celebensis* เป็น outgroup โดยใช้วิธี parsimony (branch-and-bound search) ข้อมูลทางสถิติเกี่ยวกับ tree มีดังนี้: CI = 0.977, RI = 0.966 และ RC = 0.944 ตัวเลขที่อยู่บนกิ่งแสดงความยาวของกิ่ง และตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บแสดง bootstrap support (%) จาก 1000 ซ้ำ

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของ *Oryzias* 5 ชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและประกอบการระบุชนิดของปลาในแต่ละชนิด โดย *O. minutillus* และ *O. mekongensis* มีความยาวมาตรฐานเฉลี่ย 11.98 และ 12.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Oryzias* ขนาดจิ๋วตามแบบของ พาเรนต์ (Parenti. 2008: 515) โดยปลาทั้งสองชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกัน คือ จำนวนก้านครีบทวาร จำนวนข้อกระดูกสันหลัง (Parenti. 2008: 503; Magtoon; & Termvidchakorn. 2009: 41) และลักษณะของสปีบริเวณครีบทวาร (Uwa; & Magtoon. 1986: 473-478) ในส่วนของ *O. javanicus*, *O. dancena* และ *O. celebensis* มีความยาวมาตรฐานเฉลี่ย 25.69 24.75 และ 27.94 มิลลิเมตร ตามลำดับ จัดอยู่ในกลุ่ม *Oryzias* ขนาดเล็ก (Parenti. 2008: 515) ปลาทั้งสามชนิดสามารถแยกออกจากกันได้จากจำนวนก้านครีบทวาร จำนวนก้านครีบทวาร (Parenti. 2008: 503; Magtoon; & Termvidchakorn. 2009: 40) และในการศึกษาครั้งนี้พบว่า จำนวนข้อกระดูกสันหลังของ *O. celebensis* มีจำนวนมากกว่าปลาชนิดอื่นที่ใช้ในการศึกษาอีกด้วย นอกจากนี้แล้วลักษณะรูปร่างพื้นฐานของปลาทั้งสามชนิดยังมีความแตกต่างกัน โดย *O. celebensis* จะมีแถบสีน้ำตาลเข้มตลอดแนวข้างลำตัว และบริเวณครีบทวารพบแถบสีเหลืองเข้มเป็นแนวทั้งด้านบนและด้านล่าง ในขณะที่ *O. javanicus* และ *O. dancena* มีลำตัวสีเทาใสตลอดทั้งลำตัว แต่สามารถแยกปลาทั้งสองชนิดได้จากขนาดของความกว้างลำตัวเนื่องจาก *O. dancena* นั้นมีความกว้างลำตัวเท่ากับ 34% ของความยาวมาตรฐาน ซึ่งถือว่ามีความกว้างที่สุดในปลาสกุล *Oryzias* รองจาก *O. profundicola* (Parenti. 2008: 516) และลักษณะครีบทวารของ *O. dancena* ยังมีลักษณะเป็นชายครุยและมีสีขาวเหลืองบริเวณขอบของครีบทวารอีกด้วยซึ่งทำให้สามารถแยกความแตกต่างของปลาทั้งสองชนิดได้ ส่วน *O. javanicus* นั้นในปลาเพศผู้บริเวณก้านครีบทวารนั้นจะพบ bony contact organ ซึ่งจะไม่พบในปลาทั้ง 5 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งปลาที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาก่อนหน้านี้

การจำแนกชนิดของปลาสกุล *Oryzias* โดยการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาอาจต้องอาศัยความเชี่ยวชาญและความชำนาญเฉพาะด้าน เนื่องจากมีขั้นตอนที่ละเอียดอ่อนประกอบกับตัวปลาที่มีขนาดเล็กในการศึกษาจึงอาจต้องใช้เวลาเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องชัดเจน การศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุลอาจสามารถช่วยลดเวลาในการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดปลาสกุล *Oryzias* ได้ เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้สามารถแยกชนิดของปลา *Oryzias* ที่ใช้ในการศึกษาได้จากขนาดของ PCR product (จากคู่ primer L15923 กับ Cont42Re) ที่แตกต่างกันโดย *O. minutillus*, *O. mekongensis* และ *O. celebensis* นั้นมีขนาดประมาณ 1500, 1000 และ 1100 คู่เบส ส่วน *O. javanicus* กับ *O. dancena* นั้นมีขนาดที่ใกล้เคียงกันคือประมาณ 1400 คู่เบส ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *DraI* (จิริรัตน์ กอบรัตนสุข; นันทิยา ภาระมาตย์; และ อรนิชา เลียนชอบ 2553:

unpublished) ซึ่งจะสามารถตัด PCR product ของ *O. dancena* ออกเป็นสองชิ้นที่มีขนาด 1000 และ 400 คู่เบส แต่ไม่สามารถตัด PCR product ของ *O. javanicus* ได้

ในด้านการศึกษาระดับความคมในไมโทคอนเดรียของ *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด มีความยาวที่แตกต่างกันตั้งแต่ 786-1305 คู่เบส ซึ่งความแตกต่างนี้เกิดจากการเพิ่ม (insertion) หรือการขาดหายไป (deletion) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากบริเวณความคมในไมโทคอนเดรียเป็นพื้นที่ไม่มีการถอดรหัส (non-coding region) ดังนั้นจึงพบอัตราการกลายสูงกว่าบริเวณอื่นในไมโทคอนเดรีย การศึกษารุ่นนี้พบบริเวณ TAS และ ETAS ใน domain I ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับของปลาชนิดอื่น เช่น ปลาในกลุ่มปลาเก๋า (Zhao; et al. 2006: 793-799) และกลุ่มปลาการ์ป (Guo; et al. 2003: 25-38) เป็นต้น ในส่วนของ domain II ซึ่งในสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปจะพบบริเวณ CSB-F, CSB-E, CSB-D, CSB-C และ CSB-B (Brown; et al. 1986: 503-511) แต่ในการศึกษารุ่นนี้พบเพียง CSB-F, CSB-E และ CSB-D และใน domain III พบบริเวณ CSB1, CSB2 และ CSB3 ซึ่งสอดคล้องกับที่พบในปลาหลายชนิด (Broughton; & Dowling. 1994: 179-190; Guo; Liu; & Liu. 2003: 25-38; Zhao; et al. 2006: 793-799)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลา *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ domain II และ III พบว่า *O. dancena* และ *O. javanicus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และ *O. minutillus* ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปลาทั้ง 2 ชนิดด้วย โดยมี *O. celebensis* เป็น sister group ส่วน *O. mekongensis* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Oryzias* ทั้ง 4 ชนิด ที่กล่าวมาแล้วน้อยที่สุด ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลของคาริโอไทป์เนื่องจาก *O. dancena* และ *O. javanicus* มีโครโมโซมจัดอยู่ในกลุ่ม monoarmed (Uwa. 1986: 867-876) *O. minutillus* มีโครโมโซมจัดอยู่ทั้งในกลุ่ม monoarmed และกลุ่ม fused (Magtoon; & Uwa. 1985: 157-160) *O. celebensis* มีโครโมโซมจัดอยู่ในกลุ่ม fused (Uwa; Iwamatsu; & Ojima. 1981: 95-98) และ *O. mekongensis* มีโครโมโซมจัดอยู่ในกลุ่ม biarmed (Uwa; & Magtoon. 1986: 473-478) ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน tyrosinase, (Takehana; Naruse; & Sakaizumi. 2005: 417-428) cytochrome *b* และ 12S rDNA (Naruse. 1996: 5-7) ดังนั้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ domain II และ III จึงสามารถใช้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของ *Oryzias* ชนิดต่างๆ ได้ (inter-specific variation)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณความคมในไมโทคอนเดรีย (domain I) พบว่าเป็นบริเวณที่มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงกว่า domain อื่นๆ จึงเหมาะสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตภายในชนิดเดียวกัน (intra-specific) ซึ่งในการศึกษารุ่นนี้พบว่า *O. minutillus* จากทั้ง 12 แหล่งมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงโดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0% (อยุธยา กับ นครสวรรค์) ถึง 9.685% (ประจวบคีรีขันธ์ กับ สงขลา) (ตารางภาคผนวก 1) และจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสามารถแบ่ง *O. minutillus* เป็น 2 clade โดยภายในแต่ละ clade แสดงการแพร่กระจายของ *O. minutillus* เป็นกลุ่มย่อยที่สอดคล้องกับระบบลุ่มน้ำของประเทศไทย (ราชบัณฑิตยสถาน. 2545: 105-133) (ภาพประกอบ

ภาคผนวก 1) โดยใน clade I ประกอบด้วย *O. minutillus* จากจังหวัดสุรินทร์ สระแก้ว และประเทศกัมพูชา (ระบบลุ่มน้ำโตนเลสาบ) และ *O. minutillus* จากจังหวัดสงขลา และนครศรีธรรมราช (ระบบลุ่มน้ำภาคใต้ฝั่งตะวันออก) ส่วน clade II ประกอบด้วย *O. minutillus* จากจังหวัดสุพรรณบุรี นครสวรรค์ สระบุรี และพระนครศรีอยุธยา (ระบบลุ่มน้ำเจ้าพระยา) และ *O. minutillus* จากจังหวัดเพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ (ระบบลุ่มน้ำเพชรบุรี) โดยมี *O. minutillus* จากจังหวัดเชียงราย ซึ่งจัดอยู่ในลุ่มน้ำโขงตอนบนเป็น sister group

จากรายงานการไอโทปีของ *O. minutillus* ในประเทศไทย พบว่ามีจำนวนโครโมโซมที่เป็นดิพลอยด์ ($2n$) ตั้งแต่ 28 ถึง 42 โดยแบ่งรูปแบบของโครโมโซมเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม primitive type ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม $2n = 40-42$ มีโครโมโซมขนาดใหญ่ 0-2 คู่ และกลุ่ม developed type ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม $2n = 28-34$ มีโครโมโซมขนาดใหญ่ 8-14 คู่ ในการศึกษาการไอโทปีของ *O. minutillus* จากจังหวัดสงขลา พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 42$ จัดอยู่ในกลุ่ม primitive type และ *O. minutillus* จากจังหวัดสุพรรณบุรี สระบุรี พระนครศรีอยุธยา และเชียงราย มีจำนวนโครโมโซม $2n = 28, 30, 30$ และ 32 ตามลำดับ จัดอยู่ในกลุ่ม developed type (Magtoon; et al. 1992: 489-497) ซึ่งผลจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในครั้งนี้แสดงแนวโน้มในการจัดกลุ่มของ *O. minutillus* ที่สอดคล้องกับรูปแบบของโครโมโซมกลุ่ม primitive type (clade I) และกลุ่ม developed type (clade II)

ดังนั้นถึงแม้ว่า *O. minutillus* จากแหล่งต่างๆ ที่ได้ศึกษาจะถูกจัดว่าเป็นชนิดเดียวกันทั้งหมด แต่ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้านการไอโทปีและด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลสามารถยืนยันได้ว่า *O. minutillus* เป็นชนิดที่มีความซับซ้อน (species complex) และ *O. minutillus* จากหลายแหล่งอาจมีจุดกำเนิดของสายวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาครั้งแรกที่แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาสกุล *Oryzias* ในประเทศไทย โดยอาศัยข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมไมโทคอนเดรีย ซึ่งแสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลา *Oryzias* ชนิดต่างๆ (inter-specific) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ domain II และ domain III และความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรของ *O. minutillus* (intra-specific) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ domain I ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้

นอกจากนั้นแล้วข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อติดตามผลที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะภูมิประเทศตามพื้นที่ลุ่มน้ำได้ เนื่องจากผลการศึกษาระดับชีวโมเลกุลของ *O. minutillus* ในประเทศไทยนั้นพบความแตกต่างทางพันธุกรรมแยกตามระบบลุ่มน้ำค่อนข้างชัดเจน อาจเป็นผลที่เกิดจากอัตราการแพร่กระจายของ *O. minutillus* ที่ต่ำ เนื่องจาก

ปลาชนิดนี้มีลำตัวขนาดเล็กทำให้การรอดชีวิตในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงค่อนข้างยาก รวมกับลักษณะของแหล่งอาศัยที่เป็นแหล่งน้ำนิ่งจึงมีการแพร่กระจายตามการท่วมถึงของแหล่งน้ำเป็นหลักเท่านั้น จึงสามารถนำข้อมูลที่ได้นี้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดการที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่ลุ่มน้ำให้เหมาะสมได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับการแพร่กระจายและความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาสกุลนี้ในประเทศไทยนั้นยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้นต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- จิริรัตน์ กอบรัตนสุข; นันทิยา ภาระมาตย์; และ อรนิชา เลียนชอบ. (2553) การศึกษาบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลาสกุล *Oryzias* 5 ชนิด และการจำแนกชนิดโดยเทคนิค PCR-RFLP. (ปัญหาพิเศษวิชาเอกชีววิทยา). กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อัดสำเนา
- ประเสริฐ ผ่องใส. (2548). สันฐานวิทยาและคัพภวิทยาของปลาในนาข้าว 2 ชนิด *Oryzias minutillus* และ *O. javanicus* (Pisces: Adrianichthyidae) ในจังหวัดสงขลา และภูเก็ต ภาคใต้ของประเทศไทย. ปรินูญานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- พิงนภา ไกรชุมพล. (2550). ความแปรปรวนด้านสันฐานวิทยาและความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและน้ำหนักของปลาในนาข้าว *Oryzias minutillus* Smith, 1945 ในภาคกลางตอนล่างและภาคใต้ของประเทศไทย. ปรินูญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- วิลาวัดณ์ คำศรี (2552). สันฐานวิทยาและเซลล์พันธุศาสตร์ของปลาข้าวสาร *Oryzias minutillus* และ *O. mekongensis* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. ปรินูญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- วิเชียร มากตุ่น. (2530ก). การศึกษาชีววิทยาบางประการของปลา *Oryzias minutillus* ในภาคกลางและภาคเหนือของไทย. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน.
- วิเชียร มากตุ่น. (2530ข). การแพร่กระจายและสันฐานวิทยาของปลา *Oryzias* ทางภาคใต้ของประเทศไทย. กรุงเทพฯ: คณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ.
- วิเชียร มากตุ่น; และ อิโรชิ อุวะ. (2531). รายงานครั้งแรกเกี่ยวกับปลา *Oryzias melastigma* ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: รายงานผลการวิจัยในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 26. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อุทัยรัตน์ ณ นคร; และ วงศ์ปฐม กมลรัตน์. (2551). พันธุศาสตร์ประชากรเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และสำนักงานกองทุนการวิจัย.
- ราชบัณฑิตยสถาน. (2545). อักษรานุกรมภูมิศาสตร์ไทย เล่ม 1 ฉบับราชบัณฑิตยสถาน. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร. ราชบัณฑิตยสถาน.
- Ashida, T.; & Uwa, H. (1987). Karyotype polymorphism of a small ricefish, *Oryzias minutillus*. *Zoological Science*. 4: 1003.
- Bennet, J.L.; & Clayton, D.A. (1990). Efficient site-specific cleavage by RNase MRP requires interaction with two evolutionarily conserved mitochondrial RNA sequences. *Molecular and Cellular Biology*. 10(5): 2191-2201.

- Berra, T. M. (2001). *Freshwater fish distribution*. San Diego: Academic Press.
- Broughton, R. E.; & Dowling, T. E. (1994). Length variation in mitochondrial DNA of the minnow *Cyprinella spiloptera*. *Genetic*. 138(1): 179-190.
- Broughton, R.E.; Milam, J.E.; & Roe, B.A. (2001). The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Research*. 11: 1958-1967.
- Brown, G.G.; et al. (1986). Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology* 192: 503-511.
- Chen, Y.R.; Uwa, H.; & Chu, X.L. (1989). Taxonomy and distribution of the genus *Oryzias* in Yunnan, China (Cyprinodontiformes: Oryziidae). *Acta Zootaxonomica Sinica*. 14: 239-246.
- Cosmesaño, A.S.; Martínez-Areal, M.T.; & Sanjuan, A. (2008). Genetic variation in the mitochondrial DNA control region among horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the Atlantic and Mediterranean areas. *Fisheries Research*. 89: 122-131.
- Dingerkus, G.; & Uhler, L. D. (1977). Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technology*. 52(4): 229-232.
- Doda, J.N.; Wright, C.T.; & Clayton, D.A. (1981). Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78(10): 6116-6120.
- Guo, X.H.; Liu, S.J. & Liu, Y. (2003). Comparative analysis of the mitochondrial DNA control region in cyprinids with different ploidy level. *Aquaculture*. 224: 25-38.
- Hubbs, C.L.; & Lagler K.F. (1967). *Fishes of the Great Lakes region*. Michigan: University of Michigan Press.
- Iguchi, K.; & Nishida, M. (2000). Genetic biogeography among insular populations of the amphidromous fish *Plecoglossus altivelis* assessed from mitochondrial DNA analysis. *Conservation Genetics*. 1: 147-156.
- Ishikawa, S.; Tsukamoto, K.; & Nishida, M. (2004). Genetic evidence for multiple geographic populations of the giant mottled eel *Anguilla marmorata* in the Pacific and Indian oceans. *Ichthyological Research*. 51(4): 343-353.
- Iwamatsu, T. (2004). Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development*. 121: 605-618.

- Iwamatsu, T.; et al. (1982). On *Oryzias javanicus* collected at Jarkata, Singapore, and west Kalimantan. *Annotationes Zoologicae Japonenses*. 55: 190-198.
- Jeanmougin, F.J.; et al. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*. 23: 403-405.
- Kang, T.; et al. (2005). Molecular phylogeny and geography of Korean medaka fish (*Oryzias latipes*). *Molecules and Cells*. 20(1): 151-156.
- Kasahara, M.; et al. (2007). The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*. 447: 714-719.
- Kottelat, M. (2001). *Fishes of Laos*. Columbo, Sri Lanka: WHT Publication (Pte) Ltd.
- Magtoon, W. (1986). Distribution and phyletic relationships of *Oryzias* fishes in Thailand. In *Indo Pacific Fish Biology*. T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi, and K. Matsuura, (eds). pp. 859-866. Tokyo: Ichthyological Society of Japan.
- Magtoon, W.; & Termvidchakorn, A. (2009). A revise taxonomic account of ricefish *Oryzias* (Beloniformes; Adrianichthyidae), in Thailand, Indonesia and Japan. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University*. 9(1): 35-68.
- Magtoon, W.; & Uwa, H. (1985). Karyotype evolution and relationship of a small ricefish, *Oryzias minutillus*, from Thailand. *Proceedings of the Japan Academy*. 61(4): 157-160.
- Magtoon, W.; et al. (1992). Karyotype evolution and geographical distribution of the Thai-medaka, *Oryzias minutillus*, in Thailand. *Journal of Fish Biology*. 41(3): 489-497.
- Magtoon, W.; et al. (1995). Distribution and chromosome diversity of Thai-medaka, *Oryzias minutillus* in Thailand. *Proceedings of the 7th International Symposium on River and Lake Environments*. 9: 137-147.
- Meyer, A. (1994). DNA technology and phylogeny of fish. In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. A.R. Beaumont (ed). pp. 219-249. London: Chapman & Hall.
- Miya, M.; et al. (2003). Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 26: 121-138.
- Nagabo, T. (2002). *Introduction to Ichthyology*. Japan: Tokai University Press.
- Naruse, K. (1996). Classification and phylogeny of fishes of genus *Oryzias* and its relatives. *The Fish Biology Journal Medaka*. (8): 1-9.
- Nelson, J.S. (2006). *Fishes of the World*. New York: John Wiley & Sons.
- Noack, K.; Zardoya, R.; & Meyer, A. (1996). The complete mitochondrial DNA sequence of the Bichir (*Polypterus ornatipinnis*), a basal ray-finned fish: ancient establishment of the consensus vertebrate gene order. *Genetics*. 144(3): 1165-1180.

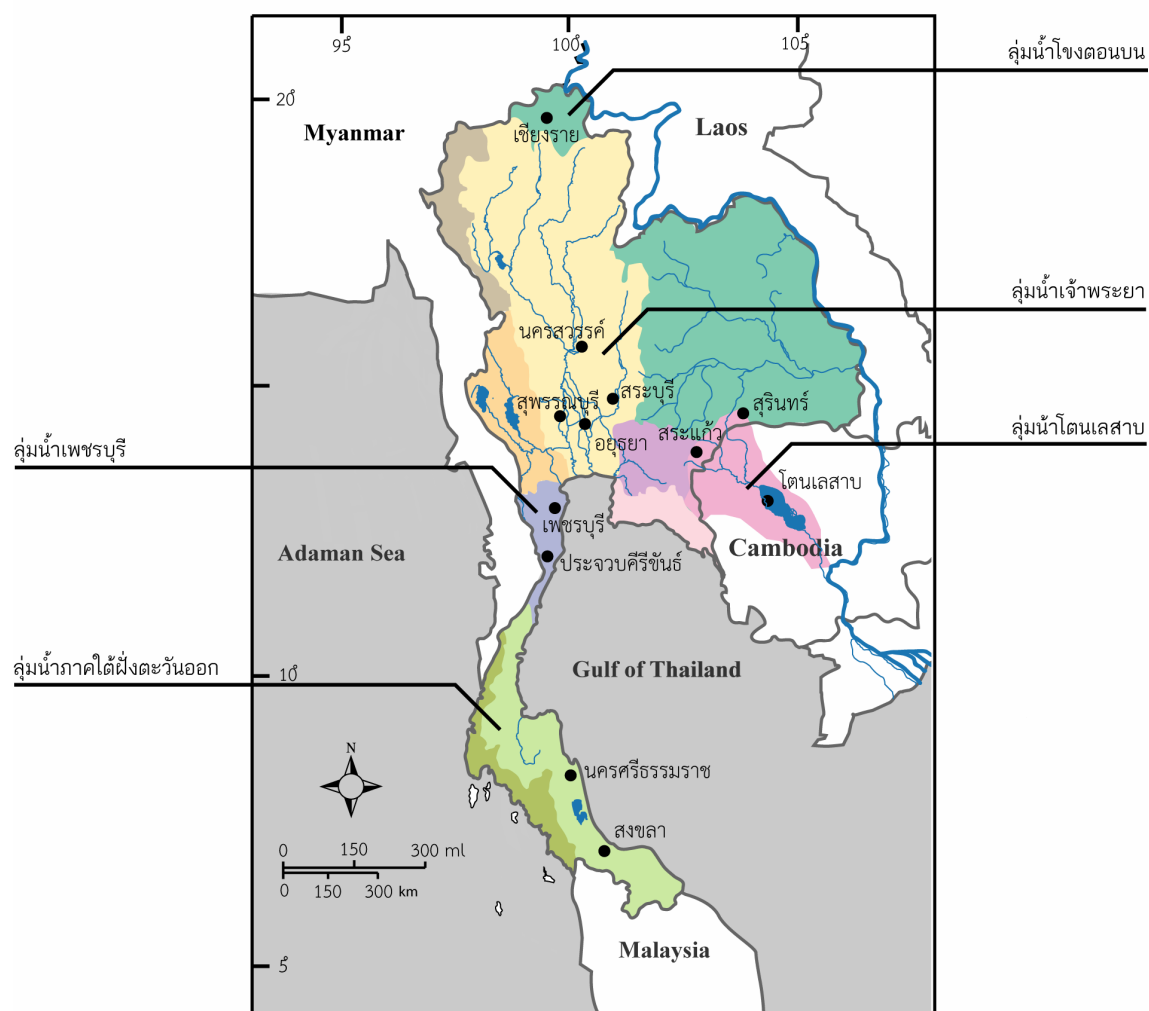
- Parenti, L.R. (2008). A phylogenetic analysis and taxonomic revision of ricefishes, *Oryzias* and relatives (Beloniformes, Adrianichthyidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 154: 494-610.
- Potthoff, T. (1984). Clearing and staining techniques. In *Ontogeny and Systematics of Fishes*. H.G. Moser, W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall, Jr., and S.L. Richardson, (eds). pp. 35-37. USA: American Society of Ichthyologists and Herpetologists.
- Roberts, T.R. (1998). Systematic observations on tropical Asian medakas or ricefishes of genus *Oryzias* with description of four new species. *Ichthyological Research*. 45: 213-224.
- Ruokonen, M. (2001). *Phylogeography and conservation genetics of the lesser white-fronted goose (Anser erythropus)*. Finland: Faculty of Science, University of Oulu.
- Sakai, T.; et al. (2003). Phylogenetic relationships and intraspecific variations of loaches of the genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes). *Zoological Science*. 20(4): 501-514.
- Sakaizumi, M. (1985) Species-specific expression of parvalbumins in the genus *Oryzias* and its related species. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 80B(3): 499-505.
- Scheel, J.J. (1969). *Oryzias minutillus* Smith 1945, A little known dwarf killifish from Thailand. *Journal of the American Killifish Association*. 6(1): 5-7.
- Smith, H.M. (1945). *The fresh-water fishes of Siam, or Thailand*. Washington: Bulletin of United States National Museum.
- Swofford, D.L. (1998). PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Takehana, Y.; Naruse, K.; & Sakaizumi, M. (2005). Molecular phylogeny of the medaka fishes genus *Oryzias* (Beloniformes: Adrianichthyidae) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 36: 417-428.
- Takata, K.M.; et al. (1993). Genetic differentiation of *Oryzias minutillus* in Thailand. *Japanese Journal of Ichthyology*. 39(4): 319-327.
- Takehana, Y.; et al. (2004). Geographic variation and diversity of the cytochrome *b* gene in wild population of medaka (*Oryzias latipes*) from Korea and China. *Zoological Science*. 21: 483-491.
- Thai, B.T.; Pham, T.A.; & Austin, C.M. (2006). Genetic diversity of common carp in Vietnam using direct sequencing and SSCP Analysis of the Mitochondrial DNA Control Region. *Aquaculture*. 258: 228-240.

- Tsuyuki, S.; & Uwa, H. (1988). Meiotic analysis of chromosomal polymorphism in *Oryzias minutilus* from Thailand. *Zoological Science*. 5: 1224.
- Tzeng, C.-S.; et al. (2006). The phylogeography and population demographics of selected freshwater fish in Taiwan. *Zoological Studies*. 45(3): 285-297.
- Uwa, H. (1986). Karyotype evolution and geographical distribution in the ricefish, genus *Oryzias* (Oryziidae). In *Indo-Pacific Fish Biology: Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fish*. Tokyo Japan: Ichthyological Society of Japan.
- Uwa, H. (1991). Cytosystematic study of the Hainan medaka, *Oryzias curvinotus*, from Hong Kong (Teleostei: Oryziidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. 1(4): 361-367.
- Uwa, H.; & Iwata, A. (1981). Karyotype and cellular DNA content of *Oryzias javanicus* (Oryziatidae, Pisces). *Chromosome Information Service*. 31: 24-26.
- Uwa, H.; & Magtoon, W. (1986). Description and karyotype of a new ricefish, *Oryzias mekongensis*, from Thailand. *Copeia*. 2: 473-478.
- Uwa, H.; & Parenti, L.R. (1988). Morphometric and meristic variation in ricefish, genus *Oryzias*: a comparison with cytogenetic data. *Japanese Journal of Ichthyology*. 35(2): 159-166.
- Uwa, H.; Iwamatsu, T.; & Ojima, Y. (1981). Karyotype and banding analyses of *Oryzias celebensis* (Oryziatidae, Pisces) in cultured cells. *Proceedings of the Japan Academy*. 57B: 95-99.
- Uwa, H.; Wang, R.F.; & Chen, Y.R. (1988). Karyotypes and geographical distribution of ricefishes from Yunnan, southwestern China. *Japanese Journal of Ichthyology*. 35: 332-340.
- Yamamoto, T. (1975). *Medaka (Killifish): Biology and Strains*. Tokyo: Keigaku Publishing Company.
- Yamanoue, Y.; et al. (2006). The mitochondrial genome of spotted green pufferfish *Tetraodon nigroviridis* (Teleostei: Tetraodontiformes) and divergence time estimation among model organisms in fishes. *Genes and Genetic Systems*. 81: 29-39.
- Yue, G.H.; Liew, W.C.; & Orban L. (2006). The complete mitochondrial genome of basal teleost, the Asian arowana (*Scleropages formosus*, Osteoglossidae). *BMC Genomics*. 242(7): 1-13.
- Zhao, J.-L.; et al. (2006). Structure of the mitochondrial DNA control region of the sinipercine fishes and their phylogenetic relationship. *Acta Genetica Sinica*. 33(9): 793-799.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวก 1 Pairwise distance แสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของ *O. minutillus* 12 แหล่ง และ outgroup

<i>O. minutillus</i>	กัมพูชา	สุรินทร์	สระแก้ว	สงขลา	นครศรีธรรมราช	สุพรรณบุรี	นครสวรรค์	สระบุรี	เพชรบุรี	ประจวบคีรีขันธ์	เชียงราย	พระนครศรีอยุธยา	<i>O. dancena</i>
กัมพูชา	-												
สุรินทร์	0.00733	-											
สระแก้ว	0.00734	0.00979	-										
สงขลา	0.03366	0.03882	0.03754	-									
นครศรีธรรมราช	0.03365	0.03881	0.03754	0.00243	-								
สุพรรณบุรี	0.08009	0.08007	0.07867	0.09540	0.09538	-							
นครสวรรค์	0.08010	0.08009	0.07869	0.09542	0.09539	0.00121	-						
สระบุรี	0.07871	0.07870	0.07730	0.09398	0.09396	0.00243	0.00121	-					
เพชรบุรี	0.07732	0.07731	0.07591	0.09541	0.09539	0.00365	0.00243	0.00365	-				
ประจวบคีรีขันธ์	0.07870	0.07870	0.07730	0.09685	0.09683	0.00487	0.00365	0.00487	0.00121	-			
เชียงราย	0.07869	0.07869	0.07729	0.09684	0.09682	0.00487	0.00365	0.00487	0.00365	0.00487	-		
พระนครศรีอยุธยา	0.08010	0.08009	0.07869	0.09542	0.09539	0.00121	0.00000	0.00121	0.00243	0.00365	0.00365	-	
Outgroup													
<i>O. dancena</i>	0.38705	0.39007	0.39165	0.39912	0.39887	0.36413	0.36402	0.36371	0.36624	0.36853	0.36156	0.36402	-
<i>O. celebensis</i>	0.80408	0.81170	0.80260	0.81156	0.81286	0.78925	0.78894	0.78315	0.7951	0.80107	0.78164	0.78894	0.71109



ภาพประกอบภาคผนวก 1 แหล่งตัวอย่างของ *O. minutillus* ในแต่ละระบบลุ่มน้ำ

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวสินุทัย สมิตธิคุณานนท์
วันเดือนปีเกิด	20 เมษายน 2527
สถานที่เกิด	299/50 วิสตัด้าปาร์ควิวาวดี ถนนวิภาวดี แขวงตลาดบางเขน เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	299/50 วิสตัด้าปาร์ควิวาวดี ถนนวิภาวดี แขวงตลาดบางเขน เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210 โทร 025517736 E-mail satonika@hotmail.com
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2545	มัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนอัมพรไพศาล จังหวัดนนทบุรี
พ.ศ. 2549	ปริญญาศึกษาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์-ชีววิทยา จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2553	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ