



รายงานการวิจัย

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุสายพันธุ์แมงกะพรุนน้ำจืด

DNA Barcoding for Identification of Freshwater Jellyfish

(*Craspedacusta sowerbii*)

กาญจน์ คุ่มทรัพย์ และคณะ

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุสายพันธุ์แมงกะพรุนน้ำจืด

DNA Barcoding for Identification of Freshwater Jellyfish **(*Craspedacusta sowerbii*)**

กาญจน์ คุ่มทรัพย์

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

สาขาวิชาชีววิทยา

ทุนอุดหนุนโดยงบประมาณแผ่นดินที่พิจารณาจากโดยผ่านความเห็นชอบจาก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ 2561

(ก)

ชื่องานวิจัย	ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุสายพันธุ์แมงกะพรุนน้ำจืด
ผู้วิจัย	กาญจน์ คุ้มทรัพย์
ผู้ร่วมวิจัย	สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ศึกษา
	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ปีเสร็จวิจัย 2561

บทคัดย่อ

การสกัดดีเอ็นเอแมงกะพรุนน้ำจืด แล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพ ด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี มีแถบขนาดใหญ่ที่ชัดเจน ปนเปื้อนด้วยโปรตีน และอาร์เอ็นเอเล็กน้อย สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน COI ต่อไป ได้ด้วยปฏิกิริยา PCR ได้ ผลผลิตที่มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิว คลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืด โปรแกรม ClustalW พบว่า แมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 10 ตัวอย่าง นี้มีความยาวของยีนไม่เท่ากัน โดยมีความยาวอยู่ใน ช่วง 621-636 คู่เบส ซึ่งมีความยาวสั้นกว่า ที่มีรายงานในการศึกษาอื่นๆ ที่ผ่านมา การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืด จำนวน 4 ชนิด กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD โดยพิจารณาจากค่า % similarity พบว่า ในฐานข้อมูล ทั้งสองยังไม่มียารายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด แสดงว่าในปัจจุบันนี้ยังไม่มี การศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดนี้ ทำให้สามารถเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน COI ในฐานข้อมูลทั้งสองนี้ได้

คำสำคัญ : ดีเอ็นเอ, บาร์โค้ด, แมงกะพรุนน้ำจืด

Title	DNA Barcoding for Identification of Freshwater Jellyfish (<i>Craspedacusta sowerbii</i>)
Researcher	Asst. Dr.Kan Khoomsab
Co - Researcher	Surachest Aiumsumang, Ruchira Khoomsab, Wilaiporn Pongpian and Chanakan Winyakul
Program	Education Science Phetchabun Rajabhat University Year 2018

Abstract

The extraction of DNA and then this will bring to inspect the quality with the 1% agarose gel electrophoresis method, this is found that the extracted DNA will have the good quality. This will have the clear large size stripe which will contaminate with the protein and a little bit of RNA. This can bring to use in increasing the quantity of the COI gene further with the reaction of PCR which will get the productivity that has the size approximately at 650 conjugate acid-base pair and when this has compared the sequence of nucleotide of the COI gene of the freshwater jellyfish. The can find from the ClustalW program that 10 samples of freshwater jellyfishes will have the different length of genes. By this will have the length from 621 to 636 conjugate acid-base pair which will have the shorter length. This has reports in the past of other studies. There is the comparison of the resemblance of the sequence of nucleotide of the COI gene of 4 types of freshwater jellyfishes with other living things in the database of GenBank and BOLD. By this will consider from the value of % similarity, this is found that in both of 2 databases, this won't have the report of the sequence of nucleotide of the COI gene in 4 types of freshwater jellyfishes. This has shown that in the current situation, there is no the study about the sequence of nucleotide of the COI gene in 4 types of freshwater jellyfishes. This will make to be able to increase the information of the sequence of nucleotide of the COI gene in this both of 2 databases.

Keywords : DNA, Barcoding, Freshwater Jellyfish

(ก)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยคำแนะนำต่าง ๆ จากคณะผู้วิจัยและความร่วมมือช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายฝ่าย ที่สละเวลาให้คำแนะนำ คำปรึกษา รวมถึงข้อเสนอแนะต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้มา ณ ที่นี้ด้วย

กาญจน์ คุ่มทรัพย์และคณะ

1 กันยายน 2561

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 นิยามศัพท์เฉพาะ	2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	
2.1 การจัดอนุกรมวิธาน	4
2.2 รูปร่างและหน้าที่	5
2.3 วงจรชีวิต (Life Cycles)	6
2.4 การจำแนกชนิด	6
2.5 ดีเอ็นเอบาร์โค้ด	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	
3.1 ตัวอย่างที่ทำการศึกษา	10
3.2 การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์	10
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล	11

(จ)

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การสกัดดีเอ็นเอ	13
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	15
เอกสารอ้างอิง	18
ประวัติผู้วิจัย	19

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

แก่งบางระจัน ตำบลหนองแม่นา อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์เป็นที่อยู่อาศัยของแมงกะพรุนน้ำจืด(Freshwater jellyfish) ในประเทศไทย ปัจจุบันพบในหลายพื้นที่ทั่วประเทศ สำหรับชนิดของแมงกะพรุนน้ำจืดในประเทศไทย มีรายงานการค้นพบ 2 สายพันธุ์ คือ *Craspedacusta sinensis* เป็น แมงกะพรุนน้ำจืดสายน้ำนิ่ง พบได้แถบลุ่มน้ำโขง เช่น น่าน เลย สกลนคร นครพนม มุกดาหาร และ อุบลราชธานี *Craspedacusta sowerbyi* ซึ่งเป็นแมงกะพรุนสายน้ำไหล พบที่เพชรบูรณ์แห่งเดียวในขณะนี้ (สมบัติ, 2556) และเมื่อวันที่ 30 มกราคม 2558 จังหวัดเพชรบูรณ์ได้ประกาศให้แมงกะพรุนน้ำจืด สายพันธุ์น้ำไหล มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Craspedacusta sowerbyi* Lankester, 1880 เป็นสัตว์น้ำประจำจังหวัด ชาวบ้านเรียกแมงกะพรุนชนิดนี้ว่า "แม่ขี้มวะ" ซึ่งมีอยู่แห่งเดียวในประเทศไทย พบเมื่อปี 2544 บริเวณแก่งบางระจันและแก่งวังน้ำเย็นของลำน้ำเข็ก นับเป็นการพบแมงกะพรุนน้ำจืดสายพันธุ์น้ำไหลแหล่งที่ 2 ของโลก หลังจากพบที่สหรัฐอเมริกา ในต่างประเทศ Duggan และคณะ พบการแพร่กระจายแมงกะพรุนน้ำจืดสายพันธุ์ *Craspedacusta sowerbyi* ในประเทศนิวซีแลนด์ โดยส่วนใหญ่แล้วจะพบในระยะเมดูซา Galarce และคณะ (2013) ได้รายงาน New record แมงกะพรุนน้ำจืด *Craspedacusta sowerbyi* ที่พบในประเทศชิลี โดยพบในทะเลสาบที่มีความลึกถึง 15 เมตร เป็นแหล่งน้ำที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงและอยู่ห่างไกลจากชุมชน และพบแพลงก์ตอนในกลุ่มของ Chlorophytes, Dynophytes, Diatoms, Chrysophytes Cryptophytes, Cyanobacteria, Copepods, Cladocerans, Rotifers, Freshwater mites และ Cnidarian ในขณะที่ Jankowski (2001) ทบทวนรายงานการพบแมงกะพรุนน้ำจืดในระยะเมดูซา มากกว่า 20 ชนิด 6 สกุล โดย สกุล *Craspedacusta* (*C. sowerbyi*, *C. iseanum*, *C. sinensis* (and maybe *C. sichuanensis* and *C. ziguiensis*)) พบมากในแถบแอฟริกา และ (*L. tanganjicae*, *L. victoriae*, *L. congoensis*) และอีก 3 ชนิดพบในประเทศอินเดีย (*L. indica*, *L. biharensis*, *L. nepalensis*) และบางชนิดพบในประเทศญี่ปุ่น คือ ชนิด *Mansariella* และ *Keralika* และยังมีรายงานการพบแมงกะพรุนน้ำจืดในหลายๆ ประเทศทั่วโลก (Raposeiro et al. 2001)

ปัจจุบันนักวิจัยยังไม่เข้าใจถึงการกำเนิดของแมงกะพรุนน้ำจืดอย่างชัดเจน ถึงแม้ว่าจะมีสมมติฐาน ที่ใช้กันแพร่หลายว่า แมงกะพรุนน้ำจืดเป็นสัตว์ดึกดำบรรพ์ เกิดจากการถูกขังแยกจากทะเลในช่วงพื้นโลกยกตัวขึ้น แล้วจึงปรับตัว ให้สามารถดำรงชีวิตในน้ำจืดได้และการพัฒนาของวงแหวนเพื่อช่วยในการพยุงตัวในน้ำจืด และยังเป็นที่ยสงสัยว่าถ้าสมมติฐานนี้เป็นจริง ทำไมแมงกะพรุน สกุล *Craspedacusta* (ที่มีการพัฒนาขอบวงแหวน) จำนวน 11 ชนิด และมีแค่ 3 ชนิด คือ *Craspedacusta sowerbyi*, *C. iseana* และ *C. sinensis* ที่สามารถอาศัยอยู่ในน้ำจืด ส่วนอีก 8 ชนิด กลับอาศัยอยู่แต่ในน้ำเค็ม นักวิจัยบางส่วนเชื่อว่า แมงกะพรุน น้ำจืดมีเพียง 2 ชนิด คือ *C. sowerbyi* และ *C. sinensis* เท่านั้น ส่วน *C. iseana* เป็นตัวเดียวกันกับ *C. sinensis* แต่บางกลุ่มก็ยังมีเชื่ออีกว่ามีเพียงชนิดเดียวคือ *C. sowerbyi* และ มีต้นกำเนิดชีวิตในประเทศจีน แล้วจึงแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆ ของโลกที่มีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน แต่ในพฤติกรรมและวงจรชีวิตยังคงเหมือนกันอยู่

Dayrat (2005) ได้กล่าวไว้ว่าการพรรณนาสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้องเหมาะสมและการระบุสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นสิ่งที่ยากลำบากในการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต เพราะไม่สามารถตัดสินได้ว่ามีความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างหรือไม่การระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นขึ้นอยู่กับความรู้ของนักอนุกรมวิธานซึ่งไม่ครอบคลุมทุกตัวอย่างทั้งหมดที่มีอยู่เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้ จึงได้เกิดแนวคิดของระบบการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตที่เป็นมาตรฐานโดยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นในระหว่างปี ค.ศ. 1990 - 1999 โดยใช้เทคนิคการทำพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction :PCR) วิธีการระบุชนิดโดยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลนี้ได้ขยายแนวทางการใช้ให้กว้างขึ้น โดยการนำมาใช้ระบุชนิดของแบคทีเรีย การสำรวจความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก และการวินิจฉัยเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคซึ่งทำให้ประหยัดเวลาโดยไม่ต้องเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีการมีพื้นฐานอยู่บนหลักการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลหลายๆวิธีได้นำมาใช้ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำและประสบความสำเร็จ แต่วิธีการที่ใช้ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเหล่านั้นยังไม่ประสบความสำเร็จในสิ่งมีชีวิตที่สูงกว่า (Frezal and Leblois, 2008) จึงได้มีการเสนอแนวความคิดเกี่ยวกับ การใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์หรือที่เรียกว่า “DNA barcode” หรือ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่นิยมใช้ ได้แก่ ยีน cytochrome c oxidase I (COI) เป็นยีนที่อยู่บนไมโทคอนเดรีย มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส (Hebert et al., 2003) ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีลักษณะเป็นเอกลักษณ์เฉพาะในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันเท่านั้น และแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ อย่างชัดเจน จึงสามารถใช้ตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิต แม้ว่าตัวอย่างที่ได้มานั้นไม่สมบูรณ์หรืออยู่ในระยะการเจริญเติบโตต่างๆ Fritz และคณะ (2009) ได้ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดประชากรของแมงกะพรุนน้ำจืด *Craspedacusta sowerbii* ที่แพร่กระจายในประเทศเยอรมันและออสเตรียโดยใช้ internal transcribed spacers

(ITS) และ cytochrome oxidase subunit I (COI) พบว่า จากการเปรียบเทียบดีเอ็นเอของแมงกะพรุนน้ำจืดที่พบในประเทศจีน เยอรมันและออสเตรเลียมีความคล้ายคลึงกัน และในปัจจุบันมีการรายงานการพบแมงกะพรุนน้ำจืดทั่วโลก และระบุชนิดที่พบโดยยีน COI (Zou และคณะ, 2012) ในขณะที่ประเทศไทยเป็นแหล่งที่พบแมงกะพรุนน้ำจืดอีกประเทศหนึ่งแต่ยังขาดหลักฐานและข้อมูลทางด้านดีเอ็นเอ เพื่อยืนยันชนิดที่พบในประเทศไทยจากข้อมูลดังกล่าว โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ยีน COI เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดแมงกะพรุนน้ำจืดในพื้นที่แก่งบางระจัน ตำบลหนองแม่นา อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์และพื้นที่อื่น ๆ ในประเทศไทย และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถรวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดและประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของแมงกะพรุนน้ำจืดในประเทศไทยต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาการใช้ยีน COI เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดแมงกะพรุนน้ำจืด
- 2) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมงกะพรุนน้ำจืดในประเทศไทย

1.3 นิยามศัพท์เฉพาะ

แมงกะพรุนน้ำจืด หมายถึง เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังสกุลหนึ่ง จัดอยู่ในพวกแมงกะพรุนที่อยู่ในชั้นไฮโดรซัว ต่างจากแมงกะพรุนที่พบในทะเลที่ส่วนมากจะอยู่ในชั้นไซโฟซัว ใช้ชื่อสกุลว่า *Craspedacusta*

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด หมายถึงวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการระบุชนิดหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตภายในเวลาอันรวดเร็ว วิธีการนี้อาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในบริเวณที่เรียกว่า “ดีเอ็นเอมาตรฐาน” จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชื่อ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ยกย่ององค์ความรู้ชีววิทยาของแมงกะพรุนน้ำจืดในประเทศไทย
- 2) ส่งเสริมการอนุรักษ์สายพันธุ์กรรมของแมงกะพรุนน้ำจืดในจังหวัดเพชรบูรณ์

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

2.1 การจัดอนุกรมวิธาน

Kindom Animalia

Phylum Cnidaria

Class Hydrozoa

Subclass Trachylinae

Order Limnomedusae

Family Olindiidae

Genus *Craspedacusta*

Species *Craspedacusta sowerbii*

Cnidaria (Knide, nettle = ทำให้ระคายเคือง + aria = เกี่ยวข้องกับ) หรือเรียกสัตว์กลุ่มนี้ว่า ไนดาเรียน (Cnidarian) เป็นสัตว์ที่มีสมมาตรแบบรัศมีและสองซีกซ้ายขวาเป็นกลุ่มแรก มีจำนวนกว่า 9,000 ชนิด ชื่อไฟลัมเดิมคือ Coelenterata ซึ่งหมายถึงมีช่องว่างกลางลำตัวเป็นท่อทางเดินอาหาร ไนดาเรียนเป็นบรรพบุรุษของกลุ่มสัตว์จากหลักฐานซากดึกดำบรรพ์มากกว่า 700 ล้านปี สัตว์ในไฟลัมไนดาเรียนดำรงชีวิตในทะเลในบริเวณน้ำตื้นเป็นส่วนใหญ่ แต่มีในบางชนิดที่อยู่ในน้ำจืด เมื่อโตเต็มวัยจะมีสมมาตรแบบรัศมีและแบบสองซีก การแบ่งส่วนร่างกายไม่มีส่วนหัว ตัวอย่างสัตว์ในกลุ่มนี้ได้แก่ แมงกะพรุน ปะการัง กาลปังหา ดอกไม้ทะเล ไฮดรา สัตว์กลุ่มนี้จะรวมเอา Ctenophora ไว้ด้วย ชื่อไนดาเรียนมาจากเซลล์จำเพาะที่เรียกว่าไนโดไซต์ (Cnidocytes) ไนโดไซต์มีออร์แกเนลล์เป็นถุงเข็มพิษที่เรียกว่า นิมาโทซิสต์ (Nematocysts) นิมาโทซิสต์พบได้ในไนดาเรียนและพบในสัตว์ Phylum Ctenophora อีกเพียง 1 ชนิดเท่านั้น

ไนดาเรียนส่วนใหญ่อยู่ในทะเล มีบางชนิดเท่านั้นที่อยู่ในน้ำจืด มีการประสานการทำงานระหว่างเซลล์ คือ อีพิเดอร์มิส และ แกสโตรเดอริมิส (gastrodermis) และคั่นกลางด้วยมีโซเกลีย (mesoglea) ที่มีสารวุ้นและอิมูไซต์ ท่อกลางตัว (gastrovascular cavity) มีช่องเปิดเพียงช่องเดียวทำหน้าที่เป็นปากปลาทวารหนัก มีไนโดไซต์ (cnidocyte) เป็นเซลล์จำเพาะที่สร้างออร์แกเนลล์พิเศษที่มีเข็มพิษคือ นิมาโทซิสต์ (nematocyst) เพื่อใช้ในการจับอาหาร ป้องกันตัวและยึดเกาะ เดิมเคยเรียกเซลล์นี้ว่า ไนโดลาสต์ (cnidolast) แต่ปัจจุบันคำว่าไนโดลาสต์ใช้ในความหมายของไนโดไซต์ที่อยู่ในระหว่างการเจริญเติบโต ไนโดไซต์กระจายทั่วไปที่ผิวของอีพิเดอร์มิส แต่จะมากที่

หนวดและรอบปาก และจะพบในแกสโตรโตร์มิสของไน ครากลุ่มอื่นๆ ไนโดไซด์เป็นเซลล์รูปไข่ มีนิวเคลียสอยู่ที่ฐานของเซลล์ ด้านที่อยู่ผิวของอพิเคอมีสจะมีเดือยไนโดซิล (cnidocill) ยื่นออกไป ซึ่งจะถูกระคายด้วยสารเคมีหรือการสัมผัส ภายในเซลล์มีถุงเข็มพิษ (nematocyst) ซึ่งมีผนังแคปซูล ด้านหน้ามีฝา (lid, operculum) ปิดอยู่ด้านหน้าของแคปซูลเรียวยาวเล็กลงไปเป็นท่อขุดอยู่ภายในคล้ายเส้นด้าย (thread) ขดตัวอยู่ เมื่อถูกระคายที่ไนโดซิล ฝาเปิดออก และเส้นด้ายด้วยพิษจะดีดออกไปในลักษณะปรีนเอาภายใน สารพิษที่ไนโดไซด์สร้างขึ้นจะส่งมาที่เข็มพิษ สารพิษที่สกัดมาได้มีหลายชนิด แต่ทั้งหมดเป็นสารประกอบโปรตีน และสารพาที่มีผลต่อระบบประสาททำให้เกิดอัมพาต (paralyzing neurotoxin) เมื่อสัตว์ขนาดเล็กถูกเข็มพิษเหล่านี้และในดาเรียบางชนิดเช่น Portuguese man-of-war (*Physalia*) มีพิษ ทำให้เกิดความเจ็บปวด และเป็นแผลเป็น หรือเกิดอาการไหม้ที่บริเวณถูกพิษ และอาการระคายเคืองต่างๆ พิษของแมงกะพรุนจำพวกต่อทะเล (sea wasp) สามารถทำให้คนตายได้ภายในเวลาครึ่งชั่วโมง

2.2 รูปร่างและหน้าที่

ในดาเรียมีลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกันสองแบบ และรูปร่างทั้งสองแบบนี้จะมีอยู่ในแต่ละภาคของวัฏจักรชีวิต รูปร่างที่เป็นฐานสองแบบนี้ คือ

1.แบบโพลิบ (polyp) เป็นรูปร่างทรงกระบอก ปลายด้านหนึ่งเป็นฐาน ใช้ในการยึดเกาะต่างๆเป็นแวนฐาน (basal disc) หรือแวนเท้า (pedal disc) ส่วนลำตัวเป็นทรงกระบอก (column body) เป็นท่อตั้งขึ้น ปลายด้านบนคือแวนปาก (oral disc) ประกอบด้วยแผ่นเนื้อที่ประกอบนูนสูงที่เรียกว่าไฮโปสโตม (hypostome) ช่องปากอยู่กึ่งกลาง ไฮโปสโตม ที่รอยต่อระหว่างลำตัวและรอยปากจะมีหนวดเรียงตัวโดยรอบ และอาจมีหนวดเรียงตัวอยู่ไฮโปสโตมรอบๆช่องปาก

2. แบบเมดูซา (medusa) มีลักษณะคล้ายร่มหรือระฆัง เพื่อให้ง่ายแก่การศึกษารูปร่างแบบเมดูซาจึงใช้วิธีเปรียบเทียบกับโพลิบ คือ ถ้าตัดโพลิบออกประมาณครึ่งตัว จากนั้นดึงเอาเนื้อเยื่อผนังตัวมาเชื่อมเข้าด้วยกัน ลำตัวจะมีลักษณะคล้ายรูปถ้วยดึงเอาปากให้ยาวออกไปงวง เมื่อจับคว่ำลง แวนปากจะอยู่ด้านล่างโดยที่มีหนวดอยู่ข้างขอบของแวนปาก มีท่อยาวห้อยลงมาเป็นวงคือมานูเบรียม (manubrium) และมีช่องปากอยู่ปลายงวง ดังนั้นเราจะได้ในดาเรียที่มีลักษณะเป็นถ้วยคว่ำลงหรือคล้ายร่มหรือระฆัง จากลักษณะดังกล่าวนี้ ด้านบนของเมดูซาจะโค้งงวงเป็นแบบร่ม เรียกว่าเอกซัมเบรลลา (exumbrella) ด้านล่างคือแวนปากที่อยู่ด้านบนของขอบถ้วยกับงวงจะเว้าขึ้นเป็นซับอัมเบรลลา (subumbrella) มีหนวดอยู่ขอบถ้วยและมีงวงอยู่กึ่งกลางซับอัมเบรลลา จากปากเป็นซึ่งมีลักษณะเป็นท่อตามลักษณะของงวงจะยาวไปถึงโคนงวง ในส่วนของตัวถ้วยซึ่งจะมีช่องกลวงขนาดใหญ่ แต่สำหรับเมดูซาผนังตัวของเอกซัมเบรลลากับซับอัมเบรลลาจะติดกันเหลือเพียงเล็กๆ

4 ท่อ แยกออกจากโคนวงช่องกลางตัวของเมดูซาจึงมีลักษณะเป็นระบบท่อซึ่งเป็นท่อหลัก 4 ท่อในแนวรัศมี (radial canals) และมีท่อวงแหวน (ring canals) ที่ขอบด้วยมีการเชื่อมต่อท่อรัศมี

2.3 วงจรชีวิต (Life Cycles)

วงจรชีวิตของในดาเรียน มี 2 รูปแบบที่แตกต่างคือ โพลิป และเมดูซา และยังมีความแตกต่างในระหว่างคลาสอีกด้วย แต่รูปแบบที่เหมือนคือเริ่มจากไซโกตในระยะพลาเนูลาจะเคลื่อนที่ไปเกาะพื้นที่แข็งและเกิดเมตามอโฟซิสเป็นรูปร่างแบบโพลิป โดยในระยะนี้อาจจะมีการสร้างโพลิปเพิ่มขึ้นด้วยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ พร้อมกับการสร้างเมดูซาด้วยการแตกหน่อ ซึ่งเรียกว่าการสตอปีไลเซชัน (strobilation) จากนั้นเมดูซาจะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยแต่ละเพศจะปล่อยอสุจิ และไข่ออกมาเพื่อปฏิสนธิเกิดเป็นไซโกตและพัฒนาไปเป็นระยะโพลิปต่อไป

2.4 การจำแนกชนิด

ในดาเรียนจำแนกได้เป็น 4 Class ดังนี้คือ

Class 1 Hydrozoa ส่วนใหญ่มีรูปร่าง 2 แบบสลับกันในแบบวัฏจักรชีวิต บางชนิดมีเฉพาะโพลิบบางชนิดมีแต่เมดูซา การดำรงชีวิตอาจเป็นลักษณะตัวเดียว (solitary hydroid) หรือเป็นแบบโคโลนี (colonial hydroid) มีไซเกลียไม่มีเซลล์เซลล์สืบพันธุ์สร้างจากอพิเคอร์มิส โพลิบกับเมดูซาในวัฏจักรชีวิตขนาดใกล้เคียงกัน เรามักเรียกสัตว์ที่อยู่ใน Class Hydrozoa ว่าไฮโดรอย (hydroid) ระยะเมดูซา เรียกว่า ไฮโดรเมดูซา (hydromedusa) ตัวอย่างเช่น Hydra, Obelia, Porpita, physalia เป็นต้น

Class 2 Cubozoa เป็นเมดูซาที่มีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างไฮโดรซัวกับไซโฟซัว ตัวตัวก่อนข้างยาว หรืออาจยาว 25 ซม. รูปร่างเป็นสี่เหลี่ยม ไม่มีสี ลอยตัวได้ดีมาดุมเบริมสันเปิดเข้ากระเพาะกลางตัว (central stomach) แล้วจึงแตกแขนงเป็นถุงกระเพาะ (gastric pouch) ขาวที่ขอบถ้วยที่มุมทั้งสี่ของรูปถ้วยจะมีหนวดเส้นเดียวหรือเป็นกลุ่มคิวโบซัวที่มีพิษร้ายแรงคือ ต่ทะเล (sea wasps) schiropsamus และ chironex) เฉพาะรายงานจากออสเตรเลียพบว่า มีคนตายมาแล้ว 50 คน จากแมงกะพรุน 2 ชนิดนี้

Class 3 Scyphozoa มีลักษณะเมดูซาเป็นลักษณะเด่น ส่วนระยะโพลิบจะเป็นระยะตัวอ่อนที่มีขนาดเล็กมาก มักเรียกกลุ่มไซโฟซัวนี้ว่า แมงกะพรุน (jellyfishes) แมงกะพรุนทั่วไปจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางของถ้วยประมาณ 2-40 ซม. แต่ตัวที่มีขนาดใหญ่มากคือ cyanea capillata มีเส้นผ่าศูนย์กลางถึง 2 เมตรเมดูซาของไซโฟซัวเรียกว่า ไซโฟเมดูซา (scyphomedusa) ปกติจะว่ายน้ำเป็นอิสระ ยกเว้นเพียง 1 Order ที่เกาะอยู่กับที่โดยมีก้านงอกออกจากเอกซ์อัมเบลลาใช้ในการยึดเกาะ

Class 4 Anthozoa มีรูปร่างแบบโพลีปโดยมีลักษณะคล้ายดอกไม้ (flowerlike appearance) ดำรงชีวิตในทะเลทั้งหมดทั้งในบริเวณน้ำตื้นและน้ำลึก และพบในแถบขั้วโลกลงมาจนเขตร้อน ขนาดแตกต่างกันมากดำรงชีวิตเป็นตัวเดี่ยวๆ หรือเป็นโคโลนีหรือเป็นโครงร่างค้ำจุน สัตว์ในคลาสนี้มีจำนวนมากที่สุดในฟอสซิล จากความแตกต่างในแง่ต่างๆ ในลักษณะการดำรงชีวิต และลักษณะโครงร่างที่แตกต่างกัน จึงแบ่งสัตว์ในคลาสนี้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ดอกไม้ทะเล (sea anemones) ปะการังอัลไซโอนาเรีย (alcyonarian corals) และปะการังโซแอนธาเรีย (zoantharian corals) ซึ่งก็คือปะการังโครงร่างแข็ง (stony corals) ที่พบทั่วไป ()

2.5 ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ในปี ค.ศ. 2003 ได้เกิดโครงการ The Barcode of life ขึ้นซึ่งมีจุดมุ่งหมายในการสร้างเครื่องมือที่เป็นสากลในการระบุสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต โดยใช้หลักการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ซึ่งเริ่มต้นโดยนักวิจัยของมหาวิทยาลัย Guelph ในประเทศแคนาดา และได้รับการสนับสนุนจากหน่วยงานนานาชาติที่มีชื่อว่า Consortium for the Barcode of Life (CBOL) ในปี ค.ศ. 2004 เพื่อจัดทำมาตรฐาน และคู่มือในการทำ DNA barcode นอกจากนี้ยังมีการรวบรวมและจัดทำฐานข้อมูลกลางของ DNA barcode ที่แสดงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์กับชนิดต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต เพื่อให้ DNA barcode ประสบผลสำเร็จมากยิ่งขึ้น (Kress, 2002) หลังจากนั้นได้มีสมาชิกเข้าร่วมมากกว่า 150 องค์กรจาก 45 ประเทศ ซึ่งประกอบด้วย พิพิธภัณฑ์สวนสัตว์ สวนพฤกษศาสตร์ หน่วยงานเก็บรักษาพันธุ์พืชมหาวิทยาลัย หน่วยงานรัฐบาล และบริษัทเอกชน (พรณรงค์และอรุณรัตน์, 2554)

การทำ DNA barcode มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการระบุสิ่งมีชีวิต และมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีนักอนุกรมวิธานในการสร้างระบบอ้างอิงที่ถูกต้องเพราะฐานข้อมูลจะต้องเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างที่มีการระบุชนิดอย่างถูกต้องโดยนักอนุกรมวิธานเท่านั้น DNA barcode จึงเป็นเครื่องมือวิเคราะห์อย่างง่ายที่มีพื้นฐานอยู่บนความรู้ของนักอนุกรมวิธานในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต ข้อมูล ณ เดือนมีนาคม ปี ค.ศ. 2008 มีลำดับนิวคลีโอไทด์หรือข้อมูล DNA barcode อยู่ในฐานข้อมูลของ The International Barcode of Life project (iBOL) ทั้งหมด 363,584 ลำดับ (จากสิ่งมีชีวิต 50,039 ชนิด) และมี 136,338 ลำดับ (จากสิ่งมีชีวิต 13,761 ชนิด) เป็นข้อมูลเข้าเกณฑ์ของการใช้เป็น DNA barcode ได้ (Frezal and Leblois, 2008) สำหรับบริเวณที่ใช้เป็น DNA barcode นั้นต้องมีคุณสมบัติ 3 ประการ ได้แก่

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีมนั้นมีความแตกต่างมากพอที่จะทำให้แยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้แต่ต้องมีความแตกต่างภายในชนิดเดียวกันต่ำมากหรือไม่มีเลย
2. เป็นดีเอ็นเอที่มีบริเวณอนุรักษ์ที่สามารถให้ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer เข้ามาจับเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณนั้นด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้
3. มีขนาดที่เหมาะสมประมาณ 500 - 800 คู่เบส (base pair; bp)

ซึ่งการเลือกบริเวณที่จะนำมาใช้เป็น DNA barcode มีความสำคัญมาก หากเลือกบริเวณที่นำมาใช้เป็น DNA barcode ได้เหมาะสมกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาจะทำให้เทคนิค DNA barcode เป็นเทคนิคที่สามารถนำไปใช้ได้ง่ายสะดวก และรวดเร็ว

การศึกษา DNA barcode ในสัตว์นั้น เริ่มโดย Hebert et al. (2003) ได้ใช้บริเวณดีเอ็นเอของจีน Cytochrome c oxidase I (COI) ที่มีขนาดประมาณ 650 bp ในตำแหน่งเบสที่ 58 – 705 ทางด้าน 5' ของจีน COI อ้างอิงตามจีโนมในไมโทคอนเดรียของหนู (Frezal and Leblois, 2008) ซึ่งค่อนข้างประสบความสำเร็จอย่างมากในกลุ่มสัตว์เนื่องจากจีน COI มีข้อดีกว่าจีนในไมโทคอนเดรียบริเวณอื่นๆ คือ มีขนาดสั้นประมาณ 650 bp สามารถเพิ่มปริมาณด้วย universal primer ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ครอบคลุมขอบเขตของความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในกลุ่มสัตว์ได้อย่างดี นอกจากนี้ลำดับดีเอ็นเอของจีน COI ยังให้ความแตกต่างในสัตว์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย (Folmer et al., 1994; Zhang and Hewitt, 1997; Frezal and Leblois, 2008) ซึ่งจะเห็นได้จากงานวิจัยของ Ekrem และคณะในปี พ.ศ. 2007 ที่ศึกษาแมลงในวงศ์ Chironomidae จำนวน 97 ตัวอย่างจาก 47 ชนิด พบว่า universal primer สามารถใช้เพิ่มปริมาณจีน COI ได้ในทุกตัวอย่างและมีค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดเท่ากับ 0.87% ในขณะที่ค่าความแตกต่างระหว่างชนิดเท่ากับ 14.7% (มัทนา จงกา และคณะ, 2552) นอกจากนี้ในสัตว์พวก Lepidoptera (Hajibabaei et al., 2006a) พบว่า 97.9% จาก 521 ชนิดนั้น DNA barcode มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ที่เหลือ 2.1% เกิดจากการที่สิ่งมีชีวิตบางชนิดมีลำดับดีเอ็นเอที่คล้ายกันเกิดการซ้อนทับกัน ทำให้สิ่งมีชีวิตที่มีลำดับดีเอ็นเอซ้อนทับกันนั้นมีความเหมือนกันอย่างมาก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในนกของทวีปอเมริกาเหนือ ผลจากการศึกษาทำให้ทราบว่านกทุกชนิดมีลำดับดีเอ็นเอของจีน COI ที่ต่างกันโดยความแตกต่างเฉลี่ยระหว่างชนิดมีค่าเท่ากับ 7.93% ส่วนความแตกต่างเฉลี่ยภายในชนิดนั้นเท่ากับ 0.43% และจากการวิจัยนี้พบนกชนิดใหม่ 4 ชนิด เนื่องจากมีนก 4 ตัวอย่างที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างออกไป จึงได้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐาน พฤติกรรม และเสียงร้องใหม่ และได้จัดนกที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างนั้นเป็นนกชนิดใหม่ 4 ชนิด (Hebert et al., 2004) นอกจากทำให้มีการระบุ

ชนิดใหม่ในนกแล้วยังได้มีการทบทวนการระบุชนิดในผีเสื้อ neotropical skipper (*Astraptes fulgerator*) บริเวณ Guanacaste ของประเทศคอสตาริกา โดย Hebert et al.(2004) ได้ทำการศึกษาผีเสื้อ 466 ตัวอย่างโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จีน COI และลักษณะทางสัณฐาน เช่น มีสมมาตรของตัวอ่อนระยะดักแด้ที่แตกต่างกัน พบว่าลำดับดีเอ็นเอของ *A. fulgerator* มีความแตกต่างภายใน

ในชนิดที่บ่งบอกได้ว่าอาจเป็นชนิดใหม่อย่างน้อย 10 ชนิด และจากงานวิจัยนี้ยังทำให้ทราบว่า สิ่งมีชีวิตบริเวณเขตร้อน(tropical region) มีการระบุชนิดที่คลุมเครือ ต้องมีการหาหลักฐานเพิ่มเติมทั้งจากวิธีการทางอนุกรมวิธาน และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อให้สามารถระบุชนิดและจัดหมวดหมู่ได้อย่างถูกต้อง ต่อมา Brower (2005) ได้ทำการศึกษาใน *A. fulgerator* พบว่ามีอย่างน้อย 3 กลุ่ม (section) แต่ไม่เกิน 7 กลุ่ม ที่ยังมีการระบุชนิดด้วยลักษณะสัณฐานที่คลุมเครือซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hebert et al., (2004) ทำให้ต้องมีการศึกษาวิจัยและวิจารณ์ร่วมกันใหม่

Fritz และคณะ (2009) ได้ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดประชากรของแมงกะพรุนน้ำจืด *Craspedacusta sowerbii* ที่แพร่กระจายในประเทศเยอรมันและออสเตรียโดยใช้ internal transcribed spacers (ITS) และ cytochrome oxidase subunit I (COI) เก็บตัวอย่างแมงกะพรุนน้ำจืดในเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการสกัดดีเอ็นเอ ทำการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยการแช่เอทานอล 75, 50, 30 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 10 นาทีตามลำดับ และแช่น้ำกลั่น 2 ครั้งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป จากการศึกษาพบว่า จากเปรียบเทียบดีเอ็นเอของแมงกะพรุนน้ำจืดที่พบในประเทศจีน เยอรมันและออสเตรีย มีความคล้ายคลึงกัน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างที่ทำการศึกษา

ตัวอย่างปลาที่ใช้ศึกษา คือ แมงกะพรุนน้ำจืด ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างเก็บจากแหล่งอาศัยตามธรรมชาติในเขตพื้นที่อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ตัวอย่างที่เก็บมาได้นำมารักษาสภาพที่ 80% ethanol

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การสกัดดีเอ็นเอใช้เนื้อเยื่อแมงกะพรุนน้ำจืด โดยใช้ชุดสกัด DNA GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) โดยใช้วิธีการสกัดตามวิธีแนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตและเก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial cytochrome oxidase I : COI) ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') และ (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3') (Ward et al. 2005) โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยการตั้งค่าเครื่องประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้ 1.การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (Initial denaturation) ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที 2.การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) ใช้อุณหภูมิ 94, 50 และ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45, 45 วินาทีและ 45 นาที ตามลำดับ 3.การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Final Extension) ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 นาที ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโปรแกรมจะทำการเพิ่มปริมาณซ้ำๆ กันเช่นนี้ไปเรื่อยๆ ประมาณ 30 รอบ/การทำพีซีอาร์ 1 ครั้ง โดยองค์ประกอบของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 5 ไมโครลิตร 10X PCR buffer, 3 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 mM), 1.6 ไมโครลิตร dNTPs (10 μ M), 2 ไมโครลิตร each primer (10 μ M), 0.4 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (5 U/ μ l), 2 ไมโครลิตร DNA template และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการนิ่งมาเชื้อแล้วปริมาตร 34 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบผลผลิตของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel โดยการนำผลผลิตดีเอ็นเอผสมให้เข้ากันกับ Novel Juice ในสัดส่วน 5:1 ไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นโหลดลงในบล็อกลเจลที่เตรียมไว้อย่างระมัดระวัง การโหลดต้องให้ดีเอ็นเอที่ผสมกับ Novel Juice จมลงได้ 0.5X TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้าแรงดัน 100 โวลต์ เป็นตัวขับเคลื่อนให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่จากขั้วลบ

ไปยังข้าวบวก โดยใช้เวลา 40-50 นาที จากนั้นตรวจสอบผลภายใต้แสง blue light พร้อมถ่ายภาพ จากนั้นทำผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด HiYield Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC BIOSCIENCE, Xindian City, Taiwan) และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรมเมอร์ตัวเดียวกันกับที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้บริการของบริษัท Macrogen ที่ประเทศเกาหลีใต้และบริษัท 1st BASE DNA Sequencing ที่ประเทศมาเลเซีย จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) และ Barcode Of Life Database (BOLD) (<http://www.boldsystems.org>) และศึกษารูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาแต่ละชนิดด้วยโปรแกรม BioEdit v. 7.2.6 (Hall, 1999)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม MEGA6 (Tamura et al. 2013) และทำการจัดกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase I เพื่อตรวจสอบการระบุสปีชีส์โดยใช้โปรแกรม Taxon DNA ด้วยวิธีการ Best Match (BM) และ Best Close Match (BCM) (Meier et al. 2006) ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้จะจัดกลุ่มสปีชีส์โดยใช้ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ (BM) และค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่ำกว่าระดับ Threshold ที่กำหนดไว้เป็นสปีชีส์เดียวกัน ($\leq 95\%$) (BCM) ทั้งนี้ค่า Threshold จะกำหนดโดยการคำนวณจากค่าความแปรผันโดยรวมของตัวอย่างทั้งหมด

3.2 การสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ทำการคัดเลือกโมเดลโดยใช้โปรแกรม jModeltest 0.1 (Posada, 2008) เพื่อหาโมเดลที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการอธิบายการแทนที่เบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ จากนั้นสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) โดยใช้ Kimura 2 parameter model (K2P) ด้วยโปรแกรม MEGA6 (Tamura et al. 2013) และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม Phylog 3.1 (Guindon, 2003) เปิด output file tree ที่ได้ด้วยโปรแกรม FigTree เวอร์ชัน 1.4.2 (Andrew, 2007) การสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยทั้งสองวิธีวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยใช้ 1,000 pseudo-replicates ตัวอย่าง ถูกใช้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroups)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenolchloroform extraction แล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพ ด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี มีแถบขนาดใหญ่ที่ชัดเจนปนเปื้อนด้วยโปรตีนและอาร์เอ็นเอเล็กน้อย สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน COI ต่อไป ได้ด้วยปฏิกิริยา PCR ได้ผลผลิตที่มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิว คลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืด โปรแกรม ClustalW พบว่า แมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 10 ตัวอย่าง นี้มีความยาวของยีนไม่เท่ากัน โดยมีความยาวอยู่ใน ช่วง 621-636 คู่เบส ซึ่งมีความยาวสั้นกว่า ที่มีรายงานในการศึกษาอื่นๆ ที่ผ่านมา เนื่องจากการ ศึกษาเป็นการตรวจหาลำดับ นิวคลีโอไทด์เพียงทิศทางเดียวเท่านั้น คือ ทิศทางด้านแมงกะพรุนน้ำจืด 5' ของ ผลผลิต โดยใช้ไพรเมอร์ FishF1 และ FishF2 ในขณะที่ การศึกษาของ Ward et al. (2005) เป็นการตรวจหา ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้านของผลผลิต คือ ทิศทาง ทั้งด้านแมงกะพรุนน้ำจืด 5' และ 3' โดยใช้ไพรเมอร์ FishF1, FishF2, FishR1 และ FishR2 ทำให้ได้ยีนที่มีความยาว มากกว่า คือ 655 คู่เบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษารั้งนี้ได้เก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ Accession number KF753753-KF753772 (Table 2) จากการศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอ ไทด์ของยีน COI ภายในชนิดเดียวกันของแมงกะพรุนน้ำจืดวงศ์เสือ ต่อด้วยโปรแกรม MEGA พบว่า แมงกะพรุนน้ำจืดทุกชนิดไม่มีความ แตกต่างภายในชนิด ยกเว้นแมงกะพรุนที่มีค่าความ แตกต่างเท่ากับ 0.002 (Table 2) เมื่อตรวจสอบลำดับ นิวคลีโอไทด์ดังกล่าวด้วยโปรแกรม Genetyx (Genetyx Corp., Japan) พบว่า มีการแทนที่เบส (base substitution) จำนวน 2 ตำแหน่ง (เบส A เป็น C และ เบส T เป็น A) และเบสดังกล่าวไม่มีผลต่อการ เปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนในขบวนการแปลรหัส (Translation) ยังคงได้กรดอะมิโนชนิดเดียวกัน

เมื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน COI ระหว่างชนิดของแมงกะพรุนน้ำจืด ด้วยโปรแกรม MEGA พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ แมงกะพรุนน้ำจืดต่างจากแมงกะพรุนน้ำจืด โดยมี ค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.135, 0.150 และ 0.150 ในแมงกะพรุนน้ำจืดเสือ ตามลำดับ ในขณะที่ แมงกะพรุนน้ำจืดมีความแตก ต่างกันน้อยที่สุด โดยมีค่า 0.002

การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืด จำนวน 4 ชนิด กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD โดยพิจารณาจากค่า % similarity พบว่า ในฐานข้อมูล ทั้งสองยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด แสดงว่าในปัจจุบันนี้ยังไม่มีการศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดนี้ ทำให้สามารถเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน COI ในฐานข้อมูลทั้งสองนี้ได้ นอกจากนี้ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอ ไทด์ของยีน COI ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า แมงกะพรุนน้ำจืด มีความเหมือนกับแมงกะพรุนน้ำจืด *Monotaxis grandoculis* มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นแมงกะพรุนน้ำจืดที่อยู่ในอันดับเดียวกันคือ Perciformes สำหรับการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอ ไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืด จำนวน 4 ชนิด กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD โดยพิจารณาจากค่า % similarity พบว่า ในฐานข้อมูล ทั้งสองยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด แสดงว่าในปัจจุบันนี้ยังไม่มี การ ศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดนี้ ทำให้สามารถเพิ่ม ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน COI ในฐานข้อมูลทั้งสองนี้ได้ นอกจากนี้ผลจากการเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอ ไทด์ของยีน COI ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า แมงกะพรุนน้ำจืด มีความเหมือนกับ แมงกะพรุนน้ำจืด *Monotaxis grandoculis* มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นแมงกะพรุนน้ำจืดที่อยู่ในอันดับเดียวกันคือ Perciformes สำหรับลำดับนิวคลีโอ ไทด์ ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืด มากที่สุด มีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนอกจาก จะเป็นแมงกะพรุนน้ำจืดที่อยู่ในอันดับ Perciformes เดียวกันแล้ว แมงกะพรุนน้ำจืดกะพงลายและ แมงกะพรุนน้ำจืด เคยถูกจัดให้อยู่ในวงศ์เดียวกันอีกด้วย คือ Lobotidae โดยแมงกะพรุนน้ำจืดเคยมี ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Lobotes hexazona (Bleeker, 1850) แต่ปัจจุบันได้ ถูกแยกออกมาอยู่ในวงศ์ Datnioididae (Fishbase; <http://www.fishbase.org/>) ซึ่งผลจากการศึกษานี้ เป็นการยืนยันว่า แมงกะพรุนน้ำจืดไม่ควรจัดอยู่ในวงศ์ Lobotidae เพราะมีค่าความคล้ายคลึงน้อยมาก (85 เปอร์เซ็นต์) ซึ่ง Wong and Hanner (2008) กล่าวว่า สิ่งมีชีวิตหนึ่งจะเป็นสิ่งมีชีวิตตามที่รายงานในฐาน ข้อมูลได้ ต้องมีค่าความคล้ายคลึงมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ ลำดับนิวคลีโอ ไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืดในสกุล Datnioides จำนวน 4 ชนิด โดยการ สร้าง Phylogenetic tree และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของ แมงกะพรุนน้ำจืดในสกุล Lobotes จำนวน 2 ชนิด เป็นสิ่งมีชีวิตนอก กลุ่ม พบว่า ลำดับนิวคลีโอ ไทด์ของยีน COI สามารถ แยก แมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดในสกุล Datnioides ออกจากแมงกะพรุนน้ำจืด ในสกุล Lobotes ได้อย่าง ชัดเจน ซึ่งเป็นการ ยืนยันว่าแมงกะพรุนน้ำจืดทั้งสองสกุลนี้อยู่ต่างกลุ่มกัน นอกจากนี้ ยังพบว่า

แมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดยังสามารถแบ่งออก เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของแมงกะพรุนน้ำจืด เนื่องจากแมงกะพรุนน้ำจืดมี ลักษณะภายนอกแตกต่างจากแมงกะพรุนน้ำจืดชนิดอื่นๆ นิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืด จำนวน 4 ชนิด กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD โดยพิจารณาจากค่า % similarity พบว่า ในฐานข้อมูล ทั้งสองยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด แสดงว่าในปัจจุบันนี้ยังไม่มี การศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดนี้ทำให้สามารถเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในฐานข้อมูลทั้งสองนี้ได้ นอกจากนี้ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า แมงกะพรุนน้ำจืด เสือตอลายใหญ่ แมงกะพรุนน้ำจืดเสือดอลายเล็ก และแมงกะพรุนน้ำจืดเสือดอ ลายคู่ มีความเหมือนกับแมงกะพรุนน้ำจืด *Monotaxis grandoculis* มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นแมงกะพรุนน้ำจืดที่อยู่ในอันดับเดียวกันคือ Perciformes สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืดแมงกะพรุนน้ำจืดมากที่สุด มีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนอกจากจะเป็นแมงกะพรุนน้ำจืดที่อยู่ในอันดับ Perciformes เดียวกันแล้ว แมงกะพรุนน้ำจืดยังเคยถูกจัดให้อยู่ในวงศ์เดียวกันอีกด้วย คือ Lobotidae โดยแมงกะพรุนน้ำจืดเคยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lobotes hexazona* (Bleeker, 1850) แต่ปัจจุบันได้ ถูกแยกออกมาอยู่ในวงศ์ Datnioididae (Fishbase; <http://www.fishbase.org/>) ซึ่งผลจากการศึกษานี้ เป็นการยืนยันว่าแมงกะพรุนน้ำจืดไม่ควรจัดอยู่ในวงศ์ Lobotidae เพราะมีค่าความคล้ายคลึงน้อยมาก (85 เปอร์เซ็นต์) ซึ่ง Wong and Hanner (2008) กล่าวว่า สิ่งมีชีวิตหนึ่งจะเป็นสิ่งมีชีวิตตามที่รายงานในฐาน ข้อมูลได้ต้องมีค่าความคล้ายคลึงมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืดในสกุล *Datnioides* จำนวน 4 ชนิด โดยการสร้าง Phylogenetic tree และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของ แมงกะพรุนน้ำจืดในสกุล *Lobotes* จำนวน 2 ชนิด เป็นสิ่งมีชีวิตนอก กลุ่ม พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI สามารถ แยกแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดในสกุล *Datnioides* ออกจากแมงกะพรุนน้ำจืด ในสกุล *Lobotes* ได้อย่างชัดเจน (Figure 2) ซึ่งเป็นการ ยืนยันว่าแมงกะพรุนน้ำจืดทั้งสองสกุลนี้อยู่ต่างกลุ่มกัน นอกจากนี้ ยังพบว่า แมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 เนื่องจากแมงกะพรุนน้ำจืดมี ลักษณะภายนอกแตกต่างจากแมงกะพรุนน้ำจืดชนิดอื่นๆ นิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืด มีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนอกจากจะเป็นแมงกะพรุนน้ำจืดที่อยู่ในอันดับ Perciformes เดียวกันแล้ว แมงกะพรุนน้ำจืดกะพงลายและแมงกะพรุนน้ำจืด เคยถูกจัดให้อยู่ในวงศ์เดียวกันอีกด้วย คือ Lobotidae โดยแมงกะพรุนน้ำจืด

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพ ด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี มีแถบขนาดใหญ่ที่ชัดเจน ปนเปื้อนด้วยโปรตีนและอาร์เอ็นเอ เล็กน้อย สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน COI ต่อไป ได้ด้วยปฏิกิริยา PCR ได้ผลผลิตที่มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิว คลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืด โปรแกรม ClustalW พบว่า แมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 10 ตัวอย่าง นี้มีความยาวของยีนไม่เท่ากัน โดยมีความยาวอยู่ใน ช่วง 621-636 คู่เบส ซึ่งมีความยาวสั้นกว่า ที่มีรายงานในการศึกษาอื่นๆ ที่ผ่านมา

5.2 อภิปรายผล

เมื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน COI ระหว่างชนิดของแมงกะพรุนน้ำจืด ด้วยโปรแกรม MEGA พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ แมงกะพรุนน้ำจืดต่างจากแมงกะพรุนน้ำจืด โดยมี ค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.135, 0.150 และ 0.150 ในแมงกะพรุนน้ำจืดเสีย ตามลำดับ ในขณะที่ แมงกะพรุนน้ำจืดมีความแตกต่างกันน้อยที่สุด โดยมีค่า 0.002

การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืด จำนวน 4 ชนิด กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD โดยพิจารณาจากค่า % similarity พบว่า ในฐานข้อมูล ทั้งสองยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด แสดงว่าในปัจจุบันนี้ยังไม่มี การศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดนี้ ทำให้สามารถเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน COI ในฐานข้อมูลทั้งสองนี้ได้ นอกจากนี้ผลจากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืด จำนวน 4 ชนิด กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD โดยพิจารณาจากค่า % similarity พบว่า ในฐานข้อมูล ทั้งสองยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด แสดงว่าในปัจจุบันนี้ยังไม่มี การศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดนี้ ทำให้สามารถเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน COI ในฐานข้อมูลทั้งสองนี้ได้ นอกจากนี้ผลจากการ

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า แมงกะพรุนน้ำจืด มีความเหมือนกับแมงกะพรุนน้ำจืด *Monotaxis grandoculis* มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นแมงกะพรุนน้ำจืดที่อยู่ในอันดับเดียวกันคือ Perciformes สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืด มากที่สุด มีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนอกจากจะเป็นแมงกะพรุนน้ำจืดที่อยู่ในอันดับ Perciformes เดียวกันแล้ว แมงกะพรุนน้ำจืด กะพงลายและแมงกะพรุนน้ำจืด เคยถูกจัดให้อยู่ในวงศ์เดียวกันอีกด้วย คือ Lobotidae โดยแมงกะพรุนน้ำจืดกะพงลายเคยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lobotes hexazona* (Bleeker, 1850) แต่ปัจจุบันได้ ถูกแยกออกมาอยู่ในวงศ์ Datnioididae (Fishbase; <http://www.fishbase.org/>) ซึ่งผลจากการศึกษานี้ เป็นการยืนยันว่าแมงกะพรุนน้ำจืดไม่ควรจัดอยู่ในวงศ์ Lobotidae เพราะมีค่าความคล้ายคลึงน้อยมาก (85 เปอร์เซ็นต์) ซึ่ง Wong and Hanmer (2008) กล่าวว่า สิ่งมีชีวิตหนึ่งจะเป็นสิ่งมีชีวิตตามที่รายงานในฐาน ข้อมูลได้ต้องมีค่าความคล้ายคลึงมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืดในสกุล Datnioides จำนวน 4 ชนิด โดยการสร้าง Phylogenetic tree และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของ แมงกะพรุนน้ำจืดในสกุล Lobotes จำนวน 2 ชนิด เป็นสิ่งมีชีวิตนอก กลุ่ม พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI สามารถ แยกแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดในสกุล Datnioides ออกจากแมงกะพรุนน้ำจืด ในสกุล Lobotes ได้อย่างชัดเจน ซึ่งเป็นการ ยืนยันว่าแมงกะพรุนน้ำจืดทั้งสองสกุลนี้อยู่ต่างกลุ่มกัน นอกจากนี้ ยังพบว่า แมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของแมงกะพรุนน้ำจืด เนื่องจากแมงกะพรุนน้ำจืดมี ลักษณะภายนอกแตกต่างจากแมงกะพรุนน้ำจืดชนิดอื่นๆ นิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืด จำนวน 4 ชนิด กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD โดยพิจารณาจากค่า % similarity พบว่า ในฐานข้อมูล ทั้งสองยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด แสดงว่าในปัจจุบันนี้ยังไม่มี การ ศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดนี้ทำให้สามารถเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน COI ในฐานข้อมูลทั้งสองนี้ได้ นอกจากนี้ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอ ไทด์ของยีน COI ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าแมงกะพรุนน้ำจืด เสือตอลายใหญ่ แมงกะพรุนน้ำจืดเสือดอลายเล็ก และแมงกะพรุนน้ำจืดเสือดอลายคู่ มีความเหมือนกับแมงกะพรุนน้ำจืด *Monotaxis grandoculis* มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นแมงกะพรุนน้ำจืดที่อยู่ในอันดับเดียวกันคือ Perciformes สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืดกะพงลายจะเหมือนแมงกะพรุนน้ำจืดมากที่สุด มีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนอกจากจะเป็นแมงกะพรุนน้ำจืดที่อยู่ในอันดับ Perciformes เดียวกันแล้ว แมงกะพรุนน้ำจืดยังเคยถูกจัดให้อยู่ในวงศ์เดียวกันอีกด้วย คือ Lobotidae

โดยแมงกะพรุนน้ำจืดเคยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lobotes hexazona* (Bleeker, 1850) แต่ปัจจุบันได้ ถูกแยกออกมาอยู่ในวงศ์ Datnioididae (Fishbase; <http://www.fishbase.org/>) ซึ่งผลจากการศึกษานี้ เป็นการยืนยันว่าแมงกะพรุนน้ำจืดไม่ควรจัดอยู่ในวงศ์ Lobotidae เพราะมีค่าความคล้ายคลึงน้อยมาก (85 เปอร์เซ็นต์) ซึ่ง Wong and Hanner (2008) กล่าวว่า สิ่งมีชีวิตหนึ่งจะเป็นสิ่งมีชีวิตตามที่รายงานในฐาน ข้อมูลได้ต้องมีค่าความคล้ายคลึงมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืดในสกุล Datnioides จำนวน 4 ชนิด โดยการสร้าง Phylogenetic tree และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืดในสกุล Lobotes จำนวน 2 ชนิด เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI สามารถ แยกแมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดในสกุล Datnioides ออกจากแมงกะพรุนน้ำจืด ในสกุล Lobotes ได้อย่างชัดเจน (Figure 2) ซึ่งเป็นการ ยืนยันว่าแมงกะพรุนน้ำจืดทั้งสองสกุลนี้อยู่ต่างกลุ่มกัน นอกจากนี้ ยังพบว่า แมงกะพรุนน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดยังสามารถแบ่งออก เป็น 2 เนื่องจากแมงกะพรุนน้ำจืดมี ลักษณะภายนอกแตกต่างจากแมงกะพรุนน้ำจืดชนิดอื่นๆ นิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของแมงกะพรุนน้ำจืดกะพงลายจะเหมือนแมงกะพรุนน้ำจืด มากที่สุด มีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนอกจากจะเป็นแมงกะพรุนน้ำจืดที่อยู่ในอันดับ Perciformes เดียวกันแล้ว แมงกะพรุนน้ำจืดกะพงลายและแมงกะพรุนน้ำจืด เคยถูกจัดให้อยู่ในวงศ์เดียวกันอีกด้วย คือ Lobotidae โดยแมงกะพรุนน้ำจืด ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง ในการจัดจำแนกชนิดแมงกะพรุนน้ำจืด และแยก ความแตกต่างของแมงกะพรุนน้ำจืดแต่ละชนิดออกจากกัน ได้อย่าง ชัดเจน รวมทั้งสามารถใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ เชิงวิวัฒนาการได้อีกด้วย ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะถูกรวบรวม ไว้เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมงกะพรุนน้ำจืดต่อไป

5.3 ข้อเสนอแนะ

- 1) เก็บตัวอย่างแมงกะพรุนน้ำจืดจากพื้นที่อื่นเพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแต่ละพื้นที่
- 2) ทดลองขยายพันธุ์แมงกะพรุนน้ำจืดเพื่อการอนุรักษ์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- บพิช จารุพันธุ์และนันทพร จารุพันธุ์. (2540). สัตววิทยา. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ และอรุณรัตน์ จวีราษ. (2554). ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต
กรณีศึกษา : จีน Cytochrome c Oxidase I (COI) ในสัตว์. วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏ
มหาสารคาม; ว.มร. ปีที่ 5 ฉบับที่ 2: พฤษภาคม - สิงหาคม 2554. 205 – 210.
- มัทนา จงกา, ดวงกมล แม้นศิริ และ สุรพล แสนสุข. (2552). "ดีเอ็นเอบริเวณยีน matK สำหรับใช้
เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อระบุชนิดพืชสกุล *Alpinia* Roxb การประชุมทางวิชาการเสนอ
ผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 12 (สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ). ขอนแก่น.
- Duggan, I.C., Eastwood, K.R. (2012). Detection and distribution of *Craspedacusta*
sowerbii: Observations of medusa are not enough. Aquatic Invasions (2012)
Volume 7, Issue 2: 271– 275.
- Frezal, L. and Leblois, R. (2008). Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects.
Infection, Genetics and Evolution 8 : 727-736.
- Fritz, G. B., Pfankuchen, M., Reuner, A., Schill, R. O. and Brummer, F. (2009). *Craspedacusta*
sowerbii, Lankester 1880 – population dispersal analysis using COI and ITS sequences.
J. Limnol., 68(1): 46-52.
- Galarce, L.C., Riquelme, K.V., Osman, D.Y., and Fuentes, R.A. (2013). A new record of the
non indigenous freshwater jellyfish *Craspedacusta sowerbii* Lankester, 1880
(Cnidaria) in Northern Patagonia (40° S, Chile). BioInvasions Records (2013)
Volume 2, Issue 4: 263–270.
- Herbert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H. and Hallwachs, W. (2004) : Ten species
in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the semitropical skipper butterfly
Astraptes fulgerator. Proceedings of the National Academy of Science 101(41): 14812-
14817.
- Jankowski, T. (2001). The freshwater medusae of the world – a taxonomic and
systematic literature study with some remarks on other inland water jellyfish.
Hydrobiologia 462: 91–113.

- Kress, W.J., Prince, L.M. and Williams, K.J. (2002). The phylogeny and a new classification of the (Zingiberaceae): evidence from Gingers molecular data. *American Journal of Botany* 89(11): 1682-1696.
- Raposeiro, P.M., J.C. Ramos & A.C. Costa 2011. First record of *Craspedacusta sowerbii* Lankester, 1880 (Cnidaria: Limnomedusae) in the Azores. *Arquipelago. Life and Marine Sciences* 28: 11-13.
- Zou H., Zhang J., Li W., Wu S., Wang G. (2012). Mitochondrial Genome of the Freshwater Jellyfish *Craspedacusta sowerbyi* and Phylogenetics of Medusozoa. *PLoS ONE* 7(12): e51465. doi:10.1371/journal.pone.0051465.

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล ดร.กาญจน์ คุ่มทรัพย์

Dr. Kan Khoomsab

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3670200583980

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. ตำแหน่งทางวิชาการ -

5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

หลักสูตรสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์ 67000

โทรศัพท์ 056 – 717122 ต่อ 2710 Email: topkan13@hotmail.com

6. ประวัติการศึกษา

วท.บ. ชีววิทยา สถาบันราชภัฏจันทรเกษม

กษ.บ. เกษตรศาสตร์ (สัตวศาสตร์) มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช

วท.ม. สัตววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปร.ด. เทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีววิทยาสังแวดล้อม

เทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม

สถิติเพื่อการวิจัยและการวางแผนการทดลอง