



การพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ไพรมอร์สำหรับ

การเพาะเลี้ยงปลากุ้ง(*Channa limbata*)

เพื่อการอนุรักษ์และเชิงเศรษฐกิจ

(Development of Microsatellite Primers for Trading *Channa limbata*
Economical Conservation.)

สุวิทย์ วรรณศรี

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก งบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ โดยผ่านการเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการ

สภာวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2557

บทคัดย่อ

ศุวิทย์ วรรณศรี 2557 : การพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ไพรมอร์สำหรับการเพาะเลี้ยง

ปลากั้ง(*Channa limbata*) เพื่อการอนุรักษ์และเชิงเศรษฐกิจ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ ของปลากั้งในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่ การเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาคัดแปลงมาจากวิธีของ Ida and Kyo,(1980) วิธีของ Denton, (1973) วิธีของ UwaandOjima,(1981) การจำแนกโครโมโซมถือเอาตามวิธีของ Levan et al.,(1964) ผลการศึกษาพบว่า - ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่1 จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=44$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก (metacentric หรือ m) 1 คู่ แบบสับเมตาเซนตริก (submeracentric หรือ sm) 1 คู่ แบบอะโครเซนตริก (acrocentric หรือ t) 20 คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (arm number หรือ FN) เท่ากับ 48

-ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่2 มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=44$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซม แบบเมตาเซนตริก 2 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก (subtelocentric หรือ st) 2 คู่ แบบอะโครเซนตริก 18 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 48

-ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่3 มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=44$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ แบบอะโครเซนตริก 21 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 46

-ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่3 จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=48$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 1 คู่ แบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 1 คู่ แบบอะโครเซนตริก 19 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 48 ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่4 มีจำนวนโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 2 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 1 คู่ แบบอะโครเซนตริก 53 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 116

จากการสร้างห้องสมุดจีโนมของปลากั้งและคัดเลือกลำดับไพรเมอร์ (AG)₁₀ , (TG)₁₀ , (TAC)₁₀ , (TAT)₁₀ , (CAA)₁₀ , (CAG)₁₀ , (GAT)₁₀ และ (CCA)₁₀ ได้พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอปลากั้งจำนวน 384 โคลนในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 72 โคลน พบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ จำนวน 28 โคลน ซึ่งสามารถออกแบบไพรมอร์ได้จำนวน 10 คู่ ซึ่งไพรมอร์จำนวน 5 คู่ (DTLOm2, DTLOm4, DTLOm6, DTLOm12 และ DTLOm13) มีความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ เมื่อตรวจสอบจำนวนและขนาดอัลลิลในปลากั้ง68 ตัวอย่าง ด้วยไพรมอร์จำนวน 5 คู่ แสดงความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ พบจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งมีค่าอยู่ระหว่าง 2-14 อัลลิล ($H_o = 0.0475-1.0001$) ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตีส่วนใหญ่มีค่าสูงกว่าค่าคาดหวัง ความถี่จีโนไทป์ประชากรมีค่าเบี่ยงเบนจากสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ไพรมอร์ที่พัฒนาได้และเหมาะสมในการนำไปใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร

คำสำคัญ ปลาแก้ม ไม้โครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

Abstract

Suwit wunnasri 2014 : Development of Microsatellite Primers for Trading *Channa limbata* economical conservation.

Main purpose of this experiment was to study the Microsatellite DNA of *Channa limbata* from Ta Bo - Huai Yai Wildlife Sanctuary (4 sampling plots):

1) The diploid chromosome number of *Channa limbata* (sampling plot 1): is 44. The karyotype comprises 2 pair of metacentric, 2 pair of s subtelocentric and 18 pairs of acrocentric chromosomes. The arm number is 48

2) The diploid chromosome number of *Channa limbata* (sampling plot 2): is 44. The karyotype comprises 2 pair of submetacentric and 21 pairs of acrocentric chromosomes. The arm number is 46

3) The diploid chromosome number of *Channa limbata* (sampling plot 3): is 48. The karyotype comprises 1 pair of metacentric, 1 pair of submetacentric, 1 pair of subtelocentric and 19 pairs of acrocentric chromosomes. The arm number is 48

4) The diploid chromosome number of *Channa limbata* (sampling plot 4): is 112. The karyotype comprises 2 pair of metacentric, 1 pair of s subtelocentric and 53 pairs of acrocentric chromosomes. The arm number is 116

Microsatellite primers were developed in a *Channa limbata* from enriched genomic library using 8 biotinylated probe: (AG)₁₀, (TG)₁₀, (TAC)₁₀, (TAT)₁₀, (CAA)₁₀, (CAG)₁₀, (GAT)₁₀ and (CCA)₁₀ probe. Of 384 recombinant plasmids, 72 clones were sequenced and 28 which contained microsatellites. Primer for DNA amplification using PCR were designed and synthesized for 10 loci. Five loci were polymorphic. Genetic variation of Sand Goby were assessed by using five microsatellite loci (DTLOm 2, DTLOm4, DTLOm 6, DTLOm12 and DTLOm13) Level of polymorphism were observed across 68 fish samples with an average of 2-14 alleles per locus and heterozygosity at all loci 0.0475 to 1.0001. Genotype frequency of population deviated from Hardy-Wienberg equilibrium. These will be of use both in population genetic studies.

Key word: *Channa limbata*, Microsatellite DNA.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ที่เป็นหน่วยงานสนับสนุนทุนการวิจัยครั้งนี้และขอขอบคุณข้าราชการและเจ้าหน้าที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ณรงค์ สวัสดิ์กว้าน นักวิชาการป่าไม้ชำนาญการ ปฏิบัติงานทำหน้าที่หัวหน้าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะ-ห้วยใหญ่ ขอขอบคุณผู้ช่วยหัวหน้าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะ-ห้วยใหญ่ที่ให้ข้อมูลพื้นฐานและอำนวยความสะดวกในการเดินทางสำรวจ ขอขอบคุณ ดร. กณิดา อุ่นถาวร หัวหน้าหน่วยปฏิบัติการนิเวศวิทยาาสตร์ของสัตว์ป่า รวมทั้งคณะผู้วิจัยทุกท่าน ที่ร่วมมือกันดำเนินการวิจัยจนงานสำเร็จตามวัตถุประสงค์

สุวิทย์ วรรณศรี

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญภาพ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและปัญหาของการวิจัย... ..	1
วัตถุประสงค์.....	2
คำสำคัญ (Keyword)	2
ขอบเขตของการวิจัย ขอบเขตของการศึกษา.....	3
บทที่ 2.....	5
การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1) ความหลากหลายทางชีวภาพ.....	5
ความหลากหลายของระบบนิเวศ.....	5
2) ปลาน้ำจืดวงศ์ปลาช่อน.....	7
3) อวัยวะภายนอกของปลา	19
ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะโครงสร้างของปลา.....	24
4) ชนิดของป่าไม้ในเมืองไทย.....	24
5) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่.....	26
6) รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	28
บทที่ 3 วิธีการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	36
1) ตำราวลักษณะทางภูมิศาสตร์ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่...36	
ภาพที่ 1 แสดงสถานที่ทำการ เก็บข้อมูล เพื่อศึกษาคุณภาพน้ำในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า	
ตะเบาะและห้วยใหญ่.....	36
เครื่องมือ.....	36

2) ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของปลากุ้งในแต่ละถิ่นที่อยู่อาศัยในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่.....	38
เครื่องมือ.....	38
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	41
1) ผลการสำรวจลักษณะทางภูมิศาสตร์ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่.....	41
2) ผลการ ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของปลากุ้งในแต่ละถิ่นที่อยู่อาศัยในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่.....	42
บทที่ 5 สรุปผลอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	45
บรรณานุกรม.....	50
ภาคผนวก.....	52

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1 แผนที่แสดง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่.....	3
ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะ โครงสร้างของปลา.....	24

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 จำนวนปลากุ้ง	42
4.2 ดัชนีความหลากหลายทางชีวภาพของของปลากุ้ง.....	43
4.3 แสดงจำนวนปลากุ้งที่พบในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่.....	43

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและปัญหาของการวิจัย

ปัจจุบันสัตว์น้ำในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่ อำเภอเมือง จังหวัด เพชรบูรณ์ลดจำนวนลง การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ ด้านชีววิทยา พฤติกรรม และสรีรวิทยา ของ สัตว์น้ำมีความสำคัญต่อความเข้าใจที่จะนำไปประยุกต์เพื่อศึกษาในศาสตร์ด้านอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการ นำมาประยุกต์ใช้ในด้านเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อมของประเทศ เพราะเป็นแนวทางที่จะสามารถนำมา จัดการวางแผนการใช้ทรัพยากรธรรมชาติได้อย่างต่อเนื่องและยั่งยืน เมื่อทราบถึงความหลากหลายทาง ชีวภาพแล้ว สามารถที่จะเลือกชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีความเหมาะสมกับการที่จะพัฒนาศักยภาพนั้นต่อไป การศึกษาชีววิทยาบางประการของปลากั้ง ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ จึงมีความสำคัญต่อการศึกษาทรัพยากรทางชีวภาพของท้องถิ่นที่สามารถนำข้อมูลที่ได้ นำไปใช้ต่อการพัฒนาการศึกษาในด้านอื่นๆ ต่อไป เช่น การเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ และการ เพาะเลี้ยงขยายพันธุ์เพื่อเป็นสัตว์เศรษฐกิจ

ปลากั้ง หรือ ปลาก้าง ชื่อวิทยาศาสตร์ *Channa limbata* (Cuvier, 1831) เป็นปลาหายาก ปลาในกลุ่ม ปลาช่อนมีอวัยวะช่วยหายใจเป็นหลีบเนื้อสีแดงอยู่ในคอหอย เรียกว่า suprabranchia จึงสามารถอยู่ในแหล่ง น้ำที่มือออกซิเจนต่ำได้ และยังสามารถนำมาเลี้ยงเป็นปลาสวยงามได้ (ชวลิต, 2544) จากข้อมูลดังกล่าว การศึกษาด้านลักษณะทางชีววิทยาของปลากั้ง ได้แก่ อนุกรมวิธาน ความสัมพันธ์ทางชีววิทยา ฤดูกาลวางไข่ อาหารและนิเวศการกินอาหารของปลากั้ง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานที่นำไปประยุกต์ใช้ ในการศึกษาด้านอื่นต่อไปได้ เช่น แนวทางการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ปลากั้ง, การตรวจสอบความ แปรปรวนของกลุ่มประชากรทางพันธุศาสตร์ด้วยไมโครแซทเทลไลต์ เป็นต้น กระบวนการศึกษาลักษณะ ทางพันธุกรรมในประชากรปลากั้ง จากลักษณะดีเอ็นเอ ไมโครแซทเทลไลต์ (DNA Microsatellite) ในกลุ่ม ประชากรปลากั้งในพื้นที่ศึกษา เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปลากั้ง โดยใช้เทคนิค เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อเป็นข้อมูลสำคัญในการสร้างพ่อแม่พันธุ์ปลากั้ง เป็น กระบวนการพัฒนาระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากั้งซึ่งจะเป็นประโยชน์ในด้านการ เพาะเลี้ยงต่อไป

ผู้วิจัยและคณะซึ่งอยู่ในพื้นที่ดังกล่าว และ มีหน้าที่สำคัญในการศึกษาค้นคว้าหาองค์ความรู้ วิทยาศาสตร์จากแหล่งเรียนรู้ในท้องถิ่น มาเพิ่มในกิจกรรมจัดการเรียนการสอน และเผยแพร่ความรู้แก่ ชุมชนในท้องถิ่น จึงสนใจที่จะวิจัย โดยจัดทำ แผนงานวิจัย ความหลากหลายทางชีวภาพ ของปลากั้ง ใน เขต

รักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่ นอกจากนี้แล้ว รายงานผลการวิจัยของโครงการวิจัยนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานความรู้ในการวิจัยเชิงประยุกต์ และการศึกษาค้นคว้าในสถาบันการศึกษาต่าง ๆ ได้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาไมโครแซเทลไลท์ดีเอ็นเอ ของปลากั้งในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่

คำสำคัญ (Keyword)

1. ปลากั้ง หรือปลาก้าง (*Channa limbata*) หมายถึง ปลาน้ำจืดในวงศ์ Channidae ปลาในวงศ์นี้มีรูปร่างเรียวยาวทรงกระบอก ส่วนหัวโตจะงอยปากยื่น ปากกว้าง ตาโต มีฟันเป็นเขี้ยวบนขากรรไกร หัวด้านบนราบ ถ้าดูจากตอนบนจะโค้งมนคล้ายงู ลำตัวค่อนข้างกลม ครีบหลังและครีบก้นยาว ครีบหางปลายมน ครีบอกใหญ่ ครีบท้องเล็ก เกล็ดใหญ่มีขอบเรียบ (Cycloid) ปลาในกลุ่มปลาช่อนมีอวัยวะช่วยหายใจเป็นลิ้นเนื้อสีแดงอยู่ในคอหอย

2. ไมโครแซเทลไลท์ดีเอ็นเอ หมายถึง เครื่องหมายพันธุกรรมที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์น้ำ ไมโครแซเทลไลท์เป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเรียงตัวกันประมาณ 1-6 นิวคลีโอไทด์ โดยการซ้ำติดต่อกันไปเรื่อยๆ เป็นช่วงยาว โดยเบสซ้ำชนิดนี้พบกระจายอยู่ในบริเวณต่างๆ ของจีโนม และมีความผันแปรสูง ไมโครแซเทลไลท์มีการแสดงผลแบบลักษณะข่มร่วม (co-dominant) จึงสามารถแปรผลเป็นลักษณะยีนโนไทป์คล้ายข้อมูลของไอโซไซม์ทำให้ข้อมูลที่ได้เหมาะสมในการวิเคราะห์ประชากรหรือชนิดพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกัน (O'Reilly และ Wright, 1995)

3. การพัฒนาไมโครแซเทลไลท์ไพรเมอร์ (Development of Microsatellite Primers) หมายถึง กระบวนการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมในประชากรปลากั้ง จากลักษณะดีเอ็นเอ ไมโครแซเทลไลท์ (DNA Microsatellite) ในกลุ่มประชากรปลากั้งในพื้นที่ศึกษา เพื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมในรูปของ ค่าความผันแปรทางพันธุกรรมต่างๆ (Genetic variabilities) โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซเทลไลท์ ในการศึกษาไมโครแซเทลไลท์ดีเอ็นเอ ของปลากั้งในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่ ในการวิจัยครั้งนี้ มีข้อจำกัดในเรื่องระยะเวลาที่สั้น จึงได้ดำเนินการวิจัยในประเด็นปัญหาที่สำคัญดังนี้

3.1 การศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของปลากั้ง ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่

3.2 พัฒนาไพรเมอร์สำหรับการศึกษาความผันแปรของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซเทลไลท์ ดีเอ็นเอสำหรับปลากั้งในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่

4. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่ หมายถึง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสังกัดกรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช หรือ กรมป่าไม้(เดิม)ได้เข้าดำเนินการจัดตั้ง มาตั้งแต่วันที่ 14 พฤษภาคม 2534 ซึ่งเป็นผืนป่าติดต่อกับอุทยานแห่งชาติดาดหมอกและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว ตั้งอยู่ ระหว่างเส้นรุ้งที่ $15^{\circ} 50'$ ถึง $16^{\circ} 25'$ เหนือ และเส้นแวงที่ $101^{\circ} 15'$ ถึง $101^{\circ} 30'$ ตะวันออก ทิศเหนือ จดเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว ท้องที่ตำบลนางแดด อำเภอหนองบัวแดง จังหวัดชัยภูมิ อุทยานแห่งชาติดาดหมอก ท้องที่ตำบลนาป่า อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ทิศใต้ จดพื้นที่เกษตรกรรม ท้องที่ตำบลสระแก้ว อำเภอบึงสามพัน จังหวัดเพชรบูรณ์ ตำบลวังทอง อำเภอภักดีชุมพล จังหวัดชัยภูมิ ทิศตะวันออก จดพื้นที่เกษตรกรรมและป่าธรรมชาติท้องที่ตำบลบ้านเจียง ตำบลแหลมทอง อำเภอภักดีชุมพล ตำบลถ้ำวัวแดง อำเภอหนองบัวแดง จังหวัดชัยภูมิ ทิศตะวันตก จดพื้นที่เกษตรกรรมและป่าธรรมชาติท้องที่ตำบลบ่อไทย ตำบลท่าคิ้ว อำเภอหนองไผ่ ตำบลตะเบาะ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์



ภาพที่ 1 แผนที่แสดง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่

(ที่มา : สำนักงานเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่, ๒๕๕๐)

ขอบเขตของการวิจัย ขอบเขตของการศึกษา

คณะผู้วิจัย การวิจัยการพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรมอร์สำหรับการเพาะเลี้ยงปลากัง (Channa limbata) เพื่อการอนุรักษ์และเชิงเศรษฐกิจ แบ่ง ขอบเขตของเนื้อหาการวิจัยเป็น 2 ตอน ดังนี้ ตอนที่ 1 การศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของปลากัง ใน จุดเก็บตัวอย่าง ในพื้นที่วิจัย ตอนที่ 2 พัฒนาไพซีอาร์ไพรมอร์สำหรับการศึกษความผันแปรของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอสำหรับปลากัง โดยระยะเวลาที่วิจัย 8 เดือน ระหว่าง เดือน มีนาคม – ตุลาคม พ.ศ. 2557 (เฉพาะการเก็บข้อมูลภาคสนามระหว่างเดือนสิงหาคม – ตุลาคม พ.ศ. 2557)

บทที่ 2

การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในบทนี้ผู้วิจัยขอนำเสนอผลการตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

1. ปลาน้ำจืดวงศ์ปลาช่อน
2. อวัยวะภายนอกของปลา
3. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่
4. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ : เทคนิคสำคัญเพื่อการระบุตัวสัตว์ป่า
5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ปลาน้ำจืดวงศ์ปลาช่อน (Channidae : Snakehead fish)

ปลาในวงศ์นี้มีรูปร่างเรียวยาวทรงกระบอก ส่วนหัวโตจงอยปากยื่น ปากกว้าง ตาโต มีฟันเป็นเขี้ยวบนขากรรไกร หัวด้านบนราบ ถ้าดูจากตอนบนจะโค้งมนคล้ายงู ลำตัวค่อนข้างกลม ครีบหลังและครีบก้นยาว ครีบท้องสั้น ครีบก้นใหญ่ ครีบท้องเล็ก เกือบมีขนาดใหญ่มิชอบเรียบ ปลาช่อนมีอวัยวะช่วยหายใจเป็นหลืบเนื้อสีแดงอยู่ในคอหอย เรียกว่า Suprabranchia จึงสามารถอยู่ในแหล่งน้ำที่มีออกซิเจนต่ำได้ ใช้ชื่อวงศ์ว่า Channidae

แพร่พันธุ์โดยการวางไข่โดยตัวผู้และตัวเมียช่วยกันปรับพื้นที่น้ำตื้น ๆ ให้เป็นแปลงกลม แล้ววางไข่ลอยเป็นแพ ตัวผู้เป็นผู้ดูแลไข่จนไข่ฟักเป็นตัวแล้วเลี้ยงลูกปลาจนโต เรียกว่า "ลูกครอก" ซึ่งมีสีแดงหรือส้ม รูปร่างคล้ายพ่อแม่ จากนั้นจึงปล่อยให้หากินเอง

พบในเขตร้อนของทวีปแอฟริกาและเอเชีย ปัจจุบันพบทั้งสิ้น 31 ชนิด (และยังมีอีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้อนุกรมวิธาน) แบ่งเป็น 2 สกุล คือ *Channa* 28 ชนิด พบในทวีปเอเชีย และ *Parachanna* ซึ่งพบในทวีปแอฟริกา 3 ชนิด สำหรับในประเทศไทยพบประมาณ 10 ชนิด ปลาขนาดเล็กที่สุดคือ ปลาก้าง (*C. limbata*) ซึ่งมีขนาดโตเต็มที่ไม่เกิน 1 ฟุต และใหญ่ที่สุดคือ ปลาชะโด (*C. micropeltes*) ที่ใหญ่ได้ถึง 1-1.5 เมตร

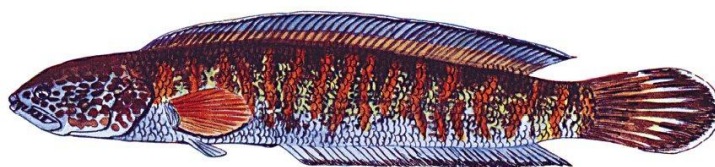
จัดเป็นวงศ์ปลาเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมาก จนอาจกล่าวได้ว่าเป็นปลาน้ำจืดที่คนไทยนิยมบริโภคมากเป็นอันดับหนึ่งก็ได้ โดยปลาช่อนชนิดที่นิยมนำมาบริโภคคือ ปลาช่อน (*C. straita*) ซึ่งพบได้ทุกแหล่งน้ำและทุกภูมิภาค ตัวอย่างปลาในวงศ์นี้ ได้แก่ (ชวลิต วิทยานนท์ 2544)

1) *Channa amphibeus* (McClelland, 1845) ปลาช่อนเซล หรือ ปลาช่อนบอร์นา

ชื่อทั่วไป : Borna snakehead ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 90.0 cm TL

แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : อินเดีย และ ภูฏาน เป็นปลาที่อาศัยอยู่เฉพาะในแม่น้ำเซล ซึ่งเป็นสาขาของแม่น้ำพรหมบุตร ใกล้กับเชิงเทือกเขาหิมาลัยในภูฏานและปากีสถาน ซึ่งจะอาศัยอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิค่อนข้างอุ่น ประมาณ 22-28 องศาเซลเซียส นับเป็นปลาช่อนขนาดกลางที่มีความสวยงามอีกชนิดหนึ่ง เช่นเดียวกับ *C. barca* และ *C. aurantimaculata* ที่อยู่ในสกุลเดียวกัน มีสีส้มที่ใกล้เคียงกัน แต่ว่ามีจำนวนก้านครีบหลัง 50 ก้าน ก้านครีบก้น 35 ครีบ มีเกล็ดข้างลำตัวมากถึง 81 เกล็ด นับว่ามากกว่าชนิดอื่น ๆ ขนาดโตเต็มที่มีความยาวประมาณ 25 เซนติเมตร ซึ่งนับว่าเล็กกว่า 2 ชนิดข้างต้น

Channa amphibeus (McClelland, 1845)
Chel Snakehead



After Shaw and Shebbear, 1938

Channa amphibeus

2) *Channa argus argus* (Cantor, 1842) ชื่อทั่วไป : Snakehead

ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 100.0 cm TL สภาพภูมิอากาศ : เขตอบอุ่น 14 - 22 องศาเซลเซียส

แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : จีน และ ทางตะวันตกของเกาหลีใต้, ญี่ปุ่น และเป็นชนิดที่มีรายงานว่าไปคุกคามปลาท้องถิ่นในประเทศอเมริกา



Channa argus argus

3) *Channa argus warpachowskii* (Berg, 1909)

ชื่อทั่วไป : Amur snakehead ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 80.0 cm TL สภาพภูมิอากาศ : เขตอบอุ่น 4 - 20 องศาเซลเซียส แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : จาคริสต์เซีย ทะเลสาป Khanka. ตอนกลางและตอนล่างของ Amur. แต่ไม่พบในแม่น้ำ Suifun. พบมีการนำเข้ามายังลุ่มน้ำ Aral ในปี 1960 และแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว และกระจายไปยังตอนล่างของ Amu Darya, Syr Darya และแม่น้ำ Kashka-Darya. ปัจจุบันมีการนำเข้าไปยัง Talas และแม่น้ำ Chu

4 *Channa asiatica* (Linnaeus, 1758) ปลาซ่อนเล็ก

ชื่อทั่วไป : Amur snakehead ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 20.0 cm TL สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน 22 - 28 องศาเซลเซียส แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : ลุ่มแม่น้ำ Yangtze ตอนกลางของจีน ไต้หวัน, เกาะ Hainan ลุ่มแม่น้ำแดง ของเวียดนาม. และมีรายงานว่าพบที่ญี่ปุ่นและศรีลังกาด้วย



Channa asiatica

5) *Channa aurantimaculata* (Musikasinthorn, 2000) ปลาซ่อนออเรนติ

ชื่อทั่วไป : -ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 19.1 cm SL สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย :

อินเดีย มีความยาวเต็มที่ประมาณ 45 เซนติเมตร โตเต็มที่ได้ถึง 60 เซนติเมตร พบกระจายพันธุ์ในแม่น้ำรามบุตร ซึ่งเป็นแควสาขาของแม่น้ำพรหมบุตร ในตอนเหนือรัฐอัสสัมของประเทศอินเดีย โดยในตอนแรกมักถูกสับสนกับปลาช่อนบาร์กาเนื่องจากมีลักษณะใกล้เคียงกันมากและพบในแหล่งน้ำเดียวกัน แต่ได้ถูกอนุกรมวิธานปรัชญา มุสิกสินธร นักมีนวิทยาชาวไทย ที่ได้เข้าไปศึกษาปลาในประเทศอินเดียเมื่อปี ค.ศ. 2000



Channa aurantimaculata

6) *Channa bankanensis* (Bleeker, 1852) ปลาช่อนแบงก้า

ชื่อทั่วไป : -ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 23.5 cm TL สภาพแวดล้อม : pH 2.8-3.8

สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : อินโดนีเซีย และ มาเลเซีย



Channa bankanensis

7) *Channa baramensis* (Steindachner, 1901)

ชื่อทั่วไป : Baram snakehead ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : -สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : มาเลเซีย



Channa baramensis

8) *Channa barca* (Hamilton, 1822)

ชื่อทั่วไป : Barca snakehead ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 90.0 cm TL

สภาพแวดล้อม : เป็นชนิดที่มีการอพยพโยกย้ายถิ่นฐาน สภาพภูมิอากาศ : เขตอบอุ่น แหล่งแพร่กระจาย

พันธุ์ : ทวีปเอเชีย : อินเดีย และ บังกลาเทศ



Channa barca

9) *Channa bleheri* (Vierke, 1991)

ชื่อทั่วไป : -ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 13.5 cm SL สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย :
อินเดีย



Channa bleheri

10) *Channa burmanica* (Chaudhuri, 1919)

ชื่อทั่วไป : Burmese snakehead ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : - สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน
แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : พม่า



Channa burmanica

11) *Channa cyanospilos* (Bleeker, 1853) ชื่อทั่วไป : -

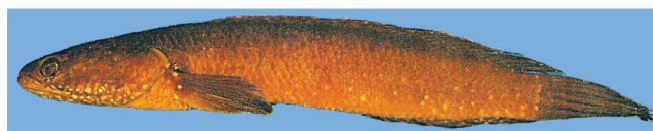
ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 17.6 cm SL

สภาวะแวดล้อม : -

สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน

แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : อินโดนีเซีย (สุมาตรา)

Channa cyanospilos (Bleeker, 1853)
Bluespotted Snakehead



Reprinted with permission from P.K.L. Ng from: Lee, P.G., and P.K.L. Ng. 1991. The snakehead fishes of the Indo-Malayan region. Nature Malaysiana 16(4):112-129.

12) *Channa diplogramma* (Day, 1865)

ชื่อทั่วไป : Indian Giant Snakeheadขนาดเมื่อโตเต็มที่ : -สภาวะแวดล้อม : -สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน
แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : Cochin, ชายฝั่ง Malabar, อินเดีย



13) *Channa gachua* (Hamilton, 1822)

ชื่อทั่วไป : ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 20.0 cm SLสภาวะแวดล้อม : pH 6 - 7สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน 22-26 องศา
เซลเซียสแหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : ศรีลังกา จนถึง แม่กลอง และ บาห์ลี อินโดนีเซีย.

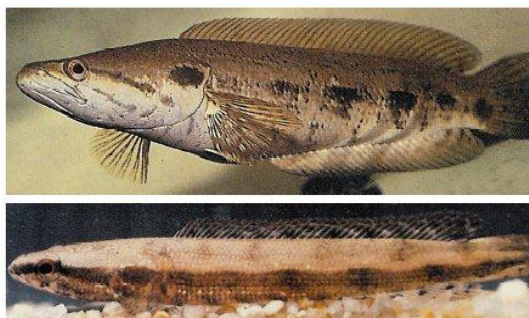
14) *Channa harcourtbutleri* (Annandale, 1918)

ชื่อทั่วไป : Inle snakeheadขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 18.5 cm SLสภาวะแวดล้อม : อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำ สภาพ
ภูมิอากาศ : เขตร้อนแหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : พม่า



Channa harcourtbutleri

15) *Channa lucius* (Cuvier, 1831) ปลากระสง ชื่ออื่น กระจน(อีสาน) ช่อนไซ (ใต้)
ชื่อทั่วไป : Pla kra song ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 40.0 cm SLสภาวะแวดล้อม : เป็นชนิดที่มีการอพยพ
สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน 22 - 26 องศาเซลเซียสแหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : ไทย และ
อินโดนีเซีย



Channa lucius

16) *Channa maculata* (Lacepède, 1801)

ชื่อทั่วไป : - ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 20.0 cm TL สภาวะแวดล้อม : สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน
แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : ญี่ปุ่น, จีนตอนใต้, เวียดนาม, ไต้หวัน และ ฟิลิปปินส์



Channa maculata

17) *Channa maruloides* (Bleeker, 1851) ปลาช่อนข้าหลวง ช่อนทอง (นราธิวาส)

ชื่อทั่วไป : - ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 27.0 cm TL สภาวะแวดล้อม : สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน

แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : อินโดนีเซีย และ มาเลเซีย

เป็นปลาหายาก มีขนาดใหญ่และมีสีสันสวยงาม รูปร่างโดยรวมคล้ายปลาช่อนงูเห่า ทว่าสั้นป้อมกว่าสีของลำตัวด้านบนเข้มเหลืองสลับดำอมเขียวลำตัวส่วนท้ายมีลายบั้งจาง ๆ คล้ายช่อนงูเห่าส่วนท้องออกจาง ดูเผิน ๆ คล้ายสีนั้นแบ่งเป็นสองโหนดตรงกลางแนวนอนลำตัวพอดีพอดี ในตลาดปลาสวยงามปลาช่อนข้าหลวงถือเป็นปลาคลาสสิก เป็นปลาชั้นสูงมีสกุลสมชื่อจริงๆ แต่การเลี้ยงก็เหมือนกลุ่มหัวงูอื่น ๆ คือกินแหลก และไม่ค่อยจู้จุกจิกมากนัก ชอบตู้กว้าง ๆ จัดตกแต่งพอเหมาะพอควร ไม่จำเป็นต้องหนาแน่นรกรักรังแต่ก็อย่าให้ถึงกับล้านเลี่ยนเตียนโล่งไม่มีที่ให้หลบซ่อนเลย ปลาที่เลี้ยงในสภาพเหมาะสมจะแสดงความโดดเด่นงดงามของมันออกมาเหนือชั้นกว่าช่อนชนิดอื่น



Channa maruloides

18) *Channa marulius* (Hamilton, 1822) ชื่อทั่วไป : Great snakehead ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 183 cm TL

สภาวะแวดล้อม : มีการอพยพโยกย้ายถิ่นฐานสภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน 24 - 28 องศาเซลเซียส

แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : ตั้งแต่อินเดีย จนถึง จีน, ทางตอนใต้ของประเทศไทย และ กัมพูชา

รวมถึงปากีสถานชนิดนี้จะเป็นช่อนงูเห่าชนิดที่พบในอินเดีย และบังคลาเทศ ซึ่งเป็นคนละชนิดกับช่อนงูเห่าที่พบในประเทศไทยและพม่า ปลาช่อนชนิดนี้เหมือนงูเห่า คือมีหัวแบนแถมยังมีดอกจันตรงหาง ลำตัวก็ยาวเรียว ในปากมีเขี้ยวแหลมยาว มีนิสัยดุร้ายเหมือนชะโด



Channa marulius

19) *Channa melanoptera* (Bleeker, 1855)

ชื่อทั่วไป : ช่อนดำ -ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 65.0 cm TL สภาวะแวดล้อม : -

สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อนแหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : อินโดนีเซีย

20) *Channa melasoma* (Bleeker, 1851) ชื่อทั่วไป : Black snakehead ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 30.0 cm SL

สภาวะแวดล้อม : -สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน

แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : แม่น้ำแม่กลองในประเทศไทย ไปจนถึง อินโดนีเซีย และ ฟิลิปปินส์



Channa melanoptera

21) *Channa micropeltes* (Cuvier, 1831)

ชื่อทั่วไป : Giant snakehead-ปลาชะโดจอมโหด ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 130 cm SL

สภาวะแวดล้อม : -สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน 25 - 28 องศาเซลเซียสแหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย :

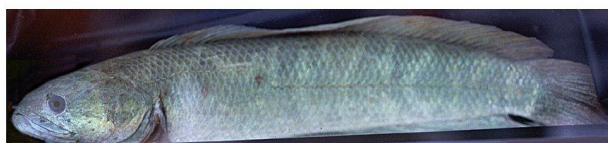
ลุ่มแม่น้ำแม่กลอง และ ลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา, เพนนินซูล่า มาเลเซีย, เกาะต่างๆของสุมาตราและบอร์เนียว

22) *Channa nox* (Zhang, Musikasinthorn & Watanabe, 2002)

ชื่อทั่วไป : Night snakehead ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 19.8 cm SL

สภาวะแวดล้อม : -สภาพภูมิอากาศ : เขตอบอุ่นแหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : จีน

Channa nox Zhang, Musikasinthorn, and Watanabe, 2002
Night Snakehead



Purchased from a live-food fish market at Mong Kok, Hong Kong. Photograph by Heok Hui Tan.

23) *Channa orientalis* (Bloch & Schneider, 1801)

ชื่อทั่วไป : Walking snakehead ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 33.0 cm TL

สภาวะแวดล้อม : เป็นชนิดที่มีการอพยพ อาศัยอยู่ได้ทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อย pH. 6-8 dH 5 -19

สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน 23 - 6 องศาเซลเซียส แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : อาฟกานิสถาน และ Baluchistan ทางใต้แพร่กระจายไปถึง ศรีลังกา และทางตะวันออกไปถึง อินโดนีเซีย



Channa orientalis

24) *Channa panaw* (Musikasinthorn, 1998)

ชื่อทั่วไป : -ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 17.1 cm SL สภาวะแวดล้อม : -สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน

แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : เท้าที่ทราบพบจากลุ่มแม่น้ำอิระวดี (Irrawaddy) และ ชีตแตง (Sittang) ประเทศพม่า



Channa panaw

25) *Channa pleurophthalmus* (Bleeker, 1851)

ชื่อทั่วไป : -ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 40.0 cm TL สภาวะแวดล้อม : -สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน

แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : สุมาตรา และบอร์เนียว



Channa pleurophthalmus

26) *Channa punctata* (Bloch, 1793)

ชื่อทั่วไป : Spotted snakehead ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 31.0 cm TL

สภาวะแวดล้อม : เป็นชนิดที่มีการอพยพ อาศัยอยู่ในน้ำจืดและน้ำกร่อยสภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน 22-28 องศาเซลเซียส แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : อัฟกานิสถาน, ปากีสถาน, อินเดีย, ศรีลังกา, เนปาล



Channa punctata

27) *Channa stewartii* (Playfair, 1867) ชื่อทั่วไป : Assamese snakehead ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 25.0 cm TL

สภาวะแวดล้อม : -สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน

แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย : พื้นที่ทางตะวันออกของหิมาลายา (อินเดีย และ เนปาล)



Channa stewartii

28) *Channa striata* (Bloch, 1793) ชื่อทั่วไป : Common snakehead ขนาดเมื่อโตเต็มที่ : 100.0 cm SL
 สภาวะแวดล้อม : การอพยพอย่างภายในแหล่งน้ำจืด, อาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืด และน้ำกร่อย, pH 7 – 8; dH 20,
 ระดับความลึก 1 – 10 m สภาพภูมิอากาศ : เขตร้อน 23-27 องศาเซลเซียส แหล่งแพร่กระจายพันธุ์ : ทวีปเอเชีย
 : ปากีสถานจนถึงประเทศไทย



Channa striata

จากเอกสาร ชนิดของปลาวงศ์ปลาช่อนดังกล่าวมาแล้ว พบว่ามีข้อมูล หรือ รายละเอียดของ
 ปลาก้าง *Channa limbata* (Cuvier, 1831) น้อยมาก (ซึ่งเป็นปลาน้ำจืด ชื่อภาษาอังกฤษ Red-Tailed
 Snakehead แหล่งอาศัย ทางตอนใต้ของประเทศจีนลงมาถึงพม่า ไทย ลาว มาเลเซีย และอินโดนีเซีย ขนาด
 15-20 ซม. ปลาก้าง คือปลาในวงศ์ปลาช่อนเมืองไทยที่มีขนาดเล็กที่สุด สีลำตัวค่อนข้างอ่อนจาง)



Channa limbata

ดังนั้นผู้วิจัยและคณะจึงดำเนินการวิจัยตามโครงการวิจัย ชื่อ ความหลากหลายชนิดของของปลากั้ง
ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่อำเภอเมืองจังหวัดเพชรบูรณ์

2. อวัยวะภายนอกของปลา

อวัยวะที่ตั้งอยู่บนส่วนหัว เนื่องจากหัวเป็นที่ตั้งของอวัยวะสำคัญนอกจากสมองและเหงือกแล้วยังประกอบไปด้วยปาก หนวด จมูก ตา หู และฟัน ดังนี้

จงอยปาก (Snout) คือส่วนหัวบริเวณเหนือขากรรไกรบน ซึ่งกินบริเวณตั้งแต่ขอบหน้าตาไปจนสุดปลายปากหรือปลายสุดด้านหน้า บางชนิดยื่นยาวออกไปเรียก รอสทรัม (Rostrum) เช่น ปลาฉลาม ระหว่างจงอยปากมีรูจมูก 1- 2 คู่

ปาก (Mouth) ปากของปลาประกอบไปด้วยขากรรไกรบนและล่าง ขากรรไกรบนประกอบด้วยกระดูก 3 ชิ้น คือ กระดูกพรีแมกซิลลารี (Premaxillary Bone) อยู่หน้าสุด ข. กระดูกแมกซิลลารี (Maxillary Bone) ชิ้นกลาง กระดูกซัพพลีเมนทารี แมกซิลลารี (Supplementary Maxillary Bone) เป็นชิ้นท้ายสุด

กระดูกทั้ง 3 ชิ้นมีขนาดแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของปลา ในปลาบางชนิดกระดูกชิ้นใดชิ้นหนึ่งอาจลดขนาดเล็กลงหรือหายไป ส่วนขากรรไกรล่างประกอบด้วย กระดูกเดนทารี (Dentary) และอาร์ทิคูลา (Articula)

ปากของปลามีรูปร่าง ตำแหน่ง และขนาดแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับอุปนิสัยการกินอาหารและชนิดของอาหารที่ชอบกิน บางชนิดปากเล็กชอบกินพืช แพลงก์ตอน ไรน้ำ เช่น ปลากระดี่ บางชนิดปากปานกลางชอบกินทั้งพืชและสัตว์ เช่น ปลาสวาย บางชนิดปากใหญ่ชอบกินเนื้อ เช่น ปลาช่อน

ตำแหน่งที่ตั้งของปากโดยทั่วไปแบ่งได้ 4 แบบ คือ ปากอยู่ด้านหน้า (Anterior หรือ Terminal) คือ

ปากอยู่ด้านหน้าสุดของหัวหรือหน้าสุดของจะงอยปาก พบในปลาทั่วไปซึ่งมักหากินระดับกลางน้ำ เช่น ปลา สลิด ปลาตะเพียน ปลากระบอก เป็นต้น ปากอยู่ด้านล่าง (Inferior) ปากอยู่ในระดับต่ำทางด้านล่างตอนหน้า ของส่วนหัว มักเป็นปลาที่หากินตามพื้นท้องน้ำ เช่น ปลากระเบน หรือปลาที่กินเหยื่อทางด้านล่างของลำตัว เช่น ปลาฉลาม . ปากอยู่ด้านบนในแนวนอน (Superior Horizontal) ปากอยู่ทางด้านหน้าตอนบนของส่วนหัว มักเป็นปลาที่หากินบริเวณผิวน้ำ เช่น ปลาเข็ม ปากอยู่ด้านบนในแนวเฉียงขึ้น (Superior Oblique) ปากอยู่ ทางด้านหน้าตอนบนของส่วนหัวและเฉียงขึ้น เช่น ปลาคางเบือน

ปกติแล้วรูปร่างปากของปลามีรูปร่างธรรมดา มีขากรรไกรบนและล่างปกติ แต่ก็มีปลาบางชนิด ปากมีการดัดแปลงรูปร่างให้เหมาะสมกับนิสัยการกินอาหารและ ชนิดของอาหารที่ชอบกิน รวมทั้งแหล่ง ของอาหาร จึงมีปากที่แปลกออกไปจากธรรมดา 5 แบบ คือ

ก. ปากคล้ายท่อหรือหลอด (Tube-like or Pipe-like Mouth) ปากมีลักษณะเป็นท่อหรือหลอดยื่นยาว ออกไป โดยมีช่องเปิดของปากอยู่ที่ส่วนปลายของท่อ มักเป็นปลาที่ชอบตะเล็มของเล็กๆ ที่ติดอยู่กับ ปะการัง ซอกหิน เช่น ปลาปากแตร ปลาม้าน้ำ ปลาจิ้มฟันจระเข้ ปลาผีเสื้อบางชนิด

ข. ปากแบบฟันเลื่อย (Saw-like Mouth) เกิดจากการเจริญของจะงอยปากที่ยื่นยาวออกไปที่เรียกว่า รอสทริม บนรอสทริมนีจะมีซี่ฟันคมแข็งคล้ายฟันเลื่อยยื่นยาวออกไปทั้งสองข้าง ใช้ป้องกันตัว ได้แก่ ปลา ฉลาม (Saw Fish)

ค. ปากแบบปากนก (Beak-like Mouth) เกิดจากจะงอยปากยื่นยาวออกไปและมีปลายแหลม เกิดจาก กระดูกขากรรไกรบนและล่างยื่นยาวออกไป มักเป็นปลากินเนื้อ มีฟันยาวบนขากรรไกร

ขากรรไกรบนสั้นและขากรรไกรล่างยาว ได้แก่ ปลากระทุงเหว ปลาเข็ม

ขากรรไกรบนยาวและขากรรไกรล่างสั้นกว่า ได้แก่ ปลากระโทงแทง

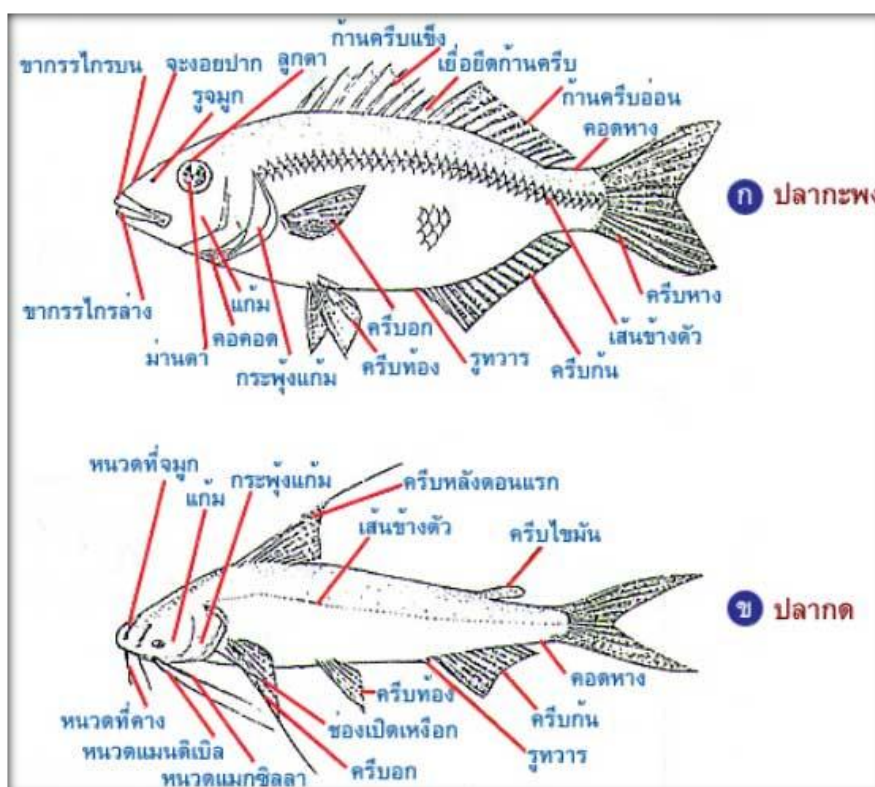
ง. ปากยืดหดได้ (Protractile Mouth) เกิดจากกระดูกขากรรไกรบนมีเพดดิเซล (Pedicel) ยาว ลักษณะการยืดนี้อาจจะทำให้ปากชี้ขึ้นบน ชี้นล่าง หรือชี้ตรงออกไป พบในพวกปลาเป็น ปลาหมอตาล เป็นต้น

จ. ปากดูด (Sucking Mouth) พวกนี้มักมีตำแหน่งปากด้านล่าง มีขากรรไกรล่างแข็งแรง เนื้อเยื่อที่ คลุมขอบขากรรไกรแข็งเป็นสันใช้สำหรับตัดหรือดูดตะไคร่น้ำที่ ขึ้นตามก้อนหิน รอบปากมีเมือกนุ่มๆ ย่นๆ ยึดหดได้ ใช้ในการเกาะติดก้อนหิน เช่น ปลาเลียหิน ปลาลูกฟุ้งหรือรากกล้วย เป็นต้น

จมูก (Nostrils, Nares or Nasal Opening) จมูกของปลามีลักษณะเป็นถุงตัน ภายในมีเยื่อและเซลล์

ประสาทรับกลิ่น (Olfactory Cell) ดังนั้นจมูกของปลาจึงทำหน้าที่ในการดมกลิ่นเท่านั้น ไม่ได้เกี่ยวข้องกับ การหายใจ ปลาปากกลมมีรูจมูกคู่เดียวตรงกลางระหว่างตา ส่วนปลาทั่วไปมีรูจมูก 1 - 2 คู่ ส่วนใหญ่มี 2 คู่ ยกเว้นปลาในวงศ์ซิคลิดี (Cichlidae) ได้แก่ ปลานิล ปลาหมอเทศ และวงศ์โปมาเซนทรีดี (Pomacentridae) เช่น ปลาสลิคหิน ปลาการ์ตูน มีรูจมูกเพียง 1 คู่ ในปลาฉลามมีเซลล์ประสาทจมูกเจริญดีมากจึงรับกลิ่นได้ดี

ตา (Eye) มีขนาด รูปร่าง ตำแหน่งที่ตั้งแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา



ภาพที่ 2.1 ลักษณะภายนอกของปลา กระดุกแข็ง

ก. ขนาด ปลาที่อยู่ในน้ำลึกหรือในถ้ำมืด ตาใช้งานน้อยจะมีขนาดเล็ก ส่วนพวกหากินบริเวณน้ำลึก หรือหากินเวลากลางคืนตาใช้งานมากจะมีขนาดใหญ่ แต่ในปลาคูชอบหากินในที่มืดสลัวและน้ำขุ่นตาใช้งานน้อยจึงมีขนาดเล็ก ใช้หนวดในการหาอาหารแทน

ข. รูปร่าง ปลาที่ว่ายน้ำช้าๆ มักมีตัวรูปกลม เช่น ปลาหมอ ปลาช่อน ปลาที่ว่ายน้ำเร็วมักมีตัวรี เช่น ปลาโอ ปลาทุณห์ ส่วนปลาตีนมีตาโปนขึ้นมาเพราะมีก้านตาเป็นพวกอึดอาดเชิงขา

ค. ตำแหน่ง ปลาขนาดเล็กที่เป็นเหยื่อของปลาใหญ่มักมีตาอยู่สองข้างของหัว เพื่อหลบหลีกภัย เพราะมองเห็นได้กว้าง ปลาที่ดุร้ายและล่าเหยื่อมีนัยน์ตาค่อนไปข้างหน้า การรับภาพจะแคบลงแต่ชัดเจน

เช่น ปลาซ่อน ปลากะพง ปลาที่หากินตามพื้นท้องน้ำ เช่น ปลากระเบน ปลาลิ้นหมา ตาจะอยู่ด้านบน พวกหา
กินบริเวณผิวน้ำตาจะเข้ดขึ้น

ปกติตาของปลาจะไม่เปลือกตา ยกเว้นในปลาฉลามหนุมีเปลือกตาปิดจากด้านล่างขึ้นไป เรียกว่า
เยื่อหนีตติเตดิ่ง (Nictitating Membrane) ส่วนปลาหู ปลานวลจันทร์ทะเล มีเยื่อไขมันเคลือบตาไว้ (Adipose
Eyelid)

หู (Auditory Organ หรือ Inner Ear) ตั้งอยู่ในส่วนหัว เป็นหูชั้นในทำหน้าที่ทรงตัว

ช่องหายใจหรือสไปราเคิล (Spiracle) พบอยู่ด้านหลังตาในปลากระดูกอ่อน เช่น ปลากระเบนและปลา
ฉลามบางชนิด ช่วยในการหายใจ โดยมีช่องเปิดตรงช่องคอให้น้ำไหลผ่านไปยังเหงือก

หนวด (Barbells) ปลาบางชนิดมีหนวดบางชนิดไม่มี เป็นอวัยวะที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อชั้นนอก
(Ectoderm) หนวดทำหน้าที่รับรู้ความรู้สึกสัมผัส และช่วยในการหาอาหาร ปลาที่ไม่มีเกล็ดมีหนวดเจริญ
ดีกว่าปลาที่มีเกล็ด จำนวนคู่ ความยาวและรูปร่างแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา ชื่อของหนวดมักตั้งตาม
ตำแหน่งที่ตั้งเป็นสำคัญ คือ

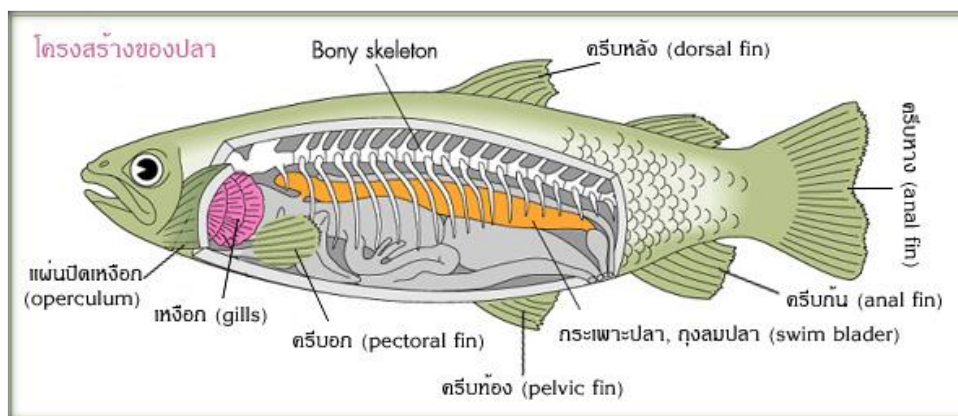
ก. หนวดแมกซิลลารี (Maxillary Barbell) เป็นหนวดคู่ใหญ่ตั้งอยู่บนกระดูกแมกซิลลาของ
ขากรรไกรบน พบในปลาคู ปลากด ปลาเขยง เป็นต้น

ข. หนวดแมนดิเบิล (Mandible หรือ Mandibular Barbell) เป็นคู่ที่อยู่บนกระดูกแมนดิเบิลของ
ขากรรไกรล่าง พบในปลาคู ปลากด ปลาเขยง เป็นต้น

ค. หนวดจะงอยปาก (Snout Barbell) เป็นคู่อยู่ตรงส่วนจะงอยปาก ถ้าอยู่ตรงฐานจมูกเรียกหนวด
จมูก (Nasal Barbell) พบในปลากด เป็นต้น

ง. หนวดบนรอสทรัม (Rostrum barbell) เป็นคู่บนส่วนจะงอยปากตรงร่องระหว่างรอยต่อของ
กระดูกพรีแมกซิลลากับแมกซิลลลา พบในปลาตะเพียนขาว เป็นต้น

จ. หนวดที่คาง (Mental หรือ Chin Barbell) อาจเป็นคู่หรือเส้นเดี่ยวหรือมากกว่า 1 คู่ อยู่บริเวณใต้
คาง พบในปลาจวด ปลาแพะ ปลากอด เป็นต้น



ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะ โครงสร้างของปลา

3. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่

เป็นเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ตั้งอยู่ ระหว่างเส้นรุ้งที่ $15^{\circ} 50'$ ถึง $16^{\circ} 25'$ เหนือ และเส้นแวงที่ $101^{\circ} 15'$ ถึง $101^{\circ} 30'$ ตะวันออก ครอบคลุมแผนที่ลำดับชุด L 7017 มาตราส่วน 1:50,000 หมายเลขระวาง 5241 I 5241 II และ 5240 I มีอาณาเขตทิศเหนือ จดเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว ท้องที่ตำบลนางแดด อำเภอหนองบัวแดง จังหวัดชัยภูมิ อุทยานแห่งชาติตาดหมอก ท้องที่ตำบลนาป่า อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์-ทิสได้ จดพื้นที่เกษตรกรรม ท้องที่ตำบลสระแก้ว อำเภอวังสามพัน จังหวัดเพชรบูรณ์ ตำบลวังทอง อำเภอภักดีชุมพล จังหวัดชัยภูมิ-ทิศตะวันออก จดพื้นที่เกษตรกรรมและป่าธรรมชาติท้องที่ตำบลบ้านเจียง ตำบลแหลมทอง อำเภอภักดีชุมพล ตำบลถ้ำวัวแดง อำเภอหนองบัวแดง จังหวัดชัยภูมิ ทิศตะวันตก จดพื้นที่เกษตรกรรมและป่าธรรมชาติท้องที่ตำบลบ่อไทย ตำบลท่าด้วง อำเภอหนองไผ่ ตำบลตะเบาะ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์

ลักษณะภูมิประเทศ

พื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะ-ห้วยใหญ่ อยู่ตอนบนของเทือกเขาเพชรบูรณ์ ลักษณะภูมิประเทศโดยทั่วไป ประกอบด้วยภูเขาใหญ่น้อยสลับซับซ้อนทั่วทั้งพื้นที่ มีที่ราบตามหุบเขาอยู่บ้าง แต่เป็นบริเวณไม่กว้างนัก พื้นที่ตอนกลางมีลักษณะเป็นแนวสันเขาที่กั้นแบ่งระหว่าง จังหวัดเพชรบูรณ์กับจังหวัดชัยภูมิ ยอดเขาสูงสุดอยู่ทิศตะวันออกเฉียงใต้ของพื้นที่ มีความสูงประมาณ 400 – 1,100 เมตร จากระดับน้ำทะเลปานกลาง ลักษณะทางธรณีสัณฐานเป็นเทือกเขาทางตัวในแนวเหนือใต้ลาดเอียงไปทางทิศตะวันตกของพื้นที่ แนวเขตด้านทิศตะวันออกมีลักษณะเป็นภูเขาหินปูนที่ยกระดับจากพื้นราบ

ลักษณะธรณีวิทยา

ลักษณะทางธรณีวิทยาของพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะ-ห้วยใหญ่ เกือบทั้งหมดเป็นภูเขาหินปูน (limestone) มีหินชั้น (shale) หินทราย (sandstone) และหินกรวดมน (conglomerate) แทรกอยู่บ้าง

โดยเฉพาะพื้นที่ฝั่งตะวันออก ตามแนวรอยต่อระหว่างเทือกเขาหินปูนกับที่ราบซึ่งเป็นแนวรอยเลื่อนย้อน (thrust fault) ตลอดทั้งแนว ลักษณะรอยเลื่อนดังกล่าวเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดลักษณะภูมิประเทศคล้ายคลึงกับแผ่นดินยกตัวสูงขึ้น จึงทำให้เกิดสภาพภูมิประเทศเป็นภูเขาสูงชันถัดจากที่ราบเข้าไป คล้ายคลึงกับภูมิประเทศของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวและอุทยานแห่งชาติไทรทองที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียง หินปูนและหินกรวดเป็นหินที่เกิดในยุคคาบอร์นีฟอรัส ดิโอเนียน และซิลลูเวียน มีอายุอยู่ในช่วง 310-430 ล้านปีมาแล้ว

ลักษณะภูมิอากาศ

เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะ-ห้วยใหญ่ อยู่ภายใต้อิทธิพลของลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ ที่นำพาความแห้งแล้งและหนาวเย็นมาสู่พื้นที่ ในช่วงเดือนตุลาคมถึงกุมภาพันธ์ ลมมรสุมตะวันออกเฉียงใต้ ที่นำพาความร้อนมาสู่พื้นที่ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายน และลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ ที่นำพาความชุ่มชื้นเข้ามาสู่พื้นที่ทำให้เกิดฝนตกอย่างต่อเนื่อง ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงกันยายน พบว่ามีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยรายปี 44.7 มิลลิเมตร ในเดือนกันยายนจะเป็นเดือนที่มีฝนสูงสุด ประมาณ 295 มิลลิเมตร อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย 31.4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย 16.3 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเฉลี่ย 25.6 องศาเซลเซียส

ลักษณะทรัพยากรป่าไม้

สภาพป่าเป็นป่าดิบแล้งผสมกับป่าเต็งรังนอกจากนี้ยังมีสภาพป่าที่เป็นทุ่งหญ้า ซึ่งสภาพเหล่านี้พื้นดินหลังจากที่เคยถูกรายการบุกรุกแผ้วถางและถูกไฟป่าเผาไหม้ ในปัจจุบันมีพืชเบิกนำชนิดต่างๆเกิดขึ้นมากมายเช่น ปอ (*Sterculia vilosa* Roxb.) ตะขบป่า (*Flacourtia rukam* Zoll.) กล้วยป่า (*Musa acuminata* Colla) ประเภทการใช้ประโยชน์ที่ดินในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะ-ห้วยใหญ่ลักษณะทรัพยากรสัตว์ป่า

เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะ-ห้วยใหญ่ มีปัจจัยในการดำรงชีพของสัตว์ป่าตั้งแต่แหล่งที่อยู่อาศัย แหล่งอาหาร และแหล่งน้ำ จึงทำให้มีสัตว์ป่าชนิดต่างๆอาศัยอยู่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะ-ห้วยใหญ่ จังหวัดเพชรบูรณ์และชัยภูมิ จากการสำรวจทรัพยากรสัตว์ป่า พบว่าพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะ-ห้วยใหญ่ เป็นถิ่นที่อยู่อาศัยของสัตว์ป่าไม่น้อยกว่า 150 ชนิด จำแนกเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจำนวน 32 ชนิด สัตว์จำพวกนก 135 ชนิด สัตว์เลื้อยคลาน 16 ชนิด สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 12 ชนิด และสัตว์จำพวกปลาอีก 18 ชนิด ทั้งนี้ได้พบเลียงผาซึ่งเป็นสัตว์ป่าสงวนบริเวณภูเขาหินปูนและถ้ำด้วย เช่น ช้าง (*Elephas maximus*) เก้ง (*Muntiacus muntjak*) กระต๊อง (*Bos gaurus*) เลียงผา (*Capreolus sumatraensis*) หมูป่า (*Selenarctos thibetanus*) ค่าง (*Presbytis cristata*) ฯลฯ สัตว์เลื้อยคลาน เช่น เต่าปูลู (*Platyserpion mrgcephalum*) ตะพาบ (*Trionyx cartilaginius*) ฯลฯ และสัตว์ประเภทจำพวกงูต่างๆ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก เช่น อึ่งปากลวด (*Glyptothorax molossus*) กบทอง (*Rana plicata*) ปาด (*Rhacophorus leucomystex*) และ สัตว์จำพวกนกต่างๆ 120 ชนิดพันธุ์ (จำแนกได้ 35 วงศ์) และนอกจากนี้ยังมีพวกปลาน้ำจืดที่อาศัยอยู่ตามลำห้วยต่างๆในพื้นที่ แมลงต่างๆ เช่น ผีเสื้อ ชนิดพันธุ์ต่างๆซึ่งยังไม่มีมีการสำรวจในทางวิชาการ

4. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ : เทคนิคสำคัญเพื่อการระบุตัวสัตว์ป่า

ดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว ไม่ว่าจะเป็นคน สัตว์ หรือสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวมีความแตกต่างกัน เมื่อนำมาพิจารณาจะพบว่าเป็นลายพิมพ์เหมือนบาร์โค้ด หรือลายพิมพ์นิ้วมือที่ใช้จำแนกความแตกต่างเฉพาะตัว เรียกว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งมีความหมายตรงกับคำศัพท์เทคนิค ได้หลายคำ เช่น **DNA profile, Genetic profile และ DNA fingerprint**

จำนวนดีเอ็นเอทั้งหมดบนโครโมโซมนั้นประกอบด้วย DNA 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนั้นคือยีน (Coding DNA) ซึ่งมีจำนวนร้อยละ 5 ของดีเอ็นเอทั้งหมด ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีความสำคัญต่อกลไกต่างๆ ภายในร่างกาย ส่วนที่ 2 ไม่ใช่ยีน (Non-coding DNA หรือ Junk DNA) มีจำนวนมากถึงร้อยละ 95 เป็นดีเอ็นเอส่วนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจนแต่อาจจะมีความสำคัญต่อกลไก และการทำงานร่วมกันกับดีเอ็นเอส่วนที่เป็นยีน เพียงแต่ในขณะนี้ยังไม่มีการค้นพบว่ากลไกการทำงานเป็นอย่างไร ดีเอ็นเอส่วน **Junk DNA** นี้เปรียบเสมือนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างตัวของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งประยุกต์ใช้กับสัตว์ป่าชนิดต่างๆ ได้

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันคือ มีความหลากหลายมาก (Polymorphism) การศึกษาความหลากหลายนี้ จากตัวอย่างที่เก็บมาได้ เช่น ตัวอย่างเลือด เส้นขน มูล เนื้อสด เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอแล้ว แม้จะมีจำนวนน้อย ก็สามารถนำมาเพิ่มจำนวน โดยทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอตรงบริเวณที่มีท่อนของดีเอ็นเอซ้ำ ๆ กันประมาณ 2-7 เบส ที่มีอยู่หลายชุด เรียกบริเวณนี้ว่า “STR” ย่อมาจาก **Short Tandem-Repeat** ซึ่งมีอยู่หลายที่ หลายตำแหน่ง (ตำแหน่ง = locus) บนสายดีเอ็นเอ STR ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม และนำมาศึกษาลักษณะของจำนวนการซ้ำ ของท่อนดีเอ็นเอแต่ละชุด ในแต่ละตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวได้ และสามารถบ่งบอกถึงข้อมูลพันธุกรรมเฉพาะของสัตว์ป่าแต่ละชนิดได้เพราะสิ่งมีชีวิตมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน (ยกเว้นกรณีฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน)

ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellites) คือเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส เช่น (A)_n, (CA)_n, (TAA)_n เมื่อ n เป็นจำนวนซ้ำ โดยจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง เบสซ้ำชนิดนี้ พบกระจายอยู่ในบริเวณต่าง ๆ ของจีโนมเกินกว่า 100 ตำแหน่ง ความหลากหลายของจำนวนซ้ำที่พบในบริเวณนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้

ขั้นตอนการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

- สกัดดีเอ็นเอ
- เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR โดย Primer ที่ใช้ คือตำแหน่งของ Microsatellites Marker ที่ต้องการศึกษา
- การแยกผลผลิต PCR ที่ได้จากส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ โดยใช้ตัวกลางชนิดโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ซึ่งเป็นตัวกลางที่มีความเข้มข้น 4-6% เพราะในการแยกดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างของเบสเพียง 1 เบสได้ ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 40 วัตต์ นาน 45-60 นาที การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่

เกิดขึ้นได้หลายวิธีเช่น การใช้รังสีสารฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) ที่เรืองแสง และการย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีความไวสูงมากในการตรวจสอบดีเอ็นเอ มีข้อดีที่สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ส่วนการใช้สารฟลูออเรสเซนซ์ จะใช้เครื่องมือ Automate Genetic Sequencer เป็นเครื่องอ่าน ซึ่งวิธีนี้จำเป็นต้องใส่สารฟลูออเรสเซนซ์ที่เรืองแสงนี้ ลงไปใน Primer ของ Microsatellites Marker ด้วย

สรุปได้ว่า เทคนิคเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และเทคนิคการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการระบุตัวสัตว์ป่าในกรณีต่างๆ ได้ เช่น การตรวจสอบความสัมพันธ์ของพ่อแม่-ลูก, การศึกษาจำนวนประชากรของสัตว์ป่า หรือการตรวจสอบระบุตัวสัตว์ป่าในคดีด้านอาชญากรรม สัตว์ป่าที่พบได้อย่างแม่นยำ และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

5. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทวีศักดิ์ (2530) จำแนกปลาที่พบในบริเวณน้ำจืดไว้ 45 วงศ์ บริเวณน้ำกร่อย 55 วงศ์ และในบริเวณน้ำเค็ม 124 วงศ์ กรมประมง (2535) จำแนกปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจออกเป็นปลาทะเล 109 ชนิด ปลาน้ำจืด 106 ชนิด

Monkolprasit และคณะ (1997) ได้รวบรวมรายชื่อปลาในประเทศไทยไว้ทั้งหมด 1,741 ชนิด ใน 171 วงศ์ เป็นปลาที่รายงานว่าพบในแม่น้ำบางปะกง 32 ชนิด 22 วงศ์ และจังหวัดจันทบุรี 218 ชนิด 77 วงศ์

ชัยวุฒิ (2544) ได้ ศึกษาปลาในวงศ์ *Siluridae* ในประเทศไทยพบทั้งสิ้น 11 สกุล 28 ชนิด ได้แก่ *Belodontichthys truncates*, *Ceratoglanis scleronema*, *Hemisilurus mekongensis*, *Kryptopterus bicirrhys*, *K. kryptopterus*, *K. cheveyi*, *K. limpok*, *K. macrocephalus*, *K. palembangensis*, *K. schilbeides*, *Micronema apogon*, *M. bleekeri*, *M. gigantea* n. sp., *Ompok bimaculatus*, *O. leiocanthus*, *O. pabo*, *O. siluroides*, *Pteropercryptis cochinchinensis*, *Silurichthys cauditruncatus* n. sp., *S. indragiriensis*, *S. schneideri*, *Silurodes breviceps* n. sp., *S. eugenaiatus*, *S. hypophthalmus*, *S. longidorsalis* n. sp., *S. vittatus* n. sp., *Wallago attu* และ *Wallagonia leerii* โดยที่มี 5 ชนิดเป็นปลาชนิดใหม่ และรายงานการพบปลา 2 ชนิดเป็นครั้งแรกในประเทศไทยได้แก่ *S. eugenaiatus* จากแม่น้ำโขง จังหวัดนครราชสีมา และ *K. schilbeides* จากแม่น้ำเจ้าพระยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

ศรีจรรยา สุขมนอนมต์ และ สุภาวดี พุ่มพวง(2550)ได้รายงาน การพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์สำหรับปลาดุกอูย (*Clarias macrocephalus*) โดยการสร้างห้องสมุดจีโนมของปลาดุกอูยและคัดเลือกรหัสบาร์ (GT)15 ได้พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอปลาดุกอูยจำนวน 2,841 โคลน ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 173 โคลน พบว่า 41 โคลนมีไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ โดยสามารถจำแนกประเภทของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอได้เป็น perfect, imperfect และ compound repeat ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะพบไมโครแซทเทลไลต์ประเภท perfect repeat(61.36%) และมีเบสซ้ำชนิด di-nucleotide มากที่สุด และสามารถ

ออกแบบไพรเมอร์ได้จำนวน 23 คู่ ซึ่งพบว่า ไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ มีความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ โดยมีจำนวนอัลลิลอยู่ระหว่าง 2-13 อัลลิล และมีค่า observed heterozygosity อยู่ในช่วง 0.10-0.80 ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถนำไปใช้ ศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและสร้างแผนที่โครโมโซมของปลาตุ๊กตต่อไปได้

ศิริภาวี เจริญวัฒนศักดิ์และคณะ(2551) ได้รายงาน การพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์สำหรับปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) จากห้องสมุดจีโนมของปลาหมอไทยโดยใช้ไบโอไทน์ไลโปรบ (biotinylated probe) ในการคัดแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ 7 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย (AC)¹⁰ (TC)¹⁰ (CC)¹⁰ (TAT)¹⁰ (TAC)¹⁰ (CAA)¹⁰ และ (CAG)¹⁰ สามารถคัดเลือกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์แทรกอยู่ได้จำนวน 4 โคลน ได้แก่ Clone G2F, 54R, D3F และ D6F สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ จำนวน 6 คู่ คือ CP1, CP3, CP17, CP4, CP6 และ CP18 ทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอของปลาหมอไทย พบว่า ได้ขนาดของเบนด์ที่ 151-200, 200-249, 249-311, 118-140, 151-311 และ 151-200 bp ตามลำดับ ไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์ที่พัฒนาได้สามารถนำไปใช้ร่วมกับไพรเมอร์สำหรับปลาชนิดอื่นๆ ได้ เพื่อใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาหมอไทยและปลาในสกุลอื่นได้เป็นอย่างดี

Roberts (1992 b) ศึกษาพบความแตกต่างว่า ปลาแขยงข้างลายของไทยมีปนอยู่รวมกันทั้งสิ้น 4 ชนิด คือ *Mystus atrifasciatus*, *M. multiradiatus*, *M. mysticetus* และ *M. rhegma* โดย 2 ชนิดหลังเป็นการรายงานครั้งแรกที่พบในประเทศไทย สำหรับชนิด *M. vittatus* เดิมมีการรายงานว่าเป็นปลาแขยงข้างลาย โดยใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *M. vittatus* รูปร่าง และลักษณะสัณฐานทั้ง 4 ชนิด ที่พบในประเทศไทย Roberts (1992 b) ยืนยันว่าพบในประเทศอินเดียเท่านั้น ต่อมา Roberts (1994 a) ศึกษาปลาในสกุล *Mystus* ในเขตเอเชียพบว่าทั้งหมด 8 ชนิด และรายงานชนิดใหม่จากประเทศไทย และกัมพูชา ได้แก่ *Mystus albolineatus* พบแพร่กระจายในแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำบางปะกง และแม่น้ำโขงตอนล่างในกัมพูชา ภาสกร (2544) ศึกษาปลาวงศ์ *Bagridae* ในประเทศไทยพบทั้งสิ้น 7 สกุล 25 ชนิด ได้แก่ *Bagrichthys macropterus*, *B. micracanthus*, *Batasio blythi*, *Hemidagrus filamentus*, *H. mekongensis* n. sp. , *H. microphthalmus*, *H. nemurus*, *H. elegans* n. sp. , *H. wycki*, *Leiocassis micropogon*, *L. poecilopterus*, *L. siamensis*, *L. stenomus*, *Mystus atrifasciatus*, *M. bocourti*, *M. cavasius*, *M. gulio*, *M. micracanthus*, *M. multiradiatus*, *M. mysticetus*, *M. rhegma*, *M. singaringan*, *M. wolffi*, *Ritasacerbotum* และ *Sperata acicularis* โดยพบปลา 2 ชนิดใหม่ในสกุล *Hemibagrus* และได้รายงานว่ามีปลา 2 ชนิดนี้คือ *Leiocassis micropogon* และ *Ritasacerbotum* เป็นครั้งแรกในประเทศไทย

Nayyar (1966) รายงานที่เกี่ยวข้องการศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์ของปลาช่อนเงาะ *Channa marulius* ซึ่งมีโครโมโซม $2n=40$ ปลาช่อน *Channa striata* มีโครโมโซม $2n=40$ ปลาช่อน *Channa punctatus* มีโครโมโซม $2n=34$

จากรายงานการวิจัยต่างๆที่กล่าวข้างต้น ผู้วิจัยเห็นว่า ยังไม่มีรายงานที่เกี่ยวกับการศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาร์โบไฮเดรตของปลาทั้ง ถึงแม้จะมีการศึกษากันอยู่บ้าง แต่ก็ยังเป็นปลากุ้ง ที่มีถิ่นกำเนิดและสภาพแวดล้อมที่ผิดแผกแตกต่างกับปลาที่พบในพื้นที่วิจัย จึงอาจทำให้จำนวนโครโมโซมและคาร์โบไฮเดรตผิดแผกแตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาร์โบไฮเดรตของปลาทั้ง ใน จุดเก็บตัวอย่างในพื้นที่วิจัย จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาค้นคว้าวิจัยเป็นอย่างยิ่ง ผลที่ได้จากการศึกษาจะทำให้ทราบข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในด้านการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป

บทที่ 3

วิธีการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยการพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรมอร์สำหรับการเพาะเลี้ยงปลากัง (Channa limbata) เพื่อการอนุรักษ์และเชิงเศรษฐกิจ แบ่งการวิจัยเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาโครโมโซมและคาร์ิโอไทป์ของปลากัง ใน จุดเก็บตัวอย่าง ในพื้นที่วิจัย

ขั้นตอนที่ 2 พัฒนาพีซีอาร์ไพรมอร์สำหรับการศึกษาความผันแปรของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอสำหรับปลากัง

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาโครโมโซมและคาร์ิโอไทป์ของปลากัง

1.1 การดำเนินงานในห้องปฏิบัติการเพื่อ ศึกษาโครโมโซมและคาร์ิโอไทป์ของปลากัง ใน จุดเก็บตัวอย่าง ในพื้นที่วิจัย

ได้ดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ (หน่วยปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า, 2557.) ได้ดำเนินการและวิเคราะห์ผลดังนี้

นำดีเอ็นเอทั้งหมด (genomic DNA) ที่สกัดได้จากตัวอย่างที่เก็บมา ใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำมาปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสในชิ้นส่วนของยีน Cyt.b โดยใช้คู่ไพรมอร์ L14724/H15149 ใช้โปรแกรมที่มีอุณหภูมิตามขั้นตอน denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่ 53 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาทำเจลลีโอและองค์ประกอบอื่นๆที่ปนเปื้อนออกโดยชุด Nucleic Acid Purification Kit โดยชิ้นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์นี้จะนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งผลลำดับของนิวคลีโอไทด์ แต่ละตัวอย่าง ถูกนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลสากล (NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>))

1.2 เก็บรวบรวมตัวอย่างจากครีปปลากัง จาก 4 จุดเก็บตัวอย่าง ในพื้นที่วิจัย (ดังในภาพที่ 3.1) จุดละ 17 ตัวรวมทั้งสิ้น 68 ตัว



ภาพที่ 3.1 แสดงจุดเก็บตัวอย่างในการสำรวจลักษณะทางภูมิศาสตร์ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและหัวขี้ใหญ่อำเภอเมืองจังหวัดเพชรบูรณ์

อุปกรณ์และวิธีการ

ปลากั้งที่นำมาใช้ในการศึกษาได้มาจาก 4 จุดเก็บตัวอย่าง ในพื้นที่วิจัย (ดังในภาพที่ 3.1) จุดละ 17 ตัวรวมทั้งสิ้น 68 ตัว นำเอาปลาดังกล่าวกลับมาเลี้ยงไว้ในบ่อซีเมนต์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 เซนติเมตร บรรจุน้ำสูง 30 เซนติเมตรที่สถานเพาะพันธุ์ปลาโดยใช้ไส้เดือนเป็นอาหาร และห้องปฏิบัติการของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ (ดังภาพในภาคผนวกที่ 1)

-นำเอาปลากั้งที่สุ่มจับจากจุดเก็บตัวอย่าง จุดละ 17 ตัวไปศึกษาโครโมโซมโดยฉีดโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เข้าที่ก้นน้ำเหนือบริเวณฐานครีบล้าง จำนวน 0.04 มิลลิลิตรต่อความยาวมาตรฐาน 20 เซนติเมตรที่บริเวณก้นน้ำเหนือได้ฐานครีบล้างเพื่อให้โคลชิซินไปทำลายสายสปินเดิล(spindle fiber) ทำให้การแบ่งเซลล์หยุดอยู่ที่ระยะเมตาเฟส

-นำเอาปลากั้งที่ฉีดด้วยโคลชิซินแล้วไปปล่อยไว้ในบ่อซีเมนต์เพื่อให้ออกซิเจน ปล่อยปลาที่ฉีดไว้เป็นระยะเวลา 7-9 ชั่วโมง

-นำปลากั้งขึ้นมาผ่าตัดเอาไตสับออกเป็นชิ้นเล็กๆ แช่ลงในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.0057 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 20 นาที แล้วจึงฟiksด้วยน้ำยาของสภาพ(fixative) ซึ่งประกอบด้วยเกลเซียลอะซีติกแอซิด (glacial acetic acid) 1 ส่วน ผสมกับแอ็บโซลูทเอทิลแอลกอฮอล์ 3 ส่วน (ดัดแปลงมาจาก Ida and Kyo, 1980)

-นำเอาเซลล์ที่ผ่านกระบวนการฟiksและปั่นให้เซลล์แตกกระจายแล้วหยดลงบนสไลด์ให้แห้ง นำเอาสไลด์ที่เซลล์แห้งแล้วไปย้อมด้วยสีย้อมกิมซ่า

-นำสไลด์ที่เตรียมเสร็จแล้วไปตรวจดูโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เลือหาเซลล์ที่มีโครโมโซมแผ่กระจายดี บันทึกภาพโครโมโซมไว้และขยายให้มีขนาดโตขึ้น นำภาพที่อีกขยายแล้วมาตรวจนับจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ของปลาปลากั้ง (ดังภาพในภาคผนวกที่ 2)

-วัดความยาวแขนโครโมโซมจากภาพที่ขยายโตด้วยคาลิเปอร์ หาอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น แล้วนำมาจัดคาร์ิโอไทป์ และตั้งชื่อชนิดของโครโมโซม(ดัดแปลงมาจาก Levan et al., 1964)

ขั้นตอนที่ 2 พัฒนาพีซีอาร์ไพรเมอร์สำหรับการศึกษาความผันแปรของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโทคอนเดรียไลต์ ดีเอ็นเอ สำหรับปลากั้ง

อุปกรณ์และวิธีการ (ดัดแปลงจาก นภาพร ศรีพุดนิพนธ์และคณะ, 2551)

ดำเนินการรวบรวมตัวอย่างปลากั้ง จากแหล่งน้ำในจุดเก็บตัวอย่างในพื้นที่วิจัย โดยรวบรวมตัวอย่างครีบ และเนื้อเยื่อ เก็บรักษาไว้ในเอทานอล 99.85% แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเตรียมการวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิธีพัฒนาพีซีอาร์ไพรเมอร์สำหรับการศึกษาความผันแปรของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโทคอนเดรียไลทีดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

2.1 สกัดดีเอ็นเอ (Genomic DNA extraction)

- ตัดแบ่งส่วนของเนื้อเยื่อปลากั้ง จากตัวอย่าง 1 ตัวตามปริมาณที่ต้องการ (ประมาณ 50 mg) บดเนื้อเยื่อให้ละเอียด นำไปใส่ใน 10 ml extraction buffer (100 mM Tris-Cl, pH 8; 250 mM NaCl; 1 % SDS และ 100 ug/ml Proteinase K

- นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

- เติมน้ำ buffered phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1) 10 ml

- ค่อยๆ เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลาประมาณ 10 นาที

- นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใสหลอดใหม่ เติมน้ำ chloroform/ isoamyl alcohol (24:1) 10 ml

- เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันประมาณ 20 นาที

- นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 x g เป็นเวลา 10 นาที

- ดูดส่วนใสด้านบนใสหลอดใหม่(แล้วทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้ง)

- เติมน้ำ 95 % ethanol ที่แช่เย็น 20 ml ลงไปผสมกับส่วนใสที่ได้ ตะเคียงหลอดไปมา หลังจากนั้นทิ้งส่วนใสไปเหลือแต่ก้อนดีเอ็นเอ

- เติมน้ำ 70 % ethanol 500 ml ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 x g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งและปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง

- ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8) 500 ul และนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 50-60 °C จนกระทั่งดีเอ็นเอละลายหมด

2.2 ตัดดีเอ็นเอ (DNA fragment preparation and Adaptor ligated)

- นำดีเอ็นเอที่สกัดแล้วประมาณ 500 ng ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Tru 91 หรือ MseI และทำปฏิกิริยาการต่อปลายดีเอ็นเอด้วย MseI-Adaptor โดยเอนไซม์ T ligase ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาประมาณ 7-8 ชั่วโมง

- นำดีเอ็นเอมาเจือจางโดยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (Ultrapure water) ประมาณ 10-20 เท่า จากนั้นนำมาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยชิ้นดีเอ็นเอเริ่มต้นสามารถเกาะกับ adaptor ที่ต่อกับชิ้นดีเอ็นเอ และทำการเพิ่มเบสที่ใช้ในการคัดเลือกเข้าไปด้าน 3'-end อีก 1 เบส

2.3 เอ็นริชเมนต์ (Enrichment)

- นำ biotinylated oligo SSR probes จำนวน 6 ชนิด คือ (AG)₁₀, (TG)₁₀, (TAC)₁₀, (CAA)₁₀, (CAG)₁₀ และ (GAT)₁₀ มาเชื่อมต่อกับปลาย 5' ของสายดีเอ็นเอที่เตรียมไว้แต่ละเส้น โดยก่อนทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อนี้จะต้องนำแต่ละ biotinylated oligo SSR ไปรวมกับ streptavidin Magnetic Sphere Paramagnetic Particles (SA-PMPs) จำนวน 1 ml ซึ่ง streptavidin จะเข้าเกาะกับ biotin โดยมีปลายข้างหนึ่งติดกับ magnetic particle มีคุณสมบัติเป็นแม่เหล็ก ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง

- ล้างด้วย 5X SSC 2 ครั้ง โดยใช้ Magnetic Sphere Magnetic Separation Stands (MS-MSS) ซึ่งเป็นแท่งแม่เหล็กในการยึดเหนี่ยว biotinylated oligo SSR ที่เกาะอยู่กับ streptavidin

- เสร็จแล้วล้าง biotinylated oligo SSR ส่วนเกินทิ้งไปแล้วจึงนำส่วนที่ต้องการไป hybridize กับสายดีเอ็นเอต่อไป (โดยปริมาณของ probe/DNA fragments ที่ใช้คือ 10 pmol/1.0 pmol. ในขั้นตอนการผสมต้องเพิ่มอุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วรีบบางบนน้ำแข็งทันที แล้วจึงค่อยผสมกันโดยปรับสภาพของปฏิกิริยาให้มีความเข้มข้นของ SSC ที่ 6X อุณหภูมิที่ใช้ขึ้นอยู่กับ melting temperature ของ probe โดย (AG)₁₀ และ (TG)₁₀ ใช้อุณหภูมิ 55°C สำหรับ (TAC)₁₀, (CAA)₁₀, (CAG)₁₀ และ (GAT)₁₀ ใช้อุณหภูมิ 65°C (โดยให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นประมาณ 10-12 ชั่วโมง)

- คัดเลือกเฉพาะดีเอ็นเอที่เกาะอยู่กับ streptavidin-biotinylated oligo SSR complex โดยใช้ MS-MSS จึงให้ดีเอ็นเอที่ต้องการมาติดข้างหลอด โดยแยกส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไป

- ล้างด้วย low stringency solution ตามด้วย high stringency solution (เพื่อกำจัดดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ต้องการบางส่วนที่ติดมาทิ้งและทำให้ดีเอ็นเอสะอาด)

- ทำการแยกดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก streptavidin-biotinylated oligo SSR complex โดยใส่ 0.15 N NaOH

- ตั้งวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

- ใช้ MS-MSS ค้าง streptavidin-biotinylated oligo SSR complex มาอยู่ข้างหลอดแล้วดึงของเหลวทั้งหมดมาใส่หลอดใหม่เพื่อทำให้เป็นกลางโดยเติม 1 N acetic acid และ TE buffer ลงไป

- ล้างดีเอ็นเอที่ได้ให้สะอาดโดยใช้ High Pure PCR isolation kit (Boehringer)

2.4 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Amplification)

ดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอน 2.2.4 เป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวซึ่งไม่สามารถนำไปเชื่อมต่อกับ พลาสมิดได้ จึงต้องนำไปผ่านขั้นตอนพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ MseI (5'GAT GAG TCC TGA GTA ANNN3') ((เพิ่ม PCR condition ให้เป็นดีเอ็นเอสายคู่)

- นำไปตกตะกอนด้วย 1/10 V. NaOAc pH 5.2 และ 2 V. 95% EtOH
- ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที
- ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% EtOH 2 ครั้ง
- ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยผึ่งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- เติมน้ำเพื่อละลายและนำไปวัดปริมาณด้วย spectrophotometer

2.5 สร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ (Library construction) มีขั้นตอนดังนี้

- นำดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega) ซึ่งมีขนาดประมาณ 3 kb ความเข้มข้น 50 ng/ul ในอัตราส่วนดีเอ็นเอ : เวกเตอร์ คือ 3:1 โดยมีสูตรการคำนวณปริมาณการใช้ดีเอ็นเอ ดังนี้

$$\text{ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้} = \frac{\text{ขนาดดีเอ็นเอ (Kb)}}{\text{ขนาดเวกเตอร์ (Kb)}} \times \frac{\text{ปริมาณเวกเตอร์}}{1} \times 3$$

(ในปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ul ประกอบด้วยเวกเตอร์ pGEM-T Easy 25 ng, 2X Rapid Ligation buffer 5 ul, เอ็มไซม์ T4 ligase 3 weiss unit และดีเอ็นเอตามปริมาณที่คำนวณได้จากสูตร)

- นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา ประมาณ 12 ชั่วโมง
- หลังจากนั้นก็ทำการ transformation ด้วยวิธี electroporation โดยใช้ *E. coli* strain DH10B เป็น host แล้ว
- นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เป็น selective media (ampicillin 100 ug/ml, IPTG 100 uM และ x-gal 40 ug/ml) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเป็นเวลา ประมาณ 12 ชั่วโมง (โคโลนีสีขาวแสดงว่ามีสายดีเอ็นเอแทรกอยู่)
- นำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดย ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ primer M 13 โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิ ดังนี้คือ 94°C 3 นาที 1 รอบ, 94°C 30 วินาที, 55°C 30 วินาที, 72°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72°C 5 นาที 1 รอบ
- นำไปทำ electrophoresis เปรียบเทียบกับ control ซึ่งเป็น Blue colony และ molecular weight marker หลังจากนั้นก็เลือกเฉพาะ โคโลนีสีขาวที่มีดีเอ็นเอขนาดมากกว่า 500 bp ขึ้นไป เพื่อไปทำการ คัดเลือกโคโลนีที่มีโมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ ในขั้นตอนต่อไป

2.6 การคัดเลือกโคลนที่ต้องการใช้โดยวิธี Colony hybridization

- นำโพรบ DIG-labeled oligo SSR ที่ใช้ประกอบด้วย (AG)₁₀, (TG)₁₀, (TAC)₁₀, (TAT)₁₀, (CAA)₁₀, (CAG)₁₀, (GAT)₁₀ และ (CCA)₁₀ ไปผสมกับดีเอ็นเอของแต่ละ โคลนซึ่งผ่านการ lysis และ denature ให้อยู่บนแผ่น membrane filter ใน hybridization solution โดยใช้อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลาประมาณ 10-16 ชั่วโมง

- ตรวจสอบผลโดยวิธี chemiluminescence detection (Boehringer) เพื่อคัดเลือกโคลนที่ต้องการ

2.7 การหาลำดับเบส (Sequencing)

- เลี้ยงโคลนที่ต้องการในอาหารเหลวที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 ug/ml) 1 ml ที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 3-5 ชั่วโมง

- นำ cell culture ที่ได้ไปทำพีซีอาร์ในปริมาณ 20 μ l ประกอบด้วย 0.25 μ M ของ M13 primer (Forward และ REverse), 100 μ M dNTPs, PCR buffer (100 mM Tris-HCL (pH 9.0), 500mM KCL, 1.5 mM MgCl₂) และ 1 u Taq DNA polymerase

- ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง GeneAmp^R PCR System 9700 (Applied Biosystems) โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้คือ 94°C 3 นาที 1 รอบ, 94°C 30 วินาที, 55°C 30 วินาที, 72°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72°C 5 นาที 1 รอบ

- นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค dye terminator cycle sequencing (Lee *et al*, 1997) และวิเคราะห์ผลด้วย ABI PRISM 377 DNA sequencer (PE biosystem)

2.8 การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)

- เลือกสายดีเอ็นเอที่มีไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอแต่ตำแหน่งจะต้องมีจำนวนของชุดเบสซ้ำ ≤ 6 , 4 และ 3 สำหรับได-, ไตร- และเตตระนิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ (Stalling *et al.*, 1991) มาออกแบบไพรเมอร์ (ใช้โปรแกรมผ่านทาง <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>)

- กำหนดให้ส่วนที่เป็นไพรเมอร์อยู่ห่างจากส่วนที่เป็น SSR ประมาณ 30-50 เบส หรือในดีเอ็นเอบางสายสั้นกว่าแต่ต้องไม่สั้นกว่าความยาวของไพรเมอร์ และในบริเวณนั้นไม่พบเบสที่เรียงตัวซ้ำเกิน 3 ตัว

2.9 การหาความเหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR optimization)

- นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทดสอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอและดีเอ็นเอปลาทัง ที่ได้ใช้ในช่วงตอนแรก โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (5 μ l) (ดีเอ็นเอเริ่มต้น 5 ng, ไพรเมอร์ (Forward and Reverse) สายละ 0.25 pmol, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 500 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 100 uM dNTPs และเอ็นไซม์ Taq DNA polymerase 0.2 unit)

- นำไปใส่ในเครื่องพีซีอาร์โดยกำหนดโปรแกรมดังนี้ 94 °C 3 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 94 °C 30 วินาที, อุณหภูมิในการ annealing (T_A) 30 วินาที และ 72 °C 1 นาที

- เติม loading dye (99% formamide, 10mM NaOH, 0.1% bromophenol blue, 0.1% Xylene cyanol FF) ปริมาตร 5 μ l

- นำไปแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะคริลาไมด์เจล (acrylamide gel) ในบัฟเฟอร์ TBE โดยใช้ sequencing gel apparatus (Biorad, USA) ขนาด 30x40 เซนติเมตร ที่ระดับกระแสไฟฟ้า 50 วัตต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

- อ่านขนาดโดยเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน (10bp DNA ladder; Invitrogen) หลังจากย้อมเจลด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Cyber Gold[®]) และอ่านผ่านเครื่องอ่านเจล (FluorChem 8000, Alpha Innotech Corp.)

- ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

2.10 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไพรเมอร์สำหรับใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของปลากัง โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างปลากัง ที่รวบรวมจากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 4 จุดของพื้นที่วิจัย จำนวน 68 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ที่พัฒนาได้และประเมินค่าทางพันธุศาสตร์ประชากร ได้แก่ ค่าจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง ค่า allele richness และค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) โดยใช้โปรแกรม FSTAT (Goudet, 2001) พร้อมทั้งทดสอบความถี่ของจีโนไทป์ในแต่ละตำแหน่งของแต่ละประชากรว่ามีความเบี่ยงเบนไปจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) หรือไม่ โดยการประมาณค่า exact p -value โดยใช้วิธี Markov chain ตามวิธีการของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization: 1000, Iterations per batch: 1000) โดยใช้โปรแกรม GENEPOP Version 3.3 (Raymond and Rousset, 1995) และปรับระดับความน่าจะเป็น (p -value) สำหรับการใช้ข้อมูลชุดเดิมวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple test) (ดัดแปลงจาก Bonferroni correction (Hochberg, 1998; Rice, 1989))

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของปลากั้งใน จุดเก็บตัวอย่าง ในพื้นที่วิจัย

4.1.1 ผลการศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของปลากั้ง พบว่า จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของตัวอย่างชิ้นเนื้อ รหัสตัวอย่าง 57DAT-34-02 กับลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBIพบว่า ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่สำรวจครั้งนี้ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลากั้ง (*Channa limbata*) Accession number AB 499919 มากที่สุด (ดังภาคผนวกที่ 1,2 และ 3)

4.1.2 ผลการศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของปลากั้งที่นำมาใช้ในการศึกษาได้มาจาก 4 จุดเก็บตัวอย่าง ในพื้นที่วิจัย ผลปรากฏดังนี้ (ตารางที่ 4.1, 4.2 และ ภาพในภาคผนวกที่ 2 ซึ่ง A แสดง $2n=112$, B แสดง คาริโอไทป์)

- ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=44$ คาริโอไทป์ประกอบด้วย โครโมโซมแบบเมตาเซนตริก (metacentric หรือ m) 1 คู่ แบบสับเมตาเซนตริก (submeracentric หรือ sm) 1 คู่ แบบอะโครเซนตริก (acrocentric หรือ t) 20 คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (arm number หรือ FN) เท่ากับ 48

- ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=44$ คาริโอไทป์ประกอบด้วย โครโมโซม แบบเมตาเซนตริก 2 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก (subtelocentric หรือ st) 2 คู่ แบบอะโครเซนตริก 18 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 48 ตามตารางที่ 2

- ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=44$ คาริโอไทป์ประกอบด้วย โครโมโซมแบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ แบบอะโครเซนตริก 21 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 46

- ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=48$ คาริโอไทป์ประกอบด้วย โครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 1 คู่ แบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 1 คู่ แบบอะโครเซนตริก 19 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 48

- ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 มีจำนวนโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 2 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 1 คู่ แบบอะโครเซนตริก 53 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 116

ตารางที่ 4.1 แสดง ความถี่ผิดพลาดในการกระจายของโครโมโซม ในระยะเมตาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ซึ่งนับได้จากเซลล์แต่ละเซลล์ของปลากั้งจุด1 ปลากั้งจุด2 ปลากั้งจุด 3 และปลากั้งจุด4

ชื่อปลา	จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์												
	42	43	44	45	46	47	48	49	-x-	107	108	109	110
ปลากั้งจุด1	1	0	58	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ปลากั้งจุด2	0	0	0	1	1	1	60	0	0	0	0	0	0
ปลากั้งจุด3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2
ปลากั้งจุด4	1	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

-x- หมายถึง จำนวนตั้งแต่ 50 –106

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) คาร์ิโอไทป์ และจำนวนแขนโครโมโซมของปลากั้งจากจุด1 ปลากั้งจากจุด2 ปลากั้งจากจุด 3 และปลากั้งจากจุด 4

ชื่อปลา	2n	โครโมโซมแบบดิพลอยด์				จำนวนแขนโครโมโซม
		เมตาเซนตริก	ลัมโบเมตาเซนตริก	ลัมบิโทเซนตริก	อะโครเซนตริก	
ปลากั้งจุด1	44	1	1	0	20	48
ปลากั้งจุด2	44	2	0	2	18	48
ปลากั้งจุด3	48	0	1	0	21	48
ปลากั้งจุด4	44	1	1	1	19	48
รวม	180	4	3	3	78	192

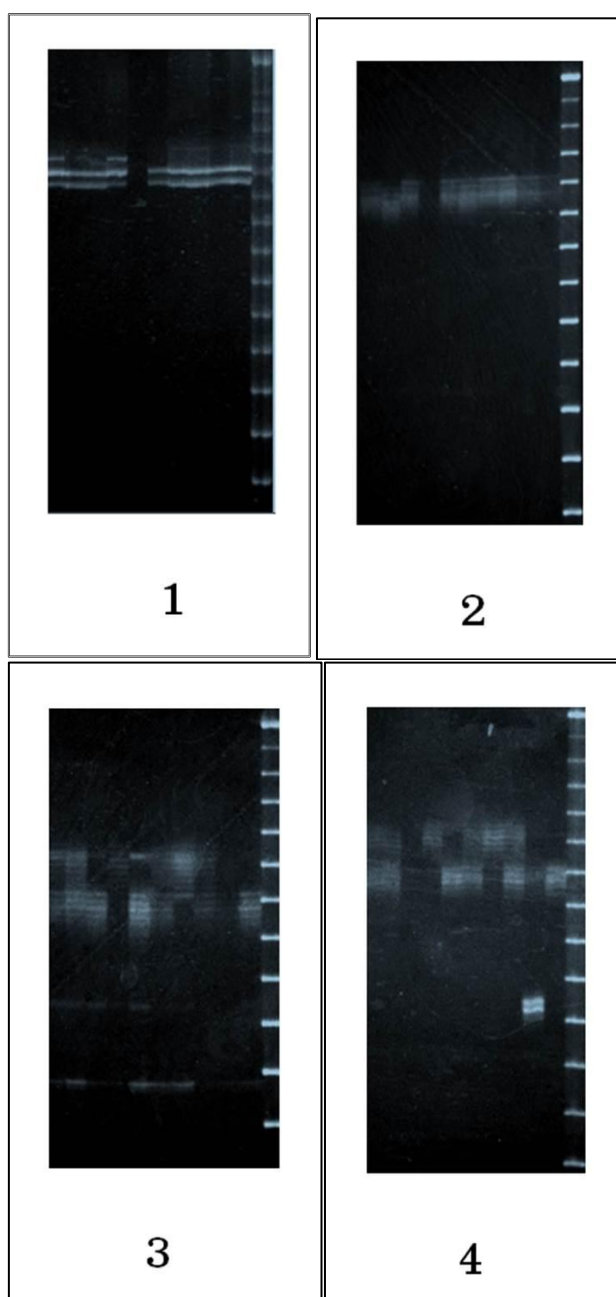
4.2 ผลการ พัฒนาพีซีอาร์ไพรเมอร์สำหรับการศึกษาความผันแปรของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอสำหรับปลากัง

ผลการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละตำแหน่ง ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอ, การตัดดีเอ็นเอ, การเอ็นริชเมนต์ (Enrichment), การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ, การสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ (Library construction), การคัดเลือกโคลนที่ต้องการใช้, การหาลำดับเบส (Sequencing), การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design) และการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ มี ดังนี้

ผลจากการออกแบบไพรเมอร์ของปลากังในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของปลากังจำนวน 385 โคลน เมื่อทำการหาลำดับเบสแล้วพบว่ามี 72 โคลนที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ หรือคิดเป็น 18.76% เมื่อนำไปหาลำดับเบสพบโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบ จำนวน 28 ตำแหน่ง การจำแนกได้เป็นแบบไดนิวคลีโอไทด์จำนวน 4 ตำแหน่ง โดยมีจำนวนชุดซ้ำของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 3-51 ชุด และแบบไตรนิวคลีโอไทด์จำนวน 1 ตำแหน่งมีจำนวนชุดซ้ำของดีเอ็นเอ 18 ชุด และจากจำนวน 28 โคลนนี้สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ได้ 10 คู่ ซึ่งเมื่อนำไปตรวจสอบความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ในปลากังจากธรรมชาติ พบว่าไพรเมอร์ 5 คู่ (DTLOm2, DTLOm 4, DTLOm 6, DTLOm 12 และ DTLOm 13) มีความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (polymorphic) (ตารางที่ 4.1) สำหรับคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ได้ แต่ไม่ชัดเจนหรือเกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะนั้น ได้ทำการปรับเพิ่มหรือลดอุณหภูมิในการ annealing และ/หรือปรับปริมาณ MgCl₂ และดีเอ็นเอต้นแบบจนได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ชัดเจนขึ้น ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์, อุณหภูมิในการ annealing (T_A), Clone และส่วนประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ แสดงในตารางที่ 4.4 ส่วนรูปแบบอัลลิล (banding pattern) แสดงไว้ในตารางที่ 4.3 และ (ดังภาพที่ 4.4)

ตารางที่ 4.3 แสดงประสิทธิภาพของการพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ด้วยวิธีการเอ็นริชเมนต์ (Enrichment)

จำนวนทั้งหมด ของ Clones	Positive Clones	เปอร์เซ็นต์ของ Clones		
		ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ	positive	ไพรเมอร์
385	72	38.88(28.7%)	18.76(72/385)	35.72(10.29)



ภาพที่ 4.4 แสดง รูปแบบของอัลลีลในไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งต่างๆ จากการวิเคราะห์ตัวอย่างปลากั้งจากพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่ (ปลาจากจุดเก็บตัวอย่างที่1-4)

ตารางที่ 4.5 แสดงลำดับของนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์, Annealing Temperature (T_A), Clone และส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์	Clone	PCR Condition			
			Annealing Temperature (องศาเซลเซียส)	Number of Cycle (cycles)	Mg Clone (mm)	dNTPs (μ M)
DTLOm2,	F:GGGAAAATTATTGTCGCAAG R:GGACATGGACAGTGAGACTCAGG	Om-6/T	60	35	1.5	100
DTLOm 4,	F:TCAGCACAAGAAAAATCAATGCAG R:ATGTCCCAGCACACAAACAGC	Om-12B/1	60	35	1.5	100
DTLOm 6,	F:TTAGCCCTTGTTGTTTTGCCTTC R:ACAGCGGGACTAGCTCTGGAC	Om-12E/1	60	40	2.5	100
DTLOm 12	F:ACCTAAAGCATGACCAGGAGACC R:ACCTAAAGCATGACCAGGAGACC	Om-5E/1	60	60	2.5	100
DTLOm 13	F:CCAGAAGAACATTACTGGGCTG R:GGGCACTATATCTTCACCATGTC	Om-8D/1	65	65	2.5	100

ตารางที่ 4.5 แสดงลำดับของนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์, Annealing Temperature (T_A), ลำดับเบสแกน ขนาดของผลผลิต PCR, จำนวนอัลลิล, ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิติ (H_o), ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิติจากค่าคาดหวัง (H_e) ของไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 5 ตำแหน่ง

ตำแหน่ง	ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์	T_A	ลำดับเบส แกน	ขนาด ของ ผล ผลิต PCR (หรือ bp)	H_o	H_e	จำนวน อัล ลิล
DTLOm2,	F:GGGAAAATTATTGTCGCAAG R:GGACATGGACAGTGAGACTC AGG	60	(GTA) ₁₈	228- 233	0.0475	0.0471	2
DTLOm 4,	F:TCAGCACAAGAAAAATCAAT GCAG R:ATGTCCCAGCACACAAACAG C	60	(TG) ₄ CG (TG) ₉	267- 281	0.2127	0.6737	5
DTLOm 6	F:TTAGCCCTTGTTGTTTTGCCT TC R:ACAGCGGGACTAGCTCTGGA C	60	(TG) ₂₂ CG (TG) ₉	281- 293	0.9765	0.6738	5
DTLOm 12	F:ACCTAAAGCATGACCAGGAG ACC R:ACCTAAAGCATGACCAGGAG ACC	60	AG(TG) ₂₂ AG (TG) ₉ AG (TG) ₇	231- 281	0.9251	0.8386	9
DTLOm 13	F:CCAGAAGAACATTACTGGGC TG R:GGGCACTATATCTTCACCAT TGC	65	(TG) ₃₁	229- 281	1.0001	0.9003	13

บทที่ 5 สรุปผลอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผล

การศึกษาค้างนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครโมโซมของปลากั้งในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่ การเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาคัดแปลงมาจากวิธีของ Ida and Kyo,(1980) วิธีของ Denton, (1973) วิธีของ UwaandOjima,(1981) การจำแนกโครโมโซมถือเอาตามวิธีของ Levan et al.,(1964) ผลการศึกษาพบว่า - ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=44$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก (metacentric หรือ m) 1 คู่ แบบสับเมตาเซนตริก (submeracentric หรือ sm) 1 คู่ แบบอะโครเซนตริก (acrocentric หรือ i) 20 คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (arm number หรือ FN) เท่ากับ 48

-ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=44$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซม แบบเมตาเซนตริก 2 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก (subtelocentric หรือ st) 2 คู่ แบบอะโครเซนตริก 18 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 48

-ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=44$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ แบบอะโครเซนตริก 21 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 46

-ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=48$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 1 คู่ แบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 1 คู่ แบบอะโครเซนตริก 19 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 48 ปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 มีจำนวนโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 2 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 1 คู่ แบบอะโครเซนตริก 53 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 116

จากพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรมอร์สำหรับปลากั้งได้จำนวน 10 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณ ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอได้ 5 คู่ และเป็นไพรมอร์ที่มีความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (polymorphic) จำนวน 5 คู่ ได้แก่ DTLOm 2, DTLOm4, DTLOm6 , DTLOm 12 และ DTLOm 13

จากการตรวจสอบจำนวนและขนาดอัลลีลในปลากั้ง 54 ตัวอย่าง พบความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งมีค่าอยู่ระหว่าง 2-14 อัลลีล จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งของประชากรปลากั้งเท่ากับ 7 ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตีมีค่าระหว่าง 0.0476-1.000 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.6300 และค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตีส่วนใหญ่มีค่าสูงกว่าค่าคาดหวัง แสดงถึงการเกิด Heterozygosity excess ในประชากรปลากั้ง ซึ่งมีสาเหตุมาจากประชากรเคยเกิดสถานะการลดลงอย่างรุนแรงของพ่อแม่พันธุ์ (Bottle neck) เริ่มต้น (effective population size) ใน 2-3 ช่วงอายุทางพันธุศาสตร์ ประชากร ปลากั้งมีความถี่ในไทป์เบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ซึ่งเป็นผลมาจากวิธีการรวบรวมตัวอย่าง และขนาดของประชากร ซึ่งมีขนาดเล็ก ซึ่งควรทดสอบเพิ่มเติมในประชากรปลากั้งจากแหล่งอื่นที่มีขนาดใหญ่ต่อไป

ไพรมอร์ที่พัฒนาได้และเหมาะสมในการนำไปใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ต่อไป ได้แก่ DTLOm4, DTLOm6, DTLOm12 และ DTLOm13

อภิปรายผล

1.จากผลการศึกษาปลากั้งจาก จุดเก็บตัวอย่างที่1-4 จำนวนโครโมโซมและ คาร์ิโอไทป์ นับว่าเป็นผลที่ต่างจากผลการศึกษาของนายาร์(Nayyar, 1966) ซึ่งพบว่าปลาช่อน(ซึ่งเป็นปลาวงศ์เดียวกัน)ที่พบว่ามีโครโมโซม $2n=40$ ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 10 และแบบอะโครเซนตริก 30

ความแตกต่างที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากปลาที่ใช้ในการศึกษามีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันก็เป็นได้ ซึ่งเป็นผลของความแตกต่างในปลาชนิดเดียวกันสอดคล้องกับรายงานจากการศึกษาในปลา *Oryzias minutillus* ซึ่งพบว่าปลาที่กรุงเทพมหานคร มีจำนวนโครโมโซม $2n=34$ ปลาที่เชียงใหม่มีโครโมโซม $2n=30$ (Magtoon and Uwa, 1985)

จากผลการศึกษาโครโมโซมและคาร์ิโอไทป์ของปลากั้ง ในพื้นที่วิจัยครั้งนี้อาจนำไปใช้เป็นข้อมูลด้านไซโตแทกโซโนมี ซึ่งอาจแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ในด้านวิวัฒนาการของปลากั้งที่นำมาใช้ในการศึกษาได้มาจาก 4 จุดเก็บตัวอย่าง ในพื้นที่วิจัย และอาจเป็นตัวบ่งบอกว่า ปลาชนิดอื่น ๆ มีโอกาสที่จะสามารถผสมพันธุ์ข้ามชนิดได้

2. จากผลการพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรมอร์สำหรับปลากั้ง พบว่า เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการพัฒนาไพรมอร์จาก positive clones ที่นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในครั้งนี้ มีค่าสูงกว่าวิธีการสร้างห้องสมุดจีโนมแบบดั้งเดิมซึ่งจะได้ positive clones ที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอประมาณ 0.5-10 % เท่านั้น (Billotte *et al*, 1999)

การศึกษานี้พบว่าทดสอบไพรมอร์จำนวน 5 ไพรมอร์ ได้แก่ DTLOm2, DTLOm4, DTLOm6, DTLOm12 และ DTLOm13 กับตัวอย่างประชากรปลากั้งในพื้นที่วิจัย โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรมอร์ ลำดับเบสแกน อุณหภูมิในการ annealing (T_A) ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ จำนวนอัลลิล ค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตี (H_o) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวัง (H_e) ของไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 5 ตำแหน่ง แสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 3 พบว่าจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งมีค่าอยู่ระหว่าง 2-14 อัลลิล โดยพบว่าที่ตำแหน่ง DTLOm2 มีจำนวน 2 อัลลิล (ขนาด 229-232 bp) ตำแหน่ง DTLOm4 มี 5 อัลลิล ตำแหน่ง DTLOm6 มี 5 อัลลิล (ขนาด 280-294 bp) ตำแหน่ง DTLOm12 มี 9 อัลลิล ตำแหน่ง DTLOm13 มี 14 อัลลิล

จึงนับว่ามีจำนวนอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่งของประชากรปลามีค่าเท่ากับ 7 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของ DeWoody and Avise, (2000) โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ 75 ตำแหน่งในปลาน้ำจืด 13 ชนิดซึ่งมีค่าอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่งเท่ากับ 7.5 และศรีจรรยา สุขมนอนมน์ และสุภาวดี พุ่มพวง(2550)ที่ได้รายงาน การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรมอร์สำหรับปลาดุกอูย (*Clarias macrocephalus*) ซึ่งพบว่า ไพรมอร์จำนวน 12 คู่ มีความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยมีจำนวนอัลลิลอยู่ระหว่าง 2-13อัลลิล และมีค่า observed heterozygosity อยู่ในช่วง 0.10-0.80 ไพรมอร์ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถนำไปใช้ ศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและสร้างแผนที่โครโมโซมของปลาดุกอูยต่อไปได้

ส่วน ค่าสังเกตเฮตเทอโรโซโกซิตีมีค่าระหว่าง 0.0475-1.001 ซึ่งมีค่าต่ำมากในตำแหน่ง DTLOm2 (0.0475) ค่าสังเกตเฮตเทอโรโซโกซิตีส่วนใหญ่มีค่าสูงกว่าค่าคาดหวัง ยกเว้นในตำแหน่ง DTLOm4 มีค่าสังเกตเฮตเทอโรโซโกซิตีต่ำกว่าค่าคาดหวัง (ตารางที่ 4.3) ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรโซโกซิตีมีค่าเท่ากับ 0.6300 ซึ่งมีค่าสูงกว่าในปลาน้ำจืด 13 ชนิดที่ DeWoody and Avise (2000) ศึกษาไว้ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.46 เมื่อทดสอบ สมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ด้วย Markov chain และปรับระดับความน่าจะเป็นด้วย Bonferroni correction พบว่า ประชากรปลากังมีความถี่จีโนไทป์เบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (ผลจากทุกไพรเมอร์ให้ค่า p-value ต่ำกว่า 0.01) ซึ่งเป็นผลมาจากวิธีการรวบรวมตัวอย่างและขนาดของประชากรซึ่งมีขนาดเล็ก ซึ่งควรทดสอบเพิ่มเติมในประชากรปลากังจากแหล่งอื่นที่มีขนาดใหญ่ต่อไป

สำหรับไพรเมอร์ DTLOm2 ไม่เหมาะสมจะนำไปใช้เนื่องจาก ไม่แสดงความหลากหลายของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ส่วนไพรเมอร์ที่พัฒนาได้และสามารถนำไปใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของปลากังในธรรมชาติ และโรงเพาะฟักต่อไป ได้แก่ DTLOm4, DTLOm6, DTLOm12 และ DTLOm13

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของปลากังที่นำมาใช้ในการศึกษาได้มาจาก 4 จุดเก็บตัวอย่าง ในพื้นที่วิจัย จึงควรงานวิจัยที่เกี่ยวข้องปลากังเพิ่มในพื้นที่อื่น

บรรณานุกรม

- โครงการพัฒนาองค์ความรู้ และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย,2543.
- บทความปริทัศน์งานวิจัย, Work Press, กรุงเทพฯ., 2543.
- เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะและห้วยใหญ่,2557.ข้อมูลพื้นฐาน เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าตะเบาะ
และห้วยใหญ่ จังหวัดเพชรบูรณ์และชัยภูมิ.
- ชลิต วิทยานนท์ 2544. ปลาน้ำจืดไทย กรุงเทพฯ,มปท.
- ญาณนนท์ สุนทรกิจ, 2544 . ความหลากหลายของชนิดปลาในบริเวณอุทยานแห่งชาติเขาคิชฌกูฏ
และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(วิทยาศาสตร์การประมง) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นภาพร ศรีพุดินพันธ์และคณะ,2551. การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์
ไพรมอร์ สำหรับปลาบู่ทราย เพื่อการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร. กรมประมง.
- วิสุทธิ ใบไม้ และคณะ(บรรณาธิการ). รายงานผลการวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพ
ในประเทศไทย. จัดพิมพ์ โดยโครงการ BRT Work Press printing กรุงเทพฯ, 2542.
- ศรีจรรยา สุขมนอนต์ และ สุภาวดี พุ่มพวง,2550.การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรมอร์สำหรับ
ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*)
- สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 2553. ร่างนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ
ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2555-2559). กรุงเทพฯ. (เอกสารอัดสำเนา).
- สุกัญญา คำหล้าและคณะ (มปท) การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลากดเหลือง *Mystus nemurus* (C&V)
ด้วยเทคนิค RAPD คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สาธิต โกวิทวาทิ. 2542. การเก็บรักษาตัวอย่างพืชและสัตว์ กรุงเทพฯ: โพรแกรมวิชา
เกษตรศาสตร์ สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.
- สุวิทย์ วรรณศรีและประจักษ์ บัวพันธ์.2553.รายงานผลการวิจัย เรื่อง การมีส่วนร่วมของ
ชุมชนในการใช้ประโยชน์และอนุรักษ์ทรัพยากร และ สิ่งแวดล้อม
ในเขตลุ่มน้ำป่าสักตอนบน.เพชรบูรณ์ : มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
- สมโภชน์ อังคทะวณิช. 2523. ครอบครัวปลาน้ำจืดที่มีคุณค่าของไทย.
สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- Army,Thomas T.2004.Exploration:An Introduction to Astronomy.3rd
ed.New York:McGraw-Hill.Tarback,Edward J.2005.

Barns Robert D. **Zoology**. W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1968.

for Fish Identification

Pacific. **FAO Species Identification Guide for Fisheries**

Purposes. FAO, Rome. • Nelson, J.S. 1994. **Fish of the World** (3rd, ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York. 600 pp

Aliah, R.S., M. Takagi, S. Dong, C.T. Teoh, and N. Taniguchi. 1999. **Isolation and inheritance of microsatellite** markers in the common carp *Cyprinus carpio*. Fisheries Science. 65: 235-239.

Billotte, N., P.J.L. Lagoda, Ange-M. Risterucci, and Franc-C. Baurens. 1999. **Microsatellite-enriched libraries:** applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits. 54: 277-288.

DeWoody, J. A. and J. C., Avise. 2000. **Microsatellite variation in marine**, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56:461-473.

Estoup, A. P. Presa, F. Krieg, D. Vaiman, and R. Guyomard. 1993. (CT)_n and (GT)_n **microsatellites:** a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). Heredity. 71: 488-496.

Galbusera, P., F.A. Volckaert, B. Hellemans, and F. Ollevier. 1996. **Isolation and characterization of microsatellite markers in the African catfish *Clarias gariepinus*** (Burchell, 1822). Molecular Ecology. 5: 703-705.

Grunstein, M. and D.S. Hogness. 1975. Colony hybridization: **A method for the isolation of cloned DNAs which contain a specific gene**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 3961. (เข้าถึง 10/7/2014)

Miller, L.M. and A.R. Kapuscinski. 1996. **Microsatellite DNA markers reveal new levels of genetic variation in Northern Pike**. Trans. Amer. Fish. Soc. 125: 971-977.

Na-Nakorn, U., N. Taniguchi, E. Nugroho, S. Seki, and W. Kamonrat. 1999. **Isolation and characterization of microsatellite loci of *Clarias macrocephalus* and their application to genetic diversity study**. Fisheries Science. 65: 520-526.

Nei, M. and Li, W. 1979. **Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (เข้าถึง 10/7/2014)

Rohlf, F.J. 2000. **Numerical taxonomy and Multivariate Analysis System. NTSYS-pc**. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. New. (เข้าถึง 10/7/2014)

Rico, C., K.M. Ibrahim, I. Rico, and G.M. Hewitt. 1997. **Stock composition in North Atlantic populations of whiting using microsatellite markers**. J. Fish. Biol. 51: 462-475.

Roberts, T.R. 1992. **Systematic revision of the Old World freshwater fish family Notopteridae**. Ichthyol. Explor. Freshwaters, Vol. 2, No. 4, pp.361-383.

- Rozen, S. and H.J. Skaletsky. 1998. **Primer 3. Code available at** <http://www.genome.wi.mit.edu/genome-software/other/primer3.htm/> (เข้าถึง 10/7/2014)
- Sambrook, J. and Russel, D.W. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. (เข้าถึง 10/7/2014)
- Stallings, R. L., A.F. Ford, D. Nelson, D.C. Torney, C.E. Hildebrand, and R.K. Moyzis. 1991. **Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes.** *Genomics*, 10: 807-815.
- Taggard, J.B., R.A. Hynes, P.A. Prodohl, and A. Ferguson. 1992. **A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes.** *J. Fish. Biol.* 40: 963-965.
- Takagi, M., N. Taniguchi, D. Cook, and R.W. Doyle. 1997. **Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream, *Pagrus major* and detection in closely related species.** *Fisheries Science*. 63: 199-204.
- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Jarayabhand, P. and Klinbunga, S. (1998). **Genetic structure in wild populations of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis.** *J. Mar. Biotechnol.* 6: 249-254.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. **Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers.** *Nucl. Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. **DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Waldbieser, G.C. and B.G. Bosworth. 1997. Cloning and characterization of microsatellite loci in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Animal Genetics.** 28: 295-298.
- Weber, J.L. 1990. **Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphism.** *Genomics*. 7: 524-530.
- Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle. 1999. POPGENE VERSION 1.31 **Microsoft windows-based software for population genetics analysis**, University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada. Talwar, P.K. and A.G. Jhingran. 1991. **Inland fishes of India and adjacent countries.** vol.1. A.A. Balkema, Rotterdam. 541 p.
- Weber, M. and L. F. Beaufort. 1916. **The Fishes of the Indo- Australian Archipelago III** Ostariophysi: Cyprinoidea, Apodes, Synbranchi. E.J. Brill Ltd. 238p.
- <http://www.fishbase.org/> 2014

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ภาพกิจกรรมการวิจัย



คณะผู้วิจัยยื่นเอกสารการเข้าศึกษาในพื้นที่วิจัย



รับเอกสารข้อมูลพื้นฐานเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าฯ



การเพาะเลี้ยงปลากังในบ่อท่อซีเมนต์ (ใช้ได้เดือนดินและแมลง เป็นอาหาร)

ภาคผนวกที่ 3

Key to Genus of fishes of Ta Bo - Huai Yai Wildlife Sanctuary,

Mueang distric Petchabun Province.

วงศ์ปลาช่อน (Family Channidae)

ลักษณะประจำวงศ์ ลำตัวยาว ค่อนข้างกลม หัวปกคลุมด้วยเกล็ดขนาดใหญ่ มีอวัยวะช่วยในการหายใจ เรียกว่า diverticula ฐานครีบหลังและครีบก้นยาว แต่เชื่อมต่อกับครีบหาง มีฟันบนขากรรไกร บนกระดูก vomer และที่เพดานปาก

Genus *Channa* Scopoli (1777)

ลักษณะประจำสกุล ลำตัวด้านหน้าค่อนข้างกลม ส่วนด้านท้ายลำตัวแบนข้าง ส่วนหัวปกคลุมด้วยเกล็ดขนาดใหญ่ ฐานครีบหลังยาวมากกว่าครีบก้น และไม่เชื่อมต่อกับครีบหาง ปากกว้าง ตาอยู่ทางด้านบนของส่วนหัว

Key to species of genus *Chana*

1a. Lateral – line scales 40-58.....2

1b. Lateral – line scales 61-66, dropping 2 rows at 18th to 20th perforated scale; brown above, yellow below, a double row of dark spots on side with a zigzag light stripe between spots.....*lucius*

2a. lateral – line scales 40-45, dropping 1 rows at 10th to 13th perforated scale.....*gachua*

2b. Lateral – line scales 52-58, dropping abruptly 2 rows at 17th to 20th perforated scale

ภาคผนวกที่ 4

ภาพแสดงปลากั้งหรือก้าง ที่ศึกษา



ปลากั้ง (ด้านหลัง)



ปลากั้ง (ด้านท้อง)



ปลากั้ง ถูกช้อนขึ้นมา (ตาข่าย)

ประวัติย่อวิจัย

1. ชื่อ สุวิทย์ วรรณศรี -

(ภาษาอังกฤษ) Suwit wunnasri

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3670100166694

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

4. หน่วยงานสถานที่ติดต่อได้สะดวก -หลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์ รหัสไปรษณีย์ 67000 โทร.056-711396 ต่อ2708 โทรสาร 056-722217

ที่อยู่บ้านพัก 171 หมู่ที่ 10 ต.สะเดียง อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์ 67000

เบอร์โทรศัพท์.0810387227 E-mail : suwit_wunnasri@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษาประวัติการศึกษา วท.ม. (ม.เกษตรศาสตร์)

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ-รองศาสตราจารย์ สาขาชีววิทยา ผู้สอนรายวิชาสัตววิทยา กีฏวิทยา สัตว์ผู้บริโภครวม วิวัฒนาการ และแมลงที่สำคัญทางเศรษฐกิจ - คณะกรรมการประเมินผลงานข้าราชการครูเพื่อเข้าสู่ตำแหน่งครู ข้าราชการพิเศษ ของสำนักงานการศึกษาขั้นพื้นฐาน

ผลงานทางวิชาการ เอกสารประกอบการสอน-สัตววิทยา

เอกสารคำสอน-กายวิภาคศาสตร์เปรียบเทียบของสัตว์มีกระดูกสันหลัง
กายวิภาคศาสตร์-ชีววิทยาของแมลง

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำ

7.1 การวิจัยว่าเป็นหัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

7.1.1 แมลงที่ประชาชนภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยบริโภคเป็นอาหาร-เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.2 กิ้งก่าจิ้งเหลนในอันดับลาเซอร์ที่เสีย ในเขตอำเภอเมืองจังหวัดเพชรบูรณ์-เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย -เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.3 ตะพาบน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ (ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ปีงบประมาณ2549) -เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.4 ความหลากหลายและการแพร่กระจายทางชีวภูมิศาสตร์ของสัตว์เลื้อยคลานในอันดับเต่า-ตะพาบน้ำในเขต จังหวัดเพชรบูรณ์ (ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ปีงบประมาณ2550) -เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.5 สารเคมีทางการเกษตรและสุขภาพอนามัยของเกษตรกรในจังหวัดเพชรบูรณ์ (ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ2552) -เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.6 ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูหิน (Phalamipa sp.) ในลุ่มน้ำพุ อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ -เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.7 การเปรียบเทียบ การสะสมสารเคมีกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟสและคาร์บาเมตในดินและกะหล่ำดอกที่ปลูกโดยใช้และไม่ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในบ้านน้ำดุกอำเภอหล่มสักจังหวัดเพชรบูรณ์-เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

7.2 การเผยแพร่งานวิจัย: ชื่อผลงานวิจัย ชื่อวารสารที่เผยแพร่ ปีที่พิมพ์

7.2.1 บทความวิจัย

“วิทยาศาสตร์ และรายงานการวิจัย” พิมพ์เผยแพร่ในวารสารเพชรบูรณ์สาร 8 เรื่อง (พ.ศ. 2544-2553)

“มุขวิทยาาสตร์” พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวงการครู ปี พ.ศ. 2547-2548 (จำนวน 12 เรื่อง)

“ครูในยุคโลกาภิวัตน์” พิมพ์เผยแพร่ในวารสารทรัพยากรมนุษย์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ พ.ศ. 2549

“บทความวิทยาศาสตร์”วารสารวิทยาศาสตร์ ปี พ.ศ. 2548-2553

(จำนวน 13 เรื่อง)

7.2.2 แผลงที่ประชาชนภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยบริโภคเป็นอาหาร-ห้องสมุดวิทยาลัย
ครูเพชรบูรณ์ (2524) -**เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย**

7.1.3 ความหลากหลายและการแพร่กระจายทางชีวภูมิศาสตร์ของสัตว์เลื้อยคลานในอันดับเต่า-
ตะพานน้ำในเขต จังหวัดเพชรบูรณ์-วารสารเพชรบูรณ์สาร ปี 2549-**เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย**

7.1.4 สารเคมีทางการเกษตรและสุขภาพอนามัยของเกษตรกรในจังหวัดเพชรบูรณ์ -**เป็นหัวหน้า
โครงการวิจัย**

7.1.๕ การเปรียบเทียบ การสะสมสารเคมีกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟสและคาร์บาเมตในดินและ
กะหล่ำดอกที่ปลูกโดยใช้และไม่ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในบ้านน้ำตูกอำเภอลำลูกเหล็กจังหวัดเพชรบูรณ์-
เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย-(อยู่ในระหว่างตรวจเอกสารโดยคณะกรรมการฯเพื่อพิมพ์ลงใน วารสารราชภัฏเพชรบูรณ์
สาร) (255๕) -**เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย**

7.1.๖ ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูหิน (Phalamipa sp.) ในลุ่มน้ำพุ อำเภอลำลูกเหล็ก จังหวัดเพชรบูรณ์
(ได้แสดงในงานนิทรรศการ เอ็กซ์โปราที่กทม.สิงหาคม2556) -**เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย**

7.1.๗ ความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรบริเวณพื้นที่ภูผาม้า
อำเภอลำลูกเหล็ก จังหวัดเพชรบูรณ์(แหล่งทุนสกอ.ปีงบประมาณ2556 --เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย ได้ทำการวิจัย
ลุล่วงและส่งรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ที่ต้นสังกัดแล้ว-รอการตรวจแก้โดยผู้เชี่ยวชาญ) -**เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย**

7.1.๘ ความหลากหลายทางชีวภาพ ในอ่างเก็บน้ำคลองลำกง อำเภอนองไผ่ จังหวัดเพชรบูรณ์ -เป็น
ผู้อำนวยการแผนการวิจัย (แหล่งทุนวช.ปีงบประมาณ2556- ได้ทำการวิจัย ลุล่วงแล้ว-ประมาณร้อยละ80(อยู่ใน
ระหว่างการจัดพิมพ์รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์)-**เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย**