วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 31(2): 22-32

การแยกชนิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ปลาบึก ปลาสวาย ปลาเผาะ และปลาลูกผสม โดยเทคนิค AFLP

Genetic Identification and Relationship of *Pangasianodon gigas, Pangasianodon hypophthalmus, Pangasius bocourti* and their Hybrids by AFLP Technique

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน[1*] ดวงพร อมรเลิศพิศาล[1] นันทพร สุทธิ[1] และศุภมิตร เมฆฉาย[2]

Kriangsak Meng-umphan[1*], Doungporn Amornlerdpison[1], Nantaporn Sutthi[1] and Supamit Mekchay[2]

[1]คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[2]ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

[1]Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resource, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

[2]Deparment of Animal and Aquatic science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50200

*Corresponding author: kriang1122sak@gmail.com

Abstracts

The freshwater catfish in the Pangasiidae, including *Pangasianodon gigas*, *Pangasianodon hypophthalmus*, *Pangasius bocourti* and their hybrids are currently well adopted among consumers. However, these catfish and the hybrid possess different meat quality, while the external characteristics are quite similar, especially among the fingerlings at the size of 2-6 inches. Owing to the fact that fingerlings of these sizes are needed for the farmers. Therefore, this study evaluated the genetic differences and related among these species. A total of 21 fish were subjected to genetic analyses using the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique employing 12 primer combinations. The DNA bands in a range of 100-1,100 base pairs were observed with the average number of 25-53 bands per primer. The polymorphisms ranged between 25 and 83%. In addition, the specific DNA bands of *Pangasianodon gigas* and the hybrid (*Pangasianodon gigas* x *Pagasius bocourti*) were found to be at 450 and 350 bp, respectively. Later, one hundred thirty-four AFLP markers were used for the reconstruction of a phylogenic tree which separated the three species and the hybrid into 2 groups. In the first group, *Pangasianodon gigas* was differentiated from the hybrid (*Pangasianodon* gigas x *Pangasianodon. hypophthalmus*), with a coefficient of 0.41. The second group differentiated *Pangasius bocourti* from *Pangasianodon gigas* and the hybrid (*Pangasianodon gigas* x *Pangasius bocourti*), having a coefficient of 0.43. The results from this study showed that the AFLP technique could be utilized for genetic identification and relation of the Pangasiid catfish.

Keywords: *Pangasianodon gigas, Pangasianodon hypophthalmus, Pagasius bocourti* and hybrid, AFLP

292184

บทคัดย่อ

ปลาหนังน้ำจืดในกลุ่ม Pangasaiid ได้แก่ ปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) ปลาสวาย (*Pangasia nodon hypophthalmus*) ปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) และปลาหนังลูกผสม กำลังได้รับความนิยมในการบริโภค อย่างไรก็ตามพบว่า ปลาแต่ละชนิดมีคุณภาพเนื้อแตกต่างกัน แต่มีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งยากต่อการแยกด้วยตาเปล่าโดยเฉพาะในลูกปลาขนาด 2-6 นิ้ว ซึ่งเป็นขนาดที่เกษตรกรจะซื้อและนำไปเลี้ยงต่อ เพื่อเป็นแนวทางในการแยกสายพันธุ์และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม จึงทำการตรวจหาความแตกต่าง และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาชนิดดังกล่าว จำนวนรวม 21 ตัว ด้วยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 12 คู่ ผลจากการศึกษา พบว่า แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดระหว่าง 100-1100 bp จำนวน 25-53 แถบต่อไพรเมอร์ โดยช่วงของแถบดีเอ็นเอที่มีค่าความหลากหลายคิดเป็นค่า polymorphism อยู่ระหว่าง 25-83% และพบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะจำเพาะ (specific DNA band) ต่อปลาบึกและปลาลูกผสม (พ่อบึก x แม่เผาะ) ที่ตำแหน่งประมาณ 450 และ 350 bp ตามลำดับ จากการสร้างแผนผังความสัมพันธ์ (Phylogenic tree) โดยอาศัย AFLP marker จำนวน 134 marker พบว่า สามารถแบ่งความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 สามารถแยกปลาบึกออกจากปลาสวายและปลาลูกผสม (พ่อบึก x แม่สวาย) โดยมีค่า coefficient เท่ากับ 0.41 และกลุ่มที่ 2 สามารถแยกปลาเผาะออกจากปลาบึกและปลาลูกผสม (บึก x เผาะ) โดยมีค่า coefficient เท่ากับ 0.43 ผลการศึกษาแสดงว่า เทคนิค AFLP สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของกลุ่มปลาดังกล่าวได้

คำสำคัญ: ปลาบึก ปลาสวาย ปลาเผาะ ปลาลูกผสม เทคนิค AFLP การบ่งชี้พันธุ์

คำนำ

ปลาหนังในครอบครัว Pangasiidae เป็นปลาที่มีความสำคัญเป็นอาหารโปรตีนสูงให้กับผู้บริโภคในกลุ่มประเทศในเขต South-east Asian (Sriphairoj *et al.*, 2010) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะพบได้ในแถบลุ่มแม่น้ำโขง (Coates, 2002) โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาบึก ที่เป็นปลาเฉพาะถิ่นอาศัยอยู่ในเขตแม่น้ำโขงที่ไหลผ่าน 6 ประเทศ คือ จีน พม่า ไทย ลาว กัมพูชา และเวียดนาม (Berra, 2001) ส่วนปลากลุ่มอื่น เช่น ปลาสวาย พบว่าส่วนใหญ่ที่มีการเลี้ยงได้มาจากโรงเพาะฟัก (อารีย์และสุจิต, 2509) ปลาสวายที่มาจากธรรมชาติมีน้อยลง โดยประเทศไทยมีการส่งออกกลุ่มปลาสวายและลูกผสมแบบแช่เย็นไปต่างประเทศ คิดเป็นร้อยละ 38 ของการส่งออกทั้งหมดในปี พ.ศ 2552 (ส่วนเศรษฐกิจการประมง, 2555) ประกอบกับในสถานการณ์ปัจจุบันเกษตรกรหันมาสนใจการเพาะเลี้ยงปลาบึก ปลาเผาะ ปลาสวาย ปลาเทโพ และปลาลูกผสมเนื้อขาวกันมากขึ้น เช่น ปลาบึกหวาย (พ่อบึกรุ่นที่ 1 x แม่สวาย) ปลาสวายโมง (พ่อสวาย x แม่เผาะ) ปลาสวายหูหมาก (พ่อเทโพ x แม่สวาย) หรือปลาลูกผสมบึกสยาม (พ่อแม่ลูกผสมรุ่น 2) เป็นต้น เนื่องจากมีความต้องการของผู้บริโภคภายในประเทศปีละประมาณ 20,000 ตัน และตลาดต่างประเทศอีกปีละ 1-2 ล้านตัน (Hung *et al.*, 2003)

ในการศึกษาลักษณะของปลาบึก สวาย เผาะ และปลาลูกผสม มีการศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา วงจรชีวิต และพฤติกรรมการดำรงชีวิตของปลากลุ่มดังกล่าวมาบ้างแล้ว แต่การศึกษาการจำแนกลักษณะสายพันธุ์ปลาครอบครัว Pangasiidae ส่วนใหญ่แล้วยังคงใช้วิธีดูจากลักษณะภายนอก (Roberts and Vidthayanon, 1991) ซึ่งเป็นวิธีที่ยังไม่สามารถตรวจสอบสายพันธุ์และพันธุกรรมของปลากลุ่มดังกล่าวได้สมบูรณ์ โดยเฉพาะปลาในกลุ่ม บึก สวาย เผาะ และลูกผสม ขนาด 2-6 นิ้ว ที่มีลักษณะภายนอกที่คล้ายกัน และเป็นระยะที่นิยมนำไปเลี้ยงต่อกันอย่างมาก

นอกจากนี้ การผสมข้ามพันธุ์ยังทำให้เกิดการปนเปื้อนทางพันธุกรรมได้อีกด้วย ดังนั้นการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และพันธุกรรมที่จำเพาะของปลาดังกล่าวจึงเป็นสิ่งที่มีประโยชน์

หลักการ Amplified Fragment Length Poly morphism (AFLP) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มีมาก การตัดด้วยเอนไซน์ตัดจำเพาะที่ผสมระหว่างวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดย AFLP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สร้างลายพิมพ์ของ Genomic DNA ด้วย DNA ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะ (Arbitrary primer) สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดได้ มีรายงานการใช้หลักการ AFLP ในการศึกษาจีโนมิกดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูงในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Vos *et al.,* 1995; Kocher *et al.,*1998; Liu *et al.,* 1998; Seki *et al.,* 1999 ; Agresti *et al.,* 2000 และ Waldbieser *et al.,* 2001)

จากปัญหาดังกล่าวจึงนำมาสู่วัตถุประสงค์ของการวิจัย เพื่อศึกษาความแตกต่างและความสัมพันธ์ระดับชนิดของปลาในครอบครัว Pangasiidae การศึกษาในครั้งนี้มีความสำคัญ ต่อความสำเร็จทางด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การอนุรักษ์ การป้องกันการปนเปื้อน และการปลอมสายพันธุ์ของปลา อีกทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการอ้างอิง และนำไปใช้ประโยชน์ด้านการจำแนกสายพันธุ์อย่างถูกต้องและแม่นยำ หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และยังใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ของปลากลุ่มนี้ให้เลี้ยงง่ายและเจริญเติบโตเร็ว มีปริมาณและคุณภาพเนื้อที่ดีเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างปลา

ตัวอย่างปลาได้จากการเลี้ยงและการผสมเทียมจากโครงการปลาบึกอย่างบูรณาการ ณ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ใช้ปลาทั้งหมด 21 ตัว (ปลาบึก 6 ตัว ปลาสวาย 7 ตัว ปลาเผาะ 2 ตัว ปลาลูกผสมบึก x เผาะ 3 ตัว และปลาลูกผสมบึก x สวาย 3 ตัว) (Table 1) ปลาแต่ละชนิด ถูกตัดครีบหางแช่ใน Ethanol 95% เพื่อรักษาสภาพ จากนั้นนำมาสกัด DNA โดยวิธี Phenol-chloro form ตามวิธีของ Sambrook and Russel (2001) ส่วนปริมาณความเข้มข้นของ DNA ถูกวัดโดย Nanodrop 2000c spectrophotometer รุ่น Thermo Scientific, USA และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดย 1% Agarose gel electro phoresis

เทคนิค AFLP

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของปลาตัวอย่างแต่ละตัว (ความเข้มข้น 100 ng) ไปวิเคราะห์เทคนิค AFLP (Wimmer *et al.,* 2002) โดยมีวิธีการอย่างย่อ ดังนี้

1) การตัดดีเอ็นเอด้วยตัวอย่างด้วยเอนไซม์ โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*I Fast digest (Fermentus) และ *Eco*RI Fast digest (Fermentus) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 และ 37°ซ เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับ Adapters โดยมีส่วนประกอบดังนี้ *Eco*RI adapter ความเข้มข้น 10 µ และ *Taq*I adapter ความเข้มข้น 50 pmol โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ความ เข้มข้น 3 U/µl ที่อุณหภูมิ 20°ซ นาน 3 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 4°ซ ข้ามคืน

2) ขั้นตอน Pre-selective amplifycation โดยการใช้ไพรเมอร์ที่มีการคัดเลือกนิวคลีโอไทด์เพิ่มเข้าไป 1 ตำแหน่ง คือ *Eco*RI-N primer (E+A) และ *Taq*I-N primer (T+C) แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

3) ทำการคัดเลือกอีกครั้งหนึ่ง (Selective amplification) ซึ่งเป็นการเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเข้าไป 2 ตำแหน่ง *Eco*RI-N primer (E+ANN) และ *Taq*I-N primer (T+CNN) ไพรเมอร์ ทั้งหมดจำนวน 20 คู่ (Table2) นำตัวอย่างผลผลิตมาเติม Loading dye (98% Formamide, 10 mM EDTA, 0.025% Xylene cyanol and 0.025% Bromophenol blue) แล้วนำไปทำให้เสียสภาพที่อุณหภูมิ 95°ซ นาน 5 นาที

4) นำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีแล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 6% Denaturing polyacrylamide gel electro phoresis โดยกำลังไฟฟ้าคงที่ 55 W นาน 3 ชั่วโมง จึงทำการย้อมด้วยใช้ซิลเวอร์ไนเตรท

เก็บข้อมูลและการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ข้อมูลแถบดีเอ็นเอเครื่องหมายโมเลกุล AFLP จากแผ่นเจลถูกแปลงให้อยู่ในรูปข้อมูลตัวเลข โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ แทนด้วย “1” และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏในแถวเดียวกันแทนด้วย “0” นำมาวิเคราะห์หาความแตกต่าง และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

โดยการวิเคราะห์หาความแตกต่างทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์สามารถวัดในรูปค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายกัน (Similarity coefficients) ดังสูตร

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

S_{ij} = ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างปลา i และ j

A = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในทั้งสองตัวอย่าง

b = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในปลา i แต่ไม่ปรากฏในปลา j

c = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในปลา j แต่ไม่ปรากฏในปลา i

คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distances) ด้วยวิธีของ Jaccard coefficient ซึ่งใช้การประเมินค่า ความคล้ายกันทางพันธุกรรม (Genetic similarity estimates; S_{ij}) โดยนำค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน (Similarity coefficients) เปลี่ยนรูปเป็นระยะห่างทางพันธุกรรม (Rohlf, 1995) โดยใช้สูตรของ Nei and Li (1979) ดังนี้

$$\text{Genetic distance } (D_{ij}) = 1 - S_{ij}$$

D_{ij} = ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสัตว์ที่ i และ j

S_{ij} = ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างสัตว์ i และ j

นำค่า Genetic distance matrix ไปสร้างแผนผังความสัมพันธ์ (Phylogenic tree) ตามวิธี Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average (UPGMA) ใช้โปรแกรม NTSYS ver. 2.01

Table 1 Species and number of the fish specimens

No.	Species	No.	Species
1	*Pangasianodon gigas* 1	12	*P. gigas* x *P. gigas* 3
2	*P. gigas* 2	13	*P. hypophthalmus* x *P. hypophthalmus* 1
3	*P. gigas* 3	14	*P. hypophthalmus* x *P. hypophthalmus* 2
4	*Pangasianodon hypophthalmus* 1	15	*P. hypophthalmus* x *P. hypophthalmus* 3
5	*P. hypophthalmus* 2	16	*P. gigas* x *P. bocourti* 1
6	*P. hypophthalmus* 3	17	*P. gigas* x *P. bocourti* 2
7	*P. hypophthalmus* 4	18	*P. gigas* x *P. bocourti* 3
8	*Pagasius bocourti* 1	19	*P. gigas* x *P. hypophthalmus* 1
9	*P. bocourti* 2	20	*P. gigas* x *P. hypophthalmus* 2
10	*P. gigas* x *P. gigas* 1	21	*P. gigas* x *P. hypophthalmus*3
11	*P. gigas* x *P. gigas* 2		

Table 2 Primer combination for AFLP analysis of *Pangasianodon gigas, Pangasianodon hypophthalmus, Pagasius bocourti* and their hybrid

Primer combination	Primer *Eco*RI	Primer *Taq*I
1	5-GACTGCGTACCAATTCAGC-3	5-GATGAGTCCTGACCGACCA-3
2	5-GACTGCGTACCAATTCATC-3	5-GATGAGTCCTGACCGACTG-3
3	5-GACTGCGTACCAATTCACC-3	5-GATGAGTCCTGACCGACCA-3
4	5-GACTGCGTACCAATTCACC-3	5-GATGAGTCCTGACCGACGA-3
5	5-GACTGCGTACCAATTCACG-3	5-GATGAGTCCTGACCGACAC-3
6	5-GACTGCGTACCAATTCACG-3	5-GATGAGTCCTGACCGACGA-3
7	5-GACTGCGTACCAATTCAGC-3	5-GATGAGTCCTGACCGACTG-3
8	5-GACTGCGTACCAATTCAGG-3	5-GATGAGTCCTGACCGACAG-3
9	5-GACTGCGTACCAATTCATC-3	5-GATGAGTCCTGACCGACCA-3
10	5-GACTGCGTACCAATTCATG-3	5-GATGAGTCCTGACCGACTG-3
11	5-GACTGCGTACCAATTCAAG-3	5-GATGAGTCCTGACCGACGA-3
12	5-GACTGCGTACCAATTCAAC-3	5-GATGAGTCCTGACCGACGT-3

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ผลการทดลอง

ผลการศึกษา Genetic genotyping โดยอาศัยเทคนิค AFLP จำนวน 12 คู่ Primer combination ในปลา 21 ตัวอย่างของปลาครอบครัว Pangasiidae พบว่า มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 100-1,100 bp (Figure 1) โดยมีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 417 แถบ คิดเป็นจำนวน 25-53 แถบ ต่อ 1 คู่ Primer combination และมีแถบดีเอ็นเอที่มี Polymorphisms อยู่ในช่วง 25.00-83.33% (Table 3)

โดยในการศึกษาครั้งนี้ พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ Specific ต่อปลาบึก มีแถบดีเอ็นเอขนาด 450 bp และที่จำเพาะกับปลาลูกผสมบึกเผาะมีขนาด 350 bp (Figure 1) จากแผนผังความ สัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า สามารถแบ่งความ สัมพันธ์ ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 สามารถแยก ปลาบึก (*P. gigas*) ทั้งรุ่นพ่อแม่ และรุ่นลูกออกจากปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ทั้งรุ่นพ่อแม่ และรุ่นลูก และปลาลูกผสม (*P. gigas* x *P. hypophthalmus*) โดยมีค่า Coefficient เท่ากับ 0.41 (Figure 2) โดยอาศัย AFLP Marker จำนวน 134 Marker ในขณะที่ กลุ่มที่ 2 ได้ใช้จำนวน Marker ดังกล่าวเช่นกัน พบว่า สามารถแยกปลาเผาะ (*P. bocourti*) ออกจากกลุ่มปลาบึก (*P. gigas*) ทั้งรุ่นพ่อแม่ และรุ่นลูกและปลาลูกผสม (*P. gigas* x *P. bocourti*) โดยมีค่า Coefficient เท่ากับ 0.43 (Figure 3)

Table 3 Estimation of the average number of alleles, number of polymorphic bands and percentage of polymorphic

Primer combination	Number of DNA bands in each primer	Number of Polymorphic Bands	% Polymorphic
1	40	31	77.50
2	42	35	83.33
3	46	25	54.35
4	26	19	73.08
5	28	7	25.00
6	33	15	45.45
7	25	16	64.00
8	32	26	81.25
9	53	31	58.49
10	36	26	72.22
11	30	23	76.67
12	26	20	76.92
Total	417	274	788.27
Average	34.75	22.83	65.69

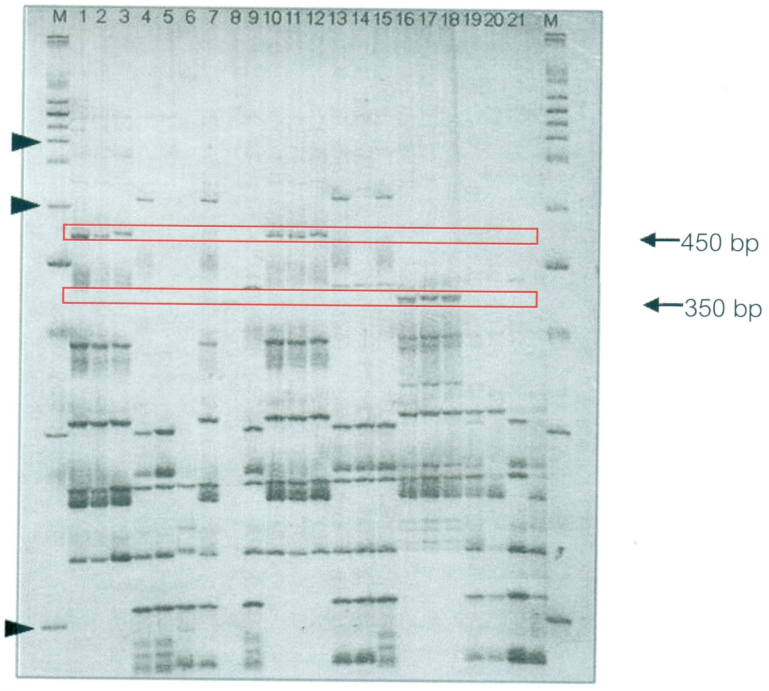

Figure 1 AFLP band of *P. gigas* (1-3), *P. hypophthalmus* (4-7), *P. bocourti* (8-9), *P. gigas* x *P. gigas* (10-12), *P. hypophthalmus* x *P. hypophthalmus* (13-15), *P. gigas* x *P. bocourti* (16-18), *P. gigas* x *P. hypophthalmus* (19-21), marker (M) and arrow = size of marker (100, 500, 700 bp) with AFLP primer combination EcoRITaqI

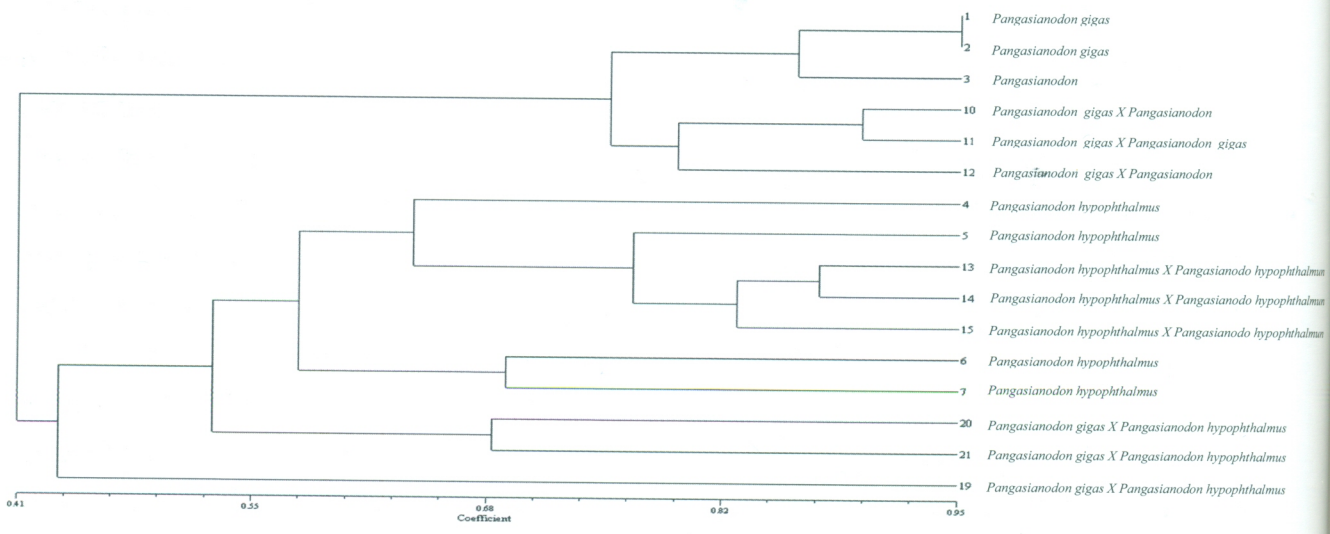

Figure 2 Phylogenic tree of *P. gigas* (1-3), *P. hypophthalmus* (4-7), *P. gigas* x *P. gigas* (10-12), *P. hypophthalmus* x *P. hypophthalmus* (13-15), and *P. gigas* x *P. hypophthalmus* (19-21) with 134 markers using UPGMA

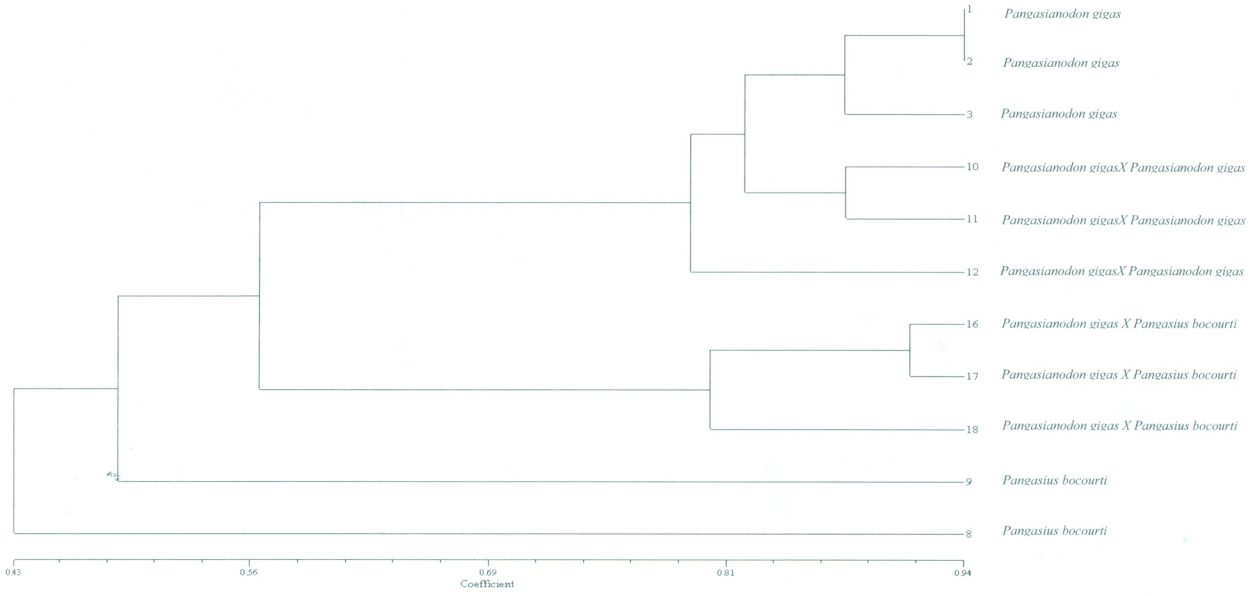

Figure 3 Phylogenic tree of *P. gigas* (1-3), *P. bocourti (8-9)*, *P. gigas* x *P. gigas* (10-12) and *P. gigas* x *P. bocourti* (16-18), with 134 markers using UPGMA

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ดังกล่าว พบว่า กลุ่มปลาลูกผสม *P. gigas* x *P. hypophthalmus* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่คล้ายกับปลาสวายมากกว่าปลาบึก ในขณะที่ปลาลูกผสม *P. gigas* x *P. bocourti* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่คล้ายกับปลาบึกมากกว่าปลาเผาะ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yarmohammadi *et al.* (2011) ได้จำแนกสายพันธ์ปลา 3 สายพันธุ์ คือ ปลา *Acipenser ruthenus* ปลา *Huso huso* และปลาลูกผสม *A. ruthenus x H. huso* จำนวน 12 ตัวอย่าง โดยอาศัยเทคนิค AFLP จำนวน 8 คู่ primer combination พบว่า ปลาลูกผสมมีลักษณะคล้ายกับปลา *H. huso* มากกว่า *A. ruthenus* ซึ่งการศึกษาการจำแนกปลากลุ่ม Pangasiid ในประเทศไทยยังมีการศึกษากันน้อย จากรายงานของ Sriphairojet *et al.* (2010) ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ปลากลุ่ม Pangasiid catfish ซึ่งได้พัฒนามาจากเครื่องหมาย AFLP ด้วยการใช้เทคนิค SSCP พบว่า มีเพียงเครื่องหมายเดียวจากทั้งหมด 7 เครื่องหมาย คือ PL8 สามารถแยกสายพันธุ์ปลาหนัง (ปลาบึก ปลาสวาย ปลาเผาะ และปลาเทโพ) ได้เทคนิค AFLP มีประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ ดังในรายงานของ Liu *et al.* (1998) ที่ศึกษาการถ่ายทอดและการใช้ประโยชน์จากเครื่องหมาย AFLP ในปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*), Blue catfish (*I. furcatus*) รุ่นลูก F1, F2 และกลุ่มลูกผสม Backcross โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ พบว่า มีแถบแบนดีเอ็นเอตั้งแต่ 70-200 แถบ มีค่า Polymorphic ตั้งแต่ 38.6-75.7% เครื่องหมายทั้งหมดถูกส่งไปยังปลาลูกรุ่น F1 ยกเว้นเครื่องหมายที่เป็น Heterozygous ในรุ่นพ่อแม่ที่สามารถแยกออกจากปลารุ่นลูก F1 ได้

จากรายงานของ Poompuang and Sukmanomon (2003) ที่จำแนกปลาดุกอุยและปลาดุกยักษ์โดยเทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์จำนวน 58 คู่ ในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ปลาดุกยักษ์ (*Clarias gariepinus*)

และปลาดุกลูกผสม พบว่า เกิดเครื่องหมาย AFLP ทั้งหมด 672 เครื่องหมาย โดยพบเฉพาะปลาดุกอุย 359 เครื่องหมาย และพบเฉพาะปลาดุกยักษ์ 313 เครื่องหมาย ด้วยเครื่องหมายเหล่านี้มีการถ่ายทอดไปยังปลาดุกลูกผสมรุ่น F1 ทั้งหมดผลจากการวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นเพียงการสุ่ม Screening data ในการศึกษาการจำแนกชนิดของปลากลุ่มครอบครัว Pangasiidae สายพันธุ์ปลาบึก สวาย เผาะ และลูกผสม เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกัน ซึ่งอาจเป็นเรื่องยากที่จะจำแนกได้ 100% โดยเฉพาะกลุ่มปลาลูกผสม หากต้องการความแม่นยำของข้อมูล ควรเพิ่มตัวอย่างในการวิเคราะห์และอาจใช้เทคนิคอื่นๆ ประกอบ เช่น Microsatellite marker เป็นต้น

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลของการศึกษานี้สามารถบอกได้เบื้องต้นว่าพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ (Specific band) ต่อปลาบึกและปลาลูกผสมบึกเผาะ มีขนาด 450 และ 350 bp ตามลำดับ โดยปลาบึก สวาย เผาะ และลูกผสมทั้ง 2 ชนิด ยังมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้กัน โดยแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 นี้ อาจพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุล AFLP ซึ่งควรที่จะต้องวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ จากนั้นจึงนำไปทดสอบกับกลุ่มประชากร หรือพิสูจน์ว่ามีการถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปสู่ลูก ว่าเป็นไปตามกฎของเมนเดลหรือไม่

นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอดังกล่าวยังสามารถใช้ศึกษาโครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เพื่อเป็นแนวทางในการบริหารจัดการด้านความหลากหลายหรือดูศักยภาพทางพันธุกรรมของประชากรพ่อแม่พันธุ์ปลากลุ่มนี้ (Broodstock management)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้ และคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ ที่อนุเคราะห์สถานที่และอำนวยความสะดวก ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

ส่วนเศรษฐกิจการประมง. 2555. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://fishcofisheries.go.th/fisheconomic/fish_N_ws80.html. (13 พฤศจิกายน 2556).

อารีย์ สิทธิมังค์ และสุจิต ภิญโญยิ่ง. 2509. **การเพาะปลาสวายโดยวิธีฉีดฮอร์โมนผสมเทียม.** เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 5. กรุงเทพฯ: กองบำรุงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรมประมง. 22 น.

Agresti, J. J., S. Seki, A. Cnaani, S. Poompuang, E. M. Hallerman, N. Umiel, G. Hulata, G. A. E. Gall and B. May. 2000. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. **Aquaculture** 185: 43-56.

Berra, T. M. 2001. **Freshwater Fish Distribution.** San Diego: Academic Press. 604 p.

Coates, D. 2002. **Inland Capture Fishery Statistics of Southeast Asia: Current Status and Information Needs, RAP publication no. 2002/1.** Bangkok: Asia-Pacific Fishery Commission. 114 p.

Hung, L. T., J. Lazard, C. Mariojouls, and Y. Moreau. 2003. Comparison of starch utilization in fingerlings of two Asian catfishes from the Mekong River (*Pangasius bocourti* Sauvage, 1880, *Pangasius hypophthalmus* Sauvage, 1878). **Aquaculture Nutrition** 9: 215-222. (DOI: 10.1046/j.1365-2095.2003.00244)

Kocher, T. D., W. J. Lee, H. Sobolewska, D. Penman and B. McAndrew,. 1998. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Genetics** 148: 1225-1232.

Liu, Z., A. Nichols, P. Li and R. A. Dunham. 1998. Inheritance and usefulness of AFLP markers inchannel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2, and backcross hybrids. **Mol Gen Genet.** 258: 260-268.

Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc Natl Acad Sci.** 76: 5269-5273.

Poompuang, S. and S. Sukmanomon. 2003. Conservation of microsatellite loci between *Clarias* spp. and *Pangasius hypophthalmus* and identification of AFLP markers in *C. macrocephalus* and *C. gariepinus*. pp. 49-54. *In* **Proceedings of 41th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries.** Bangkok.

Roberts, T. R. and C. Vidthayanon. 1991. Systematic revision of the Asia catfish family *Pangasiidae*, with biological observations and description of three new species. **Proc Acad Nat Sci Phila.** 143: 97-144.

Rohlf, F. J. 1995. **NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version** 2.01. New York: Exeter Software. 244 p.

Sambrook, J. and D. W. Russel. 2001. **Molecular Cloning, a Laboratory Manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2,028 p.

Seki, S., J. J. Agresti, G. A. E. Gall, N. Taniguchi and B. May. 1999. AFLP analysis of genetic diversity in three populations of Ayu *Plecoglossus altivelis*. **Fish Sci**. 65: 888-892.

Sriphairoj, K., S. Klinbu-nga, W. Kamonrat and U. Na-Nakon. 2010. Species identification of four economically important *Pangasiid* catfishes and closely related species using SSCP markers. **Aquaculture** 308: 47-50.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zebeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23: 4407-4414.

Waldbieser, G. C., B. G. Bosworth, D. J. Nonneman and W. R. Wolters. 2001. A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Genetics** 158:727-734.

Wimmers, K., E. Murani, S. Ponsuksili, M. Yerle and K. Schellander. 2002. Detection of quantitative trait loci for carcass traits in the pig by using AFLP. **Mamm Genome.** 13: 206-210.

Yarmohammadi, M., A. Shabani, M. Pourkazemi and N. S. Baradaran. 2011. Identification of bester hybrids (female *Huso huso* Linnaeus, 1758 and male starlet *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) using AFLP molecular technique. **Iranian Journal of Fisheries Sciences.** 11: 415-423.