การตรวจวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิด และระหว่างชนิดของม้าน้ำสกุล *Hippocampus* โดยเทคนิคอาร์เอพีดี

Intra- and Inter-Species Genetic Difference Analysis of Seahorse Species in Genus *Hippocampus* by RAPD Technique

พิทักษ์ สูตรอนันต์[1]* นพรัตน์ กระต่ายทอง[2] และ เสาวภา สวัสดิ์พีระ[3]

[1]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[3]สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

Pitak Sootanan[1]*, Noparat Krataitong[2] and Sowapa Sawatpeera[3]

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131

[2]Department of Mathematic, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131

[3]Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20131

บทคัดย่อ

เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD: random amplified polymorphic DNA) เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ 3 ชนิด ในสกุล *Hippocampus* โดยการใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดีจำนวน 16 ไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อสร้างแบบแผนอาร์เอพีดี สำหรับการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดและระหว่างชนิด ของม้าน้ำดำ (*Hippocampus* kuda; n=4) ม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus;* n=4) และม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus;* n=3) พบว่าจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่นับและปรากฏในทุกตัวอย่างของม้าน้ำแต่ละชนิด เท่ากับร้อยละ 77.9 ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับ ม้าน้ำหนามมีระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเท่ากับ 0.129 ซึ่งสูงกว่าม้าน้ำสามจุด และม้าน้ำดำที่มีค่าเท่ากับ 0.056 และ 0.052 ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์รูปแบบโครงสร้างเดนโดรแกรมแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ม้าน้ำหนามมีความใกล้ชิดกับม้าน้ำสามจุดมากกว่าม้าน้ำดำ ซึ่งรายงานฉบับนี้เป็นรายงานฉบับแรกที่ได้นำเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของม้าน้ำ 3 ชนิด และข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาระดับโมเลกุลของการบ่งชี้ชนิด การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากร และการจัดการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อไปได้

คำสำคัญ : อาร์เอพีดี, ระยะห่างทางพันธุกรรม, ม้าน้ำ, *Hippocampus*

Abstract

The random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was evaluated for studying genetic relationship and diversity in three speices of seahorse (Genus *Hippocampus*). Sixteen arbitrary primers were used to identify species-specific RAPD markers among the spotted seahorse (*Hippocampus* kuda), the hedgehog seahorse *(H. spinosissimus)* and the three-spot seahorse *(H. trimaculatus).* On average, 77.9% of the scorable RAPD

*** Corresponding author.** E-mail: pitaksootanan@yahoo.com

bands were specific to each speicies. Hedgehog seahorse has more intra-species relationship than spotted seahorse and three-spot seahorse with genetic distance of 0.129, 0.056 and 0.052, respectively. Dendrogram analysis demonstrated that the hedgehog seahorse is the closet to the three-spot seahorse and the fastest from the spotted seahorse. Data are presented with regard to the application of RAPD markers for species identification, studying on the genetic structure of seahorse species and optimizing fisheries management at a molecular level.

Keywords : RAPD, Genetic distance, Seahorse, *Hippocampus*

บทนำ

ม้าน้ำเป็นปลาที่จัดอยู่ในคลาส (Class) Osteichthyes ซึ่งปลาในกลุ่มนี้มีลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกันมาก ม้าน้ำอยู่ในครอบครัว (Family) Syngnathidae ซึ่งมีสมาชิกอยู่หลายตัวด้วยกัน เช่น ปลาจิ้มฟันจระเข้ (pipe fish) ม้าน้ำปากยาว (pipe horse) เป็นต้น ม้าน้ำอยู่ในสกุล (Genus) *Hippocampus* จัดเป็นปลาที่มีกระดูกแข็ง และมีรูปร่างลักษณะแปลกไปจากปลาทั่วๆ ไป ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบม้าน้ำทั่วโลกทั้งหมด 35 ชนิด (Lourie, 1999) ส่วนม้าน้ำในประเทศไทยมีรายงานว่าพบทั้งหมด 6 ชนิดคือ ม้าน้ำดำ *(Hippocampus kuda)* ม้าน้ำหนาม *(H. spinosissimus)* ม้าน้ำสามจุด *(H. trimaculatus)* และม้าน้ำแคระ *(H. mohnokei)* (เสาวภา และ วรเทพ, 2543) และจากการสำรวจชนิดของปลาสวยงามในโครงการธุรกิจปลาสวยงามน้ำเค็มในแผนงานวิจัยการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามน้ำเค็มกลุ่มปลาการ์ตูน ได้รายงานว่าพบม้าน้ำเพิ่มอีก 2 ชนิด คือ ม้าน้ำหนามขอ *(H. histrix)* และม้าน้ำยักษ์ *(H. kelloggi)*

ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแต่ละชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่นการศึกษาในกลุ่มของปลาคาร์ฟอินเดีย (Barman และคณะ, 2003) สามารถนำมาใช้สำหรับการจำแนกตัวอย่างปลา การเพิ่มผลผลิต โปรแกรมการเพาะเลี้ยง หรือการจัดการในแง่ของการอนุรักษ์เพื่อคงความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาคาร์ฟที่เพาะเลี้ยงได้ การใช้วิธีทางสัณฐานวิทยาเพื่อจำแนกชนิดและการศึกษาทางพันธุกรรมของม้าน้ำบางครั้งอาจมีการสับสนได้ เช่น กรณีที่ม้าน้ำอยู่ในระยะตัวอ่อน หรืออยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์นักทำให้ได้ข้อมูลที่ไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการจัดการด้านพันธุกรรม จากปัญหาข้างต้นจึงได้มีการศึกษาเพื่อนำข้อมูลทางพันธุกรรมจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA profiles) มาช่วยในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของม้าน้ำ โดยมากในการศึกษาโครงสร้างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของม้าน้ำ นิยมใช้การตรวจสอบความแตกต่างหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณตำแหน่งจีนที่จำเพาะบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Casey และคณะ, 2003; Teske และคณะ, 2003) แต่การตรวจสอบข้อมูลทางพันธุกรรมของจีโนมิกดีเอ็นเอยังไม่พบการรายงาน

เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD: Random amplified polymorphic DNA) เป็นเทคนิคที่อาศัยการเพิ่มปริมาณชิ้น ดีเอ็นเอภายใต้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) ในบริเวณต่างๆ บนสายดีเอ็นเอต้นแบบ ที่ถูกเข้าจับได้ด้วยไพรเมอร์อาร์เอพีดี ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาดเล็ก (ขนาดสิบเบส) และมีลำดับแบบสุ่ม (arbitrary sequence) เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว และที่สำคัญคือไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา (Williams และคณะ, 1990) ซึ่งเทคนิคอาร์เอพีดีนี้ได้มีการนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตหลายประเภทเพื่อการศึกษา โครงสร้างทางพันธุกรรม รวมถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละชนิดของสิ่งมีชีวิตจำพวกปลา เช่น การบ่งชี้ชนิดของปลาจำนวน 8 ชนิด โดยการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (Partis และ Wells, 1996) การตรวจสอบเครื่องหมายอาร์เอพีดีของปลาลูกผสมที่เกิดขึ้นจากบราวน์เทราท์กับแอตแลนติคแซลมอล (Elo และคณะ, 1997) และการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรม ของปลาคาร์ฟอินเดียจำนวน 4 ชนิด (Barman และคณะ, 2003) เป็นต้น

การทดลองนี้มีเป้าหมายที่จะตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิด (intra-species) และระหว่างชนิด

(inter-species) โดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD technique) ของม้าน้ำสกุล *Hippocampus* จำนวน 3 ชนิด คือ ม้าน้ำดำ *(H. kuda)* ม้าน้ำหนาม *(H. spinosissimus)* และม้าน้ำสามจุด *(H. trimaculatus)* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างม้าน้ำ

ตัวอย่างของม้าน้ำทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ม้าน้ำดำ (*H. kuda*; n=4) ม้าน้ำหนาม (*H. spinosisimus*; n=4) และม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*; n=3) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและยืนยันชนิดโดยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา โดยม้าน้ำดำจับได้จากบริเวณชายหาดบางแสน ส่วนม้าน้ำหนามและม้าน้ำสามจุดจับได้จากบริเวณ หมู่เกาะแสมสาร ทั้งสองบริเวณอยู่ในจังหวัดชลบุรี ม้าน้ำแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลองจะประกอบไปด้วยม้าน้ำเพศผู้ (ตัวอย่างหมายเลข 1, 2, 5, 6 และ 9) และเพศเมีย (ตัวอย่างหมายเลข 3, 4, 7, 8, 10 และ 11)

2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างม้าน้ำ จะอาศัยเนื้อส่วนโคนหางของม้าน้ำที่ตัดออกมาจากตัวอย่างของม้าน้ำตัวเต็มวัย ซึ่งถูกแช่ไว้ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และเก็บไว้ในที่เย็นเป็นเวลา 2 ปี โดยนำเนื้อที่ได้ประมาณ 50 มิลลิกรัม มาหั่นและบดให้ละเอียดด้วยกรรไกรและโกร่งบด แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Hoelzel (1998) โดยนำตัวอย่างที่ละเอียดใส่ลงไปในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการสกัด (Extraction buffer: 50 mM Tris, pH 7.5; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% (w/v) SDS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเอนไซม์โปรตีเนส-เค (Protenase K: 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 7000 x g เป็นเวลา 5 นาที ย้ายส่วนที่เป็นชั้นน้ำไปใส่ในหลอดใหม่โดยใช้ทิปปลายตัด แล้วนำไปสกัดด้วย ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (25 : 24 : 1) แล้วตามด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (24 : 1) ในปริมาตรเดียวกันอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายชั้นบนมาเติม 3 โมลาร์ ของโซเดียมอะซีเตท ปริมาตร 0.1 เท่า ก่อนที่จะเติมเอธานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol) ที่เย็น ปริมาตร 2 เท่า เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วล้างตะกอนที่ได้ด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ รอจนตะกอนแห้งจึงละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสของเจลอะกาโรสที่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/HindIII (BioLabs)

3. ไพรเมอร์อาร์เอพีดี

ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี เป็นไพรเมอร์ขนาด 10 เบส ที่ออกแบบและผลิตโดย Operon Technologies (Alameda, CA, USA) จำนวน 16 ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์เหล่านี้เป็นไพรเมอร์แบบสุ่ม (random or arbitrary primers) ที่มี GC content เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ซึ่งแสดงพร้อมลำดับนิวคลีโอไทด์ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์อาร์เอพีดี และ GC content

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	GC content
1	OPC-15	GAC GGA TCA G	70
2	OPC-16	CAC ACT CCA G	60
3	OPC-17	TTC CCC CCA G	60
4	OPC-18	TGA GTG GGT G	70
5	OPC-19	GTT GCC AGC C	70
6	OPC-20	ACT TCG CCA C	60
7	OPD-03	GTC GCC GTC A	70
8	OPD-04	TCT GGT GAG G	60
9	OPD-05	TGA GCG GAC A	60
10	OPD-07	TTG GCA CGG G	70
11	OPD-08	GTG TGC CCC A	70
12	OPD-11	AGC GCC ATT G	60
13	OPD-13	GGG GTG ACG A	70
14	OPD-15	CAT CCG TGC T	60
15	OPD-18	GAG AGC CAA C	60
16	OPD-20	ACC CGG TCA C	70

4. การเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี อาศัยการดัดแปลงข้อมูลจาก RAPD 10mer Kit Technical Information (QIAGEN, 2002) และทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermo Hybaid รุ่น Px2 โดยการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอในปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วยไพรเมอร์อาร์เอพีดี ปริมาณ 5 พิโคโมล, สารละลายบัฟเฟอร์ *Taq* DNA Polymerase 10X Buffer, Magnesium Free (100 mM Tris-Cl, pH 8.3; 500 mM KCl; 1% Triton®X-100) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, MgCl2 ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 มิลลิโมลาร์, dNTP แต่ละชนิด อย่างละ 100 ไมโครโมลาร์, สารละลายดีเอ็นเอ 25 นาโนกรัม และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Promega) จำนวน 0.5 ยูนิต แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ภายใต้โปรแกรมจำนวน 45 รอบ ที่ประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 36 องศาเซลเซียส 1 นาที, และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที

5. อิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเจลอะกาโรส

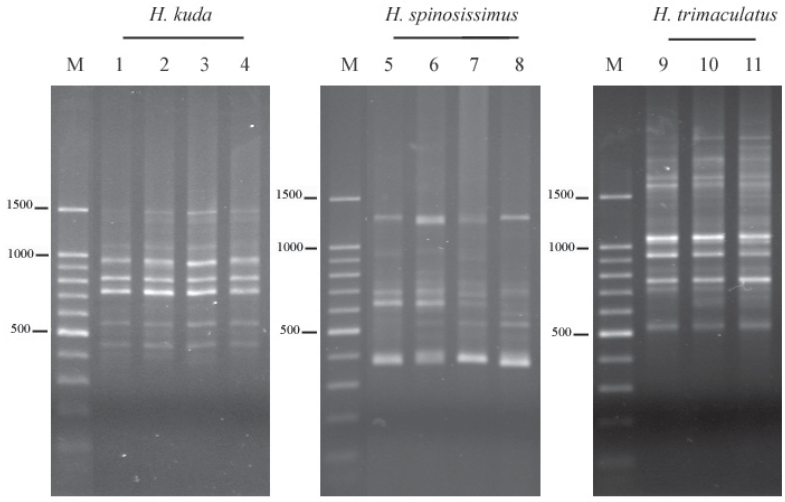
นำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอมาแยกขนาดโดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส (100bp DNA Ladder, Promega) ภายใต้อิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเจลอะกาโรส (15 X 10) ที่ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยใช้เวลาในการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสภายใต้บัฟเฟอร์ 1X TBE ประมาณ 1.5 ชั่วโมง ที่ 10 โวลต์/เซนติเมตร แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นำผลที่ได้มาตรวจสอบและถ่ายภาพโดยเครื่องถ่ายภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Gel document, SYNGENE)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

จากแบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้ของแต่ละตัวอย่างของม้าน้ำนำมาเปรียบเทียบกัน โดยกำหนดให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ (present) แทนค่าเป็น 1 ส่วนแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏ แทนค่าเป็น 0 นำค่าที่ได้มาคำนวณ ค่าความเหมือนในแต่ละคู่ตัวอย่าง (pairwise similarities; S_{AB}) โดยใช้สูตรคำนวณ $S_{AB} = 2\ N_{AB}/(N_A + N_B)$ (อ้างถึงโดย Elo และคณะ, 1997 และ Barman และคณะ, 2003) เมื่อ N_{AB} คือจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งใน A และ B, และ N_A กับ N_B คือจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมดของ A กับ B ตามลำดับ ถ้าให้จำนวนไพรเมอร์เท่ากับ n ดังนั้นค่าเฉลี่ยของค่าความเหมือนในแต่ละคู่ตัวอย่าง (mean pairwise similarities; S) สามารถคำนวณได้จาก $S = \sum SAB / n$ แล้วนำค่า S ที่ได้ของแต่ละคู่ตัวอย่าง มาหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distances; GD) ของแต่ละคู่ตัวอย่าง จากสูตร GD = 1 - S นำข้อมูลที่ได้มาตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติอาศัย One-way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS แล้วนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (GD values) มาสร้างรูปแบบโครงสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram) โดยใช้ UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) ซึ่งอาศัยการนำเสนอโดย CLUSTER ของโปรแกรม SPSS

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

รายงานฉบับนี้เป็นรายงานฉบับแรกที่ได้นำเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของม้าน้ำ 3 ชนิด คือ ม้าน้ำดำ *(H. kuda)* ม้าน้ำหนาม *(H. spinosissimus)* และม้าน้ำสามจุด *(H. trimaculatus)* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จากการตรวจสอบข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มขยายโดยไพรเมอร์อาร์เอพีดี จำนวน 16 ไพรเมอร์ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มขยายของแต่ละไพรเมอร์ ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่นับและปรากฏในแต่ละชนิดนั้น มีตั้งแต่ 4 ถึง 16 แถบ โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเอ ตั้งแต่ 0.30 ถึง 1.60 กิโลเบส (ภาพที่ 1 ตัวอย่างแสดงแบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้จากไพรเมอร์ OPD-07) เมื่อนำข้อมูลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้ของแต่ละชนิดมาคิดเฉลี่ย พบว่าแต่ละไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอสำหรับม้าน้ำดำ ม้าน้ำหนาม และม้าน้ำสามจุด จำนวน 10.0, 10.7 และ 11.4 แถบ ตามลำดับ โดยที่จำนวนของแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับ (the total number of scorable bands) เท่ากับ 513 แถบ และจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่นับและปรากฏในทุกตัวอย่างของแต่ละชนิด (the total number of unique bands) เท่ากับ 400 แถบ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 77.9 ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับ (ตารางที่ 2) ข้อมูลของแถบดีเอ็นเอนี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างม้าน้ำต่างชนิดกันมีแบบแผนอาร์เอพีดีที่ต่างกัน ถ้าหากแบบแผนดังกล่าวแตกต่างจากม้าน้ำชนิดอื่นก็สามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้ชนิดได้เช่นเดียวกัน โดยพิจารณาจากการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และปริมาณหรือความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มขยาย ซึ่งทำให้ได้แบบแผนอาร์เอพีดีที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด เช่น แบบแผนอาร์เอพีดีของไพรเมอร์ OPD-07 (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้จากเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ของตัวอย่างม้าน้ำ 3 ชนิด โดยไพรเมอร์ OPD-07 แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 4 คือ ม้าน้ำดำ *(H. kuda)* ตัวอย่าง หมายเลข 5 ถึง 8 คือ ม้าน้ำหนาม *(H. spinosissimus)* ตัวอย่างหมายเลข 9 ถึง 11 คือ ม้าน้ำสามจุด *(H. trimaculatus)*

ตารางที่ 2 ข้อมูลสรุปสำหรับแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มขยายโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดีที่ได้มีการตรวจสอบ ของม้าน้ำทั้ง 3 ชนิด โดยไพรเมอร์อาร์เอพีดี จำนวน 16 ไพรเมอร์

สปีชีส์	จำนวนของแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับ	จำนวนของแถบดีเอ็นเอที่นับเฉลี่ยต่อไพรเมอร์	จำนวนของแถบดีเอ็นเอที่นับและปรากฏในทุกตัวอย่างของแต่ละชนิด	ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่นับและปรากฏในทุกตัวอย่างของแต่ละชนิด
ม้าน้ำดำ	160	10.0	132	82.5
ม้าน้ำหนาม	171	10.7	114	66.7
ม้าน้ำสามจุด	182	11.4	154	84.6
รวมทั้งหมด	513	-	400	-
ค่าเฉลี่ย	171	10.7	133.3	77.9

ความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ตรวจสอบได้ของตัวอย่างภายในชนิดเดียวกันของม้าน้ำแต่ละชนิด (ตารางที่ 3 และ 4) ม้าน้ำหนามมีค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดสูงสุด คือ 0.129 โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงสุด คือ 0.031 ซึ่งระยะห่างทางพันธุกรรมที่มากนั้นก็อาจกล่าวได้ว่า ตัวอย่างม้าน้ำที่ใช้เกิดจากต่างพ่อแม่กัน และจำนวนรุ่นที่เกิดขึ้นก่อนทำการทดสอบยังไม่มากเท่ากับม้าน้ำดำที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมต่ำสุด คือ 0.052 โดยม้าน้ำดำเป็นม้าน้ำชนิดแรก ที่สถาบันวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สามารถเพาะเลี้ยงขึ้นได้ ซึ่งมีการเพาะเลี้ยงที่ผ่านมาหลายรุ่น แต่ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เกิดขึ้น มีค่ามากเท่ากับ 0.023 อาจเนื่องมาจากจำนวนของพ่อแม่พันธุ์ ที่ใช้มีจำนวนมากเมื่อเทียบกับม้าน้ำประเภทอื่น สำหรับม้าน้ำสามจุดมีค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเท่ากับ 0.056 โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.008 อันอาจจะเนื่องมาจากเป็นม้าน้ำที่พบได้น้อยและเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงได้ไม่นาน ดังที่ผู้วิจัยเสนอแนะ อนึ่ง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เกิดขึ้นอาจเนื่องจากจำนวนตัวอย่าง (n) ที่น้อย

จากการตรวจวิเคราะห์สัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดของม้าน้ำทั้ง 3 ชนิด เมื่อนำมาตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติด้วย One-way ANOVA แล้วพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.001) เมื่อพิจารณาจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด (ตารางที่ 3 และ 4) พบว่าม้าน้ำหนามมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับม้าน้ำสามจุดสูงสุด โดยมีค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมต่ำสุดเท่ากับ 0.318 แต่เมื่อเปรียบเทียบม้าน้ำหนามกับม้าน้ำดำจะมีค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุดซึ่งเท่ากับ 0.393 และเมื่อพิจารณารูปแบบโครงสร้างเดนโดรแกรมของความแตกต่างทางพันธุกรรม

ตารางที่ 3 ตารางแสดงค่าความเหมือนระหว่างคู่ตัวอย่างของม้าน้ำทั้ง 3 ชนิด ที่คำนวณจากการปรากฏ หรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มขยายโดยไพรเมอร์อาร์เอพีดีจำนวน 16 ไพรเมอร์

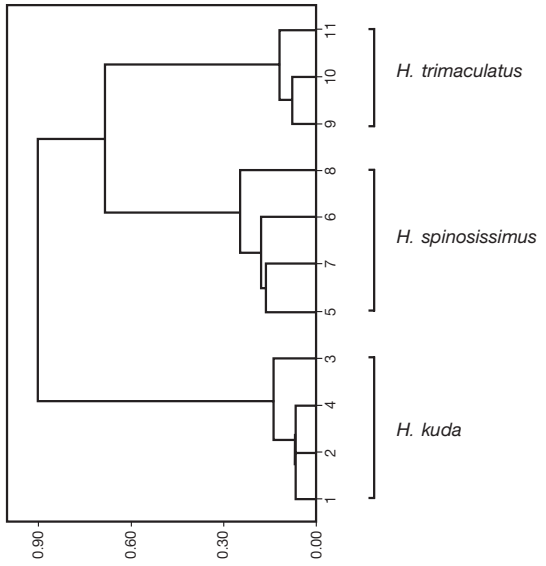
		ม้าน้ำดำ				ม้าน้ำหนาม				ม้าน้ำสามจุด		
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
ม้าน้ำดำ	1	1.000										
	2	0.973	1.000									
	3	0.929	0.915	1.000								
	4	0.968	0.962	0.940	1.000							
ม้าน้ำหนาม	5	0.597	0.601	0.580	0.590	1.000						
	6	0.628	0.637	0.600	0.626	0.893	1.000					
	7	0.593	0.597	0.585	0.594	0.898	0.891	1.000				
	8	0.623	0.629	0.612	0.627	0.830	0.881	0.832	1.000			
ม้าน้ำสามจุด	9	0.669	0.648	0.631	0.646	0.725	0.695	0.685	0.679	1.000		
	10	0.679	0.662	0.633	0.660	0.721	0.697	0.682	0.666	0.951	1.000	
	11	0.664	0.634	0.639	0.642	0.688	0.665	0.651	0.633	0.945	0.935	1.000

ตารางที่ 4 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิด และระหว่างชนิดของม้าน้ำทั้ง 3 ชนิด ที่คำนวณจากการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มขยายโดยไพรเมอร์อาร์เอพีดีจำนวน 16 ไพรเมอร์

	ม้าน้ำดำ	**ม้าน้ำหนาม**	**ม้าน้ำสามจุด**
ม้าน้ำหนาม	0.052 $\pm$ 0.023 0.393 $\pm$ 0.018	0.129 $\pm$ 0.031	
ม้าน้ำสามจุด	0.349 $\pm$ 0.016	0.318 $\pm$ 0.026	0.056 $\pm$ 0.008

$\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

(dendrogram of genetic distance) ของแต่ละตัวอย่างของม้าน้ำ (ภาพที่ 2) โดยใช้ UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) พบว่าลักษณะความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของม้าน้ำทั้ง 3 ชนิดนั้นแตกต่างจากเทคนิคที่อาศัยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีนจำเพาะ 16S rRNA และ cytochrome *b* บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Casey และคณะ, 2003; Teske และคณะ, 2003) ซึ่งในรายงานดังกล่าวม้าน้ำดำกับม้าน้ำหนามจะมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่า โดยม้าน้ำสามจุดมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด ซึ่งผลที่แตกต่างกันนั้นอาจเนื่องมาจากแหล่งที่มาของดีเอ็นเอที่ตรวจสอบแตกต่างกัน เพราะเทคนิคอาร์เอพีดีเป็นการตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของจีโนมิกดีเอ็นเอ แต่การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นเป็นการตรวจสอบที่ตำแหน่งยีนจำเพาะบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ และตัวอย่างของม้าน้ำที่ใช้ในการทดลองนี้มีจำนวนมากกว่าและเป็นตัวอย่างที่อยู่บริเวณอ่าวไทยแถวจังหวัดชลบุรีเท่านั้น ส่วนรายงานที่กล่าวอ้างถึงข้างต้นจะอาศัยการศึกษาม้าน้ำชนิดเดียวกันที่ได้จากแหล่งที่อยู่จากประเทศต่างๆ ทางฝั่งทะเลแปซิฟิก แหล่งละหนึ่งตัวอย่างโดยส่วนใหญ่โดยมีจำนวนตัวอย่างม้าน้ำดำ ม้าน้ำหนาม และม้าน้ำสามจุดที่ใช้ในการรายงานเท่ากับ 9, 2 และ 6 ตัวอย่าง ตามลำดับ



ภาพที่ 2 รูปแบบโครงสร้างเดนโดรแกรมแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรม ที่สร้างจาก UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) ของม้าน้ำ 11 ตัวอย่าง จากม้าน้ำ 3 ชนิดจับได้จากบริเวณจังหวัดชลบุรี แล้วถูกเพาะเลี้ยงโดยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อาศัยการนำเสนอโดย CLUSTER ของโปรแกรม SPSS ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 4 คือ ม้าน้ำดำ *(H. kuda)* ตัวอย่างหมายเลข 5 ถึง 8 คือ ม้าน้ำหนาม *(H. spinosissimus)* ตัวอย่างหมายเลข 9 ถึง 11 คือ ม้าน้ำสามจุด *(H. trimaculatus)*

สรุปผลการทดลอง

เทคนิคอาร์เอพีดีถูกนำมาใช้ในการสร้างรูปแบบโครงสร้างเดนโดรแกรม เพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและช่วยแก้ปัญหาสำหรับการจัดจำแนกกลุ่มและชนิดอย่างกว้างขวาง ถึงอย่างนั้นก็ตามลักษณะเฉพาะที่สำคัญของเทคนิคอาร์เอพีดี ได้แก่ การใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม การไม่จำแนกตำแหน่งที่ถูกตรวจสอบ การเป็นเครื่องหมายที่แสดงถึงลักษณะเด่นของตำแหน่งที่ถูกเพิ่มขยาย และความเป็นไปได้ที่จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกันที่ไม่ได้ถูกเพิ่มขยายจากดีเอ็นเอตำแหน่งเดียวกัน ทำให้เทคนิคนี้มีข้อจำกัดในการนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แต่ถึงแม้จะมีข้อจำกัดข้างต้น แต่การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเทคนิคอาร์เอพีดี ก็สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำที่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างม้าน้ำทั้งภายในชนิด และระหว่างชนิดได้ การศึกษานี้ถือเป็นขั้นแรกของการตรวจสอบเครื่องหมายพันธุกรรมของม้าน้ำเพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ เช่น การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากร การบ่งชี้ชนิด และการศึกษาอย่างเป็นระบบในระดับโมเลกุล

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุกสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2546 ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างม้าน้ำสำหรับการวิจัย และขอขอบคุณคุณกรรณิการ์ ชวนประสิทธิ์กุล และคุณวนิดา อาสน์สถิต ที่ช่วยทำให้งานสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

เสาวภา สวัสดิ์พีระ และวรเทพ มุฑุวรรณ 2543. โครงการคืนม้าน้ำสู่ทะเลเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เนื่องในโอกาสพระราชพิธีมงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 6 รอบ วันที่ 5 ธันวาคม 2542. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี. ISBN 974-546643-3.

Barman, H. K., Barat, A., Yadav, B. M., Banerjee, S., Meher, P. K., Reddy, P. V. G. K., Jana, R. K. 2003. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplied polymorphic DNA assay. *Aquaculture* 217: 115 - 123.

Casey, S. P., Hall, H. J., Stanley, H. F. and Vincent, A. C. J. 2003. The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): a phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 261 - 272.

Elo, K., Ivanoff, S., Vuorinen, J. A. and Piironen, J. 1997. Inheritance of RAPD markers and detection interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture* 152: 55 - 56.

Hoelzel, A. R. 1998. *Molecular Genetic Analysis of Populations*, 2nd., Oxford University Press, New York.

Lourie, S.A., Vincent, A.C.J. and Hall, H.J. 1999. *Seahorse: An identification guide to the world's species and their conservation*. Project Seahorse, London

Partis, L. and Wells, R. J. 1996. Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes* 10: 435 - 441.

Teske, P. R., Cherry, M. I. and Matthee, C. A. 2003. The evolutionary history of seahorses (Syngnathidae: *Hippocampus*): molecular data suggest a West Pacific origin and two invasions of the Atlantic Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 273 - 286.

William, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphishms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531 - 6535.