



# ลายพิมพ์อาร์เอฟแอลพีของปลาการ์ตูนจากดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน COI

เกรียงไกร สมคำ, ชูตา บุญภักดี\* และจันทรา อินทนนท์

## RFLP fingerprinting of anemonefishes based on COI DNA barcode

Kriangkrai Somkham, Chuta Boonphakdee\* and Chantra Indananda

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131

\*Corresponding author. E-mail: chuta@buu.ac.th

### บทคัดย่อ

ปลาการ์ตูน (anemonefish) เป็นปลาทะเลสวยงามที่รู้จักกันดี จัดอยู่ในวงศ์ย่อย (subfamily) Amphiprioninae วงศ์ (family) Pomacentridae ที่อยู่ร่วมกับปลาสลิคหิน (damselfish) สมาชิกถูกจำแนกออกเป็น 2 สกุล (genus) คือ *Amphiprion* และ *Premnas* โดยที่ปลาการ์ตูนวัยอ่อนมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดได้ การศึกษาครั้งนี้จึงประยุกต์ใช้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน *cytochrome c oxidase subunit I (COI)* ที่ถูกบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank (ณ เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561) ศึกษาบริเวณที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยไพรเมอร์สากลในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ขนาด 709 คู่เบส แล้วจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเออาร์เอฟแอลพี (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism) โดยวิธีการจำลองการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AvaII+BsaII+MseI* ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเอกลักษณ์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างปลาการ์ตูนจำนวน 11 ชนิด ในสกุล *Amphiprion* และ *Premnas* ได้ นอกจากนี้ยังสามารถแยกความแตกต่างภายในชนิดของปลาการ์ตูน *A. ocellaris* และ *P. biaculeatus* ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MsiI* และ *CviAII* ตามลำดับ ดังนั้น ผลการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ สำหรับการระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของปลาการ์ตูนได้

คำสำคัญ: การระบุชนิด ปลาสวยงาม ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

### Abstract

Anemonefishes are well-known marine ornamental fishes in a subfamily Amphiprioninae of the family Pomacentridae (damselfish). They are classified into two genera, *Amphiprion* and *Premnas*. However, species discrimination of these animals at a juvenile stage often difficult because of their similar morphological characteristics. In this study, therefore the amplifiable 709 bp fragments of the *cytochrome c oxidase subunit I (COI)*, DNA barcodes deposited in the GenBank database (as of February 2018) were retrieved. DNA fingerprinting of the DNA barcodes was then generated using *in silico* restriction endonucleases digestion with *AvaII+BsaII+MseI*. The obtained RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) patterns were able to discriminate between different 11 anemonefish species of the genus *Amphiprion* and *Premnas*. Moreover, within species of the *A. ocellaris* and *P. biaculeatus* could be distinguishable by using *MsiI* and *CviAII*, respectively. Thus, the results from this study are particularly useful for reliable identification of the anemonefishes at species or strain levels.

Keywords: Clownfish, DNA fingerprint, Mitochondrial DNA, Ornamental fish, Species identification

### บทนำ

ปลาการ์ตูนเป็นกลุ่มปลากระดูกแข็งที่จัดอยู่ในวงศ์ย่อย Amphiprioninae วงศ์ Pomacentridae ร่วมกันกับปลาสลิคหิน โดยในปัจจุบันสำรวจพบปลาการ์ตูน จำนวน 30 ชนิด ที่มีการแพร่กระจายในเขตร้อนของมหาสมุทรอินเดียและแปซิฟิก ซึ่งจำแนกเป็นสกุล *Amphiprion* ที่มีสมาชิกจำนวน 29 ชนิด และอีก 1 ชนิดคือ *Premnas biaculeatus* (Nelson, et al., 2016) โดยในประเทศไทยพบปลาการ์ตูนประจำถิ่น จำนวน 7 ชนิด คือ *A. akallopisos*, *A. clarkii*, *A. ephippium*, *A. ocellaris*, *A. perideraion*, *A. polymnus* และ *A. sebae* (วรวิฑูริ, 2549) ซึ่งมีมูลค่าทางเศรษฐกิจรวมกันประมาณ 20 ล้านดอลลาร์สหรัฐต่อปี (Tlustý & Rhyne, 2016) นอกจากนี้พบว่า อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาการ์ตูนปัจจุบัน

กลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี



มีการใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพในการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้ได้ปลาการ์ตูนที่มีสีสันและลวดลายบนลำตัวที่แปลกใหม่ เพื่อเพิ่มมูลค่าและตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค (ORA, 2017) เป็นผลทำให้การแยกความแตกต่างระหว่างชนิดปลาการ์ตูนที่มีความแปรผันของลักษณะภายนอกนั้นทำได้ยาก และอาจเกิดความผิดพลาดในการระบุชนิดได้ ดังนั้นการแยกความแตกต่างระหว่างชนิดปลาการ์ตูนโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลจึงเป็นวิธีที่เหมาะสม และให้ผลที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่าการใช้วิธีทางสัณฐานวิทยาแบบดั้งเดิม (Allen, 1975; Hillis, 1987)

ปัจจุบันมีข้อมูลชีวสารสนเทศจำนวนมากถูกบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของไมโทคอนเดรียลจีโนม (mitochondrial genome) ของปลาการ์ตูนหลายชนิด ซึ่งรายงานของ Thongtam na Ayudhaya, et al. (2017) พบว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cytochrome c oxidase subunit I (COI)* ที่อยู่ในไมโทคอนเดรียลจีโนม มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอจำแนกชนิดของปลาการ์ตูน เช่นเดียวกับมีการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน *COI* เพื่อการจำแนกสัตว์หลายกลุ่ม เช่น สัตว์มีกระดูกสันหลัง มอลลัสก์ และอาร์โธรพอด เป็นต้น (Hebert, et al., 2003) แต่อย่างไรก็ตาม การบ่งชี้ชนิดปลาการ์ตูนในทางปฏิบัติด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้นจำเป็นต้องทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ที่ต้องใช้เวลาและมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง การใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism; PCR–RFLP) ในการสร้างลายพิมพ์อาร์เอฟแอลพี ที่อาศัยตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และสามารถตรวจสอบได้บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) จึงเป็นทางเลือกที่ประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่า และให้ผลที่เชื่อถือได้เช่นกัน (Rasmussen, 2012) ดังนั้น การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะใช้ประโยชน์จากข้อมูลชีวสารสนเทศศึกษาในส่วนของยีน *COI* จำลองเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำเพาะในเทคนิค *in silico* PCR–RFLP โดยค้นหาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่มีรูปแบบแตกต่างกันระหว่างชนิดหรือสายพันธุ์ของปลาการ์ตูนที่สามารถลดโอกาสเกิดข้อผิดพลาด ประหยัดค่าใช้จ่าย และลดจำนวนปลาการ์ตูนสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาจริง

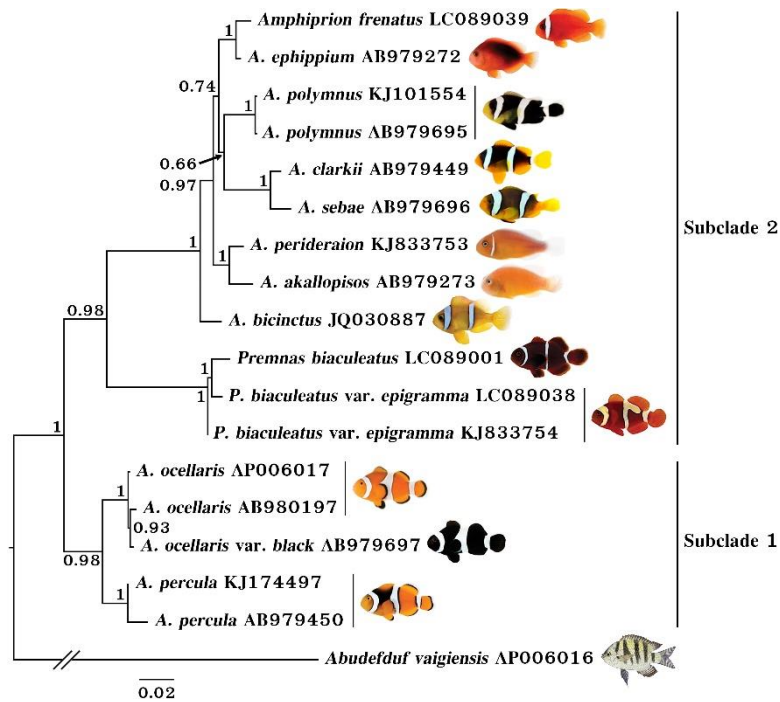
### วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน *COI* ที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูล GenBank ณ เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561 จำนวน 17 ข้อมูล ของปลาการ์ตูนจำนวน 11 ชนิด (สกุล *Amphiprion* จำนวน 14 ข้อมูล และสกุล *Premnas* จำนวน 3 ข้อมูล) มากำหนดบริเวณที่ถูกเพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยคู่ไพรเมอร์สากล LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G) และ HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA) (Folmer, et al., 1994) ซึ่งจะได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 709 คู่เบส จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่กำหนดมาเทียบเคียงความเหมือน (alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalX 2.1 (Larkin, et al., 2007) และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยการทำ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MrBayes 3.2 (Ronquist, et al., 2012) สร้างด้วยวิธีการอนุมานแบบเบย์ (Bayesian inference) โมเดล HKY+G วิเคราะห์ด้วยสถิติมอนติคาร์โลลูกโซ่มาร์คอฟ (Markov Chain Monte Carlo) จำนวน 4 ลูกโซ่ ที่มีความยาว 1,000,000 generations และวิเคราะห์ค่าความน่าจะเป็นของเบย์ (Bayesian posterior probability) แสดงที่จุดร่วมของสายวิวัฒนาการ อนึ่ง ทำการวิเคราะห์และเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะในฐานข้อมูล REBASE (Roberts, et al., 2003) และจำลองลายพิมพ์อาร์เอฟแอลพีที่เป็นเอกลักษณ์ของปลาการ์ตูนแต่ละชนิดด้วยโปรแกรม NEBcutter 2.0 (Vincze, et al., 2003)

### ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน *COI* ขนาด 709 คู่เบส ของปลาการ์ตูน 11 ชนิด พบว่าปลาการ์ตูนในวงศ์ย่อย Amphiprioninae เป็น monophyletic clade ที่มีสายวิวัฒนาการแยกออกเป็น 2 เคลดย่อย (subclade) ได้แก่ 1) เคลดย่อยของปลาการ์ตูนชนิด *A. ocellaris* และ *A. percula* และ 2) เคลดย่อยของปลาการ์ตูนในสกุล *Amphiprion* จำนวน 8 ชนิด (*A. akallopisos*, *A. bicinctus*, *A. clarkii*, *A. ephippium*, *A. frenatus*, *A. perideraion*, *A. polymnus* และ *A. sebae*) ร่วมกับ *P. biaculeatus* (รูปที่ 1) แตกต่างจากรายงานของ

Thongtam na Ayudhaya, et al. (2017) ที่ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาการ์ตูนจำนวน 10 ชนิดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA, cytochrome b (CYB) และ COI ร่วมกัน พบว่าสายวิวัฒนาการแยกออกเป็น 2 เคลดย่อย เป็นของปลาการ์ตูนสกุล *Amphiprion* (จำนวน 9 ชนิด) และชนิด *P. biaculeatus* ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกัน ผลการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของไมโทคอนเดรียลจีโนมที่แปลรหัสเป็นโปรตีน (Li, et al., 2015) และยีนในนิวเคลียร์จีโนม (nuclear genome) จำนวน 7 ยีน ได้แก่ *BMP4*, *Glyt*, *Hox6*, *RAG1*, *S7*, *Svep* และ *Zic1* (Litsios & Salamin, 2014) ซึ่งรายงานว่าสายวิวัฒนาการของปลาการ์ตูนแยกเป็น 2 เคลดย่อย โดยในเคลดย่อยที่หนึ่งมีสมาชิกเป็น *A. ocellaris*, *A. percula* และ *P. biaculeatus* ส่วนในเคลดย่อยที่สองมีสมาชิกเป็นปลาการ์ตูนสกุล *Amphiprion* ชนิด *A. akallopisos*, *A. akindynos*, *A. allardi*, *A. barberi*, *A. bicinctus*, *A. chagosensis*, *A. chrysogaster*, *A. clarkii*, *A. ephippium*, *A. frenatus*, *A. latifasciatus*, *A. leucokranos*, *A. mccullochi*, *A. melanopus*, *A. nigripes*, *A. omanensis*, *A. pacificus*, *A. perideraion*, *A. polymnus*, *A. rubrocinctus*, *A. sandaracinos*, *A. sebae*, *A. thiellei* และ *A. tricinctus*



รูปที่ 1 Phylogenetic tree จากบริเวณดีเอ็นเออาร์โคไลด์ของยีน COI ของปลาการ์ตูน จำนวน 11 ชนิด ที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) ปลาสลิดหินบั้ง (*Abudedefduf vaigiensis*) สร้างด้วยวิธีการอนุมานแบบเบย์ (Bayesian inference) ซึ่งแสดงค่าความน่าจะเป็นของเบย์ (Bayesian posterior probability) ที่จุดร่วมของสายวิวัฒนาการ

ในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาการ์ตูนจำนวน 11 ชนิด (17 ข้อมูล) ของยีน COI ขนาด 709 คู่เบส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด (triple digestion) คือ *AvaII*+*BsaJI*+*MseI* ปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 11 รูปแบบ ที่เป็นเอกลักษณ์ของปลาการ์ตูนชนิด *A. akallopisos*, *A. bicinctus*, *A. clarkii*, *A. ephippium*, *A. frenatus*, *A. ocellaris*, *A. percula*, *A. perideraion*, *A. polymnus*, *A. sebae* และ *P. biaculeatus* (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2) โดยรูปแบบของแถบดีเอ็นเอสามารถนำไปใช้แยกความแตกต่างระหว่างชนิดปลาการ์ตูนดังกล่าวได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แถบดีเอ็นเอมีขนาดตั้งแต่ 52-353 คู่เบส ซึ่งปลาการ์ตูนชนิด *A. ocellaris* และ *A. percula* ที่ถูกจัดอยู่ในเคลดย่อยเดียวกันจากการศึกษาครั้งนี้ มีแถบดีเอ็นเอขนาด 52 คู่เบส เป็นเอกลักษณ์ที่ไม่พบในปลาการ์ตูนชนิดอื่น ผลการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากการวิเคราะห์หลายพิมพ์อาร์เอฟแอลพี จากลำดับ

กลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี



นิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA และยีน CYB ของปลาการ์ตูน 6 ชนิด (*A. ocellaris*, *A. percula*, *A. perideraion*, *A. polymnus*, *A. sandaracinos* และ *P. biaculeatus*) ที่รายงานโดย Boonphakdee and Sawangwong (2008) ที่พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ *BfuCI*+*RsaI* ตัดสายดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ในบริเวณที่ถูกเพิ่มจำนวนได้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ขนาด 623 คู่เบส สามารถแยกความแตกต่างของปลาการ์ตูน *P. biaculeatus* ออกจากปลาการ์ตูนสกุล *Amphiprion* ได้ แต่แยกปลาการ์ตูนภายในสกุล *Amphiprion* ได้เป็น 2 กลุ่ม เท่านั้น ในขณะที่ เมื่อใช้เอนไซม์ *HinfI*+*RsaI* ตัดสายดีเอ็นเอของยีน CYB ในบริเวณที่ถูกเพิ่มจำนวนได้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ขนาด 786 คู่เบส สามารถแยกความแตกต่างระหว่างปลาการ์ตูนได้ทั้ง 6 ชนิด รวมถึงปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันภายในชนิดของปลาการ์ตูน *A. ocellaris* จำนวน 2 รูปแบบ ซึ่งจำเพาะกับสายพันธุ์ *A. ocellaris* และ *A. ocellaris* var. *black*

อย่างไรก็ตาม การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน COI ในครั้งนี้พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *MspI* ตัดสายดีเอ็นเอของยีน COI ของปลาการ์ตูนชนิด *A. ocellaris* ปรากฏลายพิมพ์อาร์เอฟแอลพีที่สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของปลาการ์ตูน *A. ocellaris* มีแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ (597 และ 112 คู่เบส) กับ *A. ocellaris* var. *black* มีแถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ (709 คู่เบส) ได้ ในทำนองเดียวกัน รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีน COI ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *CviAII* สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างของปลาการ์ตูนระหว่างสายพันธุ์ *P. biaculeatus* ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ (231, 221, 159 และ 98 คู่เบส) กับ *P. biaculeatus* var. *epigramma* ที่มีแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ (329, 221 และ 159 คู่เบส) (รูปที่ 3) ได้เช่นกัน

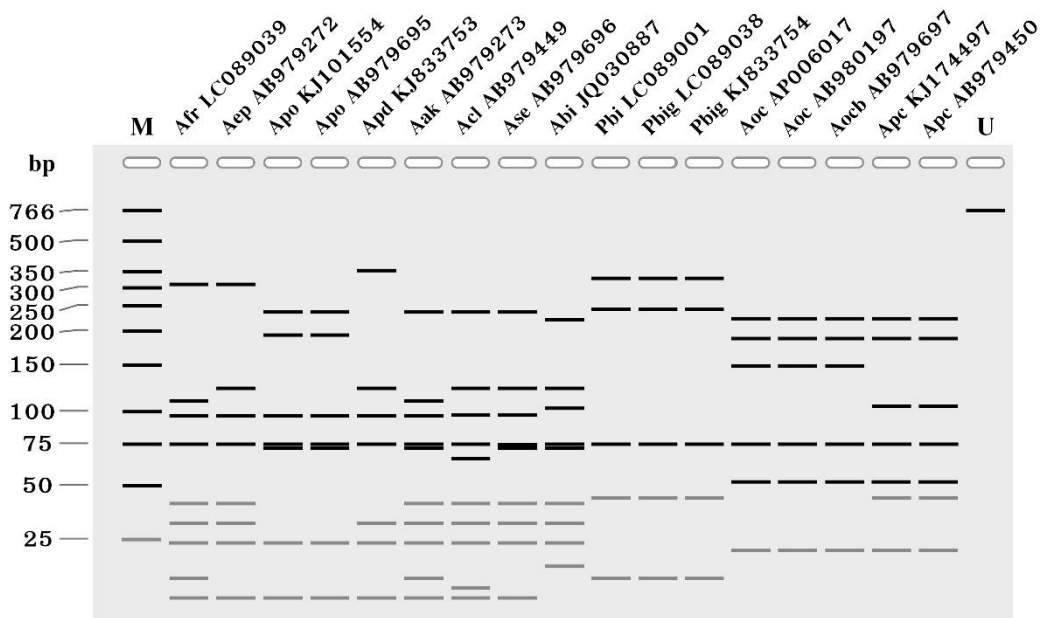
ตารางที่ 1 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน COI ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *AvaII*+*BsaII*+*MseI* และให้รูปแบบลายพิมพ์อาร์เอฟแอลพีที่แตกต่างกันระหว่างชนิดของปลาการ์ตูน

| ชนิดปลาการ์ตูน                | ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)* |         |         |          |            |
|-------------------------------|-------------------------------|---------|---------|----------|------------|
|                               | >250                          | 200-249 | 150-199 | 100-149  | 50-99      |
| <i>Amphiprion akallopisos</i> |                               | 238     |         | 111      | 98, 75, 74 |
| <i>A. bicinctus</i>           |                               | 223     |         | 122, 103 | 75, 74     |
| <i>A. clarkii</i>             |                               | 238     |         | 122      | 98, 75, 66 |
| <i>A. ephippium</i>           | 312                           |         |         | 122      | 98, 75     |
| <i>A. frenatus</i>            | 312                           |         |         | 111      | 98, 75     |
| <i>A. ocellaris</i>           |                               | 225     | 187     | 149      | 75, 52     |
| <i>A. percula</i>             |                               | 225     | 187     | 105      | 75, 52     |
| <i>A. perideraion</i>         | 353                           |         |         | 122      | 98, 75     |
| <i>A. polymnus</i>            |                               | 238     | 195     |          | 98, 75, 74 |
| <i>A. sebae</i>               |                               | 238     |         | 122      | 98, 75, 74 |
| <i>Premnas biaculeatus</i>    | 333                           | 246     |         |          | 75         |

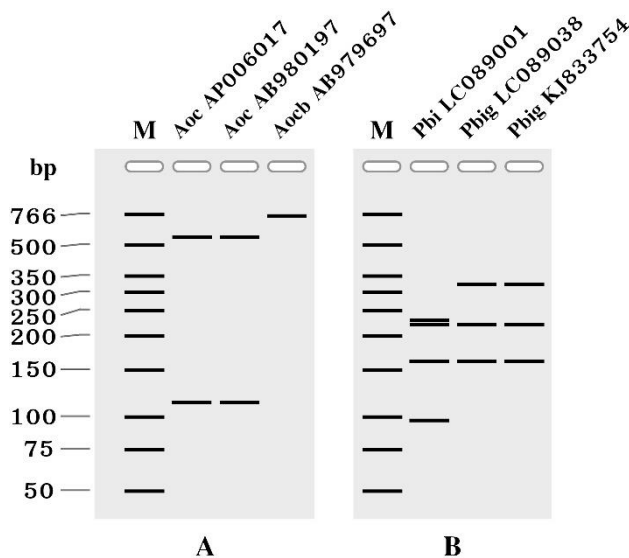
หมายเหตุ

\* = แสดงผลชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด > 50 คู่เบส

ตัวเลขขีดเส้นใต้ = แถบหนา 1 แถบ ของชิ้นดีเอ็นเอ > 1 ชิ้น บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส



รูปที่ 2 ลายพิมพ์อาร์เอฟแอลพีที่แตกต่างกันระหว่างชนิดของปลาการ์ตูน วิเคราะห์จากบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน *COI* ขนาด 709 คู่เบส ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *AvaII+BsaJI+MseI* ด้วยเทคนิค *in silico* PCR-RFLP บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน low molecular weight DNA marker (M) และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ (U); ชื่อย่อนชนิดปลาการ์ตูนตามด้วย GenBank accession number: Aak = *Amphiprion akallopisos*, Abi = *A. bicinctus*, Acl = *A. clarkii*, Aep = *A. ephippium*, Afr = *A. frenatus*, Aoc = *A. ocellaris*, Aocb = *A. ocellaris* var. *black*, Apc = *A. percula*, Apd = *A. perideraion*, Apo = *A. polymnus*, Ase = *A. sebae*, Pbi = *Premnas biaculeatus*, Pbig = *P. biaculeatus* var. *epigramma*; แถบดีเอ็นเอขนาด < 50 คู่เบส อาจไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทร-ฟอริซิส



รูปที่ 3 ลายพิมพ์อาร์เอฟแอลพีที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ของปลาการ์ตูนชนิด *Amphiprion ocellaris* และ *Premnas biaculeatus* วิเคราะห์จากบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน *COI* ขนาด 709 คู่เบส ด้วยเทคนิค *in silico* PCR-RFLP บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน low molecular weight DNA marker (M); A = ตัดด้วยเอนไซม์ *MseII*; B = ตัดด้วยเอนไซม์ *CviAII*; ชื่อย่อนชนิดปลาการ์ตูนตามด้วย GenBank accession number: Aoc = *A. ocellaris*, Aocb = *A. ocellaris* var. *black*, Pbi = *P. biaculeatus*, Pbig = *P. biaculeatus* var. *epigramma*





การศึกษาครั้งนี้เป็นการประยุกต์ใช้ข้อมูลชีวสารสนเทศในฐานข้อมูล GenBank บริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน COI ขนาด 709 คู่เบส มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เอกลักษณ์ของปลาการ์ตูนแต่ละชนิดและสายพันธุ์ โดยทำการศึกษาจำรองด้วยวิธีการจำลองลายพิมพ์อาร์เอฟแอลพีบนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถย่นระยะเวลาและประหยัดค่าใช้จ่ายได้มากกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธีการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการจริงที่ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของตัวอย่างปลาการ์ตูนที่ไม่ทราบชนิดด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วนำผลผลิตมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AvaII+BsaII+MseI* ตรวจสอบผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้น 2% ร่วมกับการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน low molecular weight DNA marker ก็จะสามารถระบุชนิดและสายพันธุ์ของปลาการ์ตูนได้จริง แต่อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในห้องปฏิบัติการจริงอีกครั้งโดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของปลาการ์ตูนที่ทราบและไม่ทราบชนิด เพื่อยืนยันการใช้ได้ของแบบจำลองลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการศึกษาในกลุ่มปลาการ์ตูนที่มีลักษณะความแปรผันหรือในปลาการ์ตูนระยะวัยอ่อนที่ไม่สามารถใช้วิธีการจัดจำแนกด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาแต่เพียงอย่างเดียว

### สรุปผลการศึกษา

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน COI ขนาด 709 คู่เบส ของปลาการ์ตูน จำนวน 11 ชนิด ที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ณ เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561 พบว่า ปลาการ์ตูนที่จัดอยู่ในวงศ์ย่อย Amphiprioninae มีบรรพบุรุษร่วมกัน และในบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน COI มีความแตกต่างกันระหว่างชนิดของปลาการ์ตูน ซึ่งเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นไปจำลองการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ร่วมกัน 3 ชนิด คือ *AvaII+BsaII+MseI* ได้ลายพิมพ์อาร์เอฟแอลพีของปลาการ์ตูนที่แตกต่างกัน จำนวน 11 รูปแบบ ที่เป็นเอกลักษณ์ของปลาการ์ตูนแต่ละชนิด นอกจากนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI ที่ศึกษาของปลาการ์ตูนชนิด *A. ocellaris* และ *P. biaculeatus* เมื่อนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseII* และ *CviAII* ตามลำดับ ปรากฏลายพิมพ์อาร์เอฟแอลพีที่สามารถบ่งชี้ปลาการ์ตูนในระดับสายพันธุ์ได้

### กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) กระทรวงศึกษาธิการ

### เอกสารอ้างอิง

- วรวุฒิ เกิดปราง. (2549). *ปลาการ์ตูน Anemonefish*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- Allen, G. R. (1975). *The anemonefishes: Their classification and biology* (2<sup>nd</sup> ed.). Neptune, NJ: T.F.H. Publications.
- Boonphakdee, C., & Sawangwong, P. (2008). Discrimination of anemonefish species by PCR-RFLP analysis of mitochondrial gene fragments. *EnvironmentAsia*, 1, 51–54. <https://doi.org/10.14456/ea.2008.7>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hillis, D. M. (1987). Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 23–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.000323>



- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Li, J., Chen, X., Kang, B., & Liu, M. (2015). Mitochondrial DNA genomes organization and phylogenetic relationships analysis of eight anemonefishes (Pomacentridae: Amphiprioninae). *PLoS One*, 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123894>
- Litsios, G., & Salamin, N. (2014). Hybridisation and diversification in the adaptive radiation of clownfishes. *BMC Evolutionary Biology*, 14, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12862-014-0245-5>
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. H. (2016). *Fishes of the world* (5<sup>th</sup> ed.). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- ORA. (2017). *ORA clownfish. Oceans, Reefs & Aquariums (ORA) farm of the Florida Atlantic University's Harbor Branch Campus*. Retrieved from <https://www.orafarm.com/products/fish/clownfish>
- Rasmussen, H. B. (2012). Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis – valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. In S. Magdeldin (Ed.), *Gel Electrophoresis – Principles and Basics* (pp. 315–334). Rijeka, Croatia: InTech. <https://doi.org/10.5772/37724>
- Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J. P., & Macelis, D. (2003). REBASE: Restriction enzymes and methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, 31, 418–420. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg069>
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). Mrbayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Thongtam na Ayudhaya, P., Muangmai, N., Banjongsat, N., Singchat, W., Janekitkarn, S., Peyachoknagul, S., & Srikulnath, K. (2017). Unveiling cryptic diversity of the anemonefish genera *Amphiprion* and *Premnas* (Perciformes: Pomacentridae) in Thailand with mitochondrial DNA barcodes. *Agriculture and Natural Resources*, 51, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2017.07.001>
- Tlusty, M., & Rhyne, A. (2016). *Finding Nemo and Dory is easy, deciding whether they should be pets is harder. The conversation*. Retrieved from <https://theconversation.com/finding-nemo-and-dory-is-easy-deciding-whether-they-should-be-pets-is-harder-60355>
- Vincze, T., Posfai, J., & Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31, 3688–3691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg526>