



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในปลากัดป่าภาคกลาง (*Betta splendens*,
Osphronemidae, *Perciformes*) และการทดสอบข้ามชนิด
Development of Microsatellite Markers from a Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*,
Osphronemidae, *Perciformes*) and Cross-Species Amplification in Closely Related

นามผู้วิจัย นายวิศรุต ชัยเลิศฤทธิ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จินตนา สและน้อย, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ครุสร ศรีกุลนาถ, ปร.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์อัครพงษ์ สวัสดิพงษ์, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันท์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสิงห์ มทาวินทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในปลากัดป่าภาคกลาง (*Betta splendens*,
Osphronemidae, Perciformes) และการทดสอบข้ามชนิด

Development of Microsatellite Markers from a Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*,
Osphronemidae, Perciformes) and Cross-Species Amplification in Closely Related Species

โดย

นายวิศรุต ชัยเลิศฤทธิ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศรุต ชัยเลิศฤทธิ์ 2557: การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในปลากัดป่าภาคกลาง (*Betta splendens*, Osphronemidae, Perciformes) และการทดสอบข้ามชนิด
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
เกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์จินตนา สละน้อย, วท.ค. 87 หน้า

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 10 ตำแหน่ง ได้พัฒนาขึ้นจากปลากัดป่าภาคกลาง (*Betta splendens*) และนำไปทดสอบกับตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลางที่เก็บจากจังหวัดนครปฐมจำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่า 9 ตำแหน่ง มีลักษณะโพลิเมอร์เฟอรัส โดยมีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (N_A) อยู่ระหว่าง 2 ถึง 6 แอลลีล ค่า effective number of allele (N_E) อยู่ระหว่าง 0.62 ถึง 2.57 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.96) ค่า observed heterozygosity (H_O) อยู่ระหว่าง 0.13 ถึง 0.67 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.39) ค่า expected heterozygosity (H_E) อยู่ระหว่าง 0.29 ถึง 0.63 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.50) จากการทดสอบ linkage disequilibrium ไม่พบสภาพ linkage ของทุกตำแหน่ง เมื่อทดสอบสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่ามี 2 ตำแหน่ง (BettaMS23 และ BettaMS 28) ที่ไม่อยู่ในสมดุล เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์กับปลากัดชนิดอื่นๆ พบว่ามี 6 ตำแหน่งสามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ในปลากัดป่าภาคใต้ (*Betta imbellis*) และมี 3 ตำแหน่งให้ผลผลิตพีซีอาร์ในปลากัดป่าภาคอีสาน (*Betta smaragdina*) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากร ตลอดจนวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ปลากัดในโรงเพาะฟักได้ต่อไป

Visarut Chailertit 2014: Development of Microsatellite Markers from a Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*, Osphronemidae, Perciformes) and Cross-Species Amplification in Closely Related Species. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Jintana Salaenoi, Ph.D. 87 pages.

Ten novel microsatellite markers were developed and characterized from Siamese fighting fish (*Betta splendens*). Nine of ten markers were polymorphic, exhibiting an allelic number (N_A) from 2 to 6 alleles per locus. The effective number of alleles (N_E) ranged from 0.62 to 2.57 (average of 1.96). The observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities ranged from 0.13 to 0.67 (average of 0.39) and 0.29 to 0.63 (average of 0.50), respectively. Linkage disequilibrium was not significantly detected for any pair of loci, and only two loci (BettaMS23 and BettaMS28) showed significant deviations from Hardy–Weinberg expectations. Of these, six loci could be amplified in genomic DNA of the closely related species *B. imbellis* and three loci in *B. smaragdina*. These microsatellite markers could be used as a tool to investigate genetic diversity and population structure, as well as breeding programs in hatcheries.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จินตนา สและน้อย ประธานกรรมการที่
ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร. ครุฑ ศรีกฤษณา และ ดร. อัครพงษ์ สวัสดิพงษ์ กรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ
ลุล่วงไปด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อมรา ทองปาน ผู้แทนบัณฑิต
วิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ และ ดร. จตุพร กุลอึ้ง สำหรับ
คำปรึกษาในการทำวิจัย ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ ปิยะ โขคณากุล ที่ให้
คำปรึกษาในการทำวิจัย และคำแนะนำสำหรับการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการ
อุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกคนที่ให้การช่วยเหลือในการทำงาน
วิจัยชิ้นนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณป้า คุณแม่ คุณพ่อ และทุกคนในครอบครัวที่ให้กำลังใจ
และคอยสนับสนุนมาโดยตลอด

วิศรุต ชัยเลิศฤทธิ์
กรกฎาคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	20
สรุปและข้อเสนอแนะ	46
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	48
ภาคผนวก	56
ภาคผนวก ก การสร้างโคลนที่มีดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธี SSR enrichment (Yaish and Vega, 2003)	57
ภาคผนวก ข การตรวจสอบและคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์	64
ภาคผนวก ค การทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนโพลีอะครีลาไมด์เจล ความเข้มข้น 6% และ การย้อมเจลที่ได้ด้วยวิธี silver staining	69
ภาคผนวก ง การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอจากเจลเพื่อหาดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์	73
ภาคผนวก จ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในทุกตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ที่ได้ฝากข้อมูลไว้ในฐานข้อมูล DDBJ (DNA Data Bank of Japan, www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html)	78
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	87

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ข้อมูลการเป็นการข่มแบบร่วม (codominance) ระดับโพลิมอร์ฟิซึม ตำแหน่งจำเพาะระดับของเทคนิคที่ใช้ และค่าใช้จ่ายในแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ	11
2 จำนวนโคลนและร้อยละของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ในแต่ละชนิด	24
3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำและอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ จำนวน 10 ตำแหน่งที่พัฒนาได้จากปลากัด	26
4 Genbank accession number (ภาคผนวก จ), ช่วงขนาดของแอลลีล, จำนวนแอลลีล (N_A), จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E), ค่า observed heterozygosity (H_O), ค่า expected heterozygosity (H_E) และค่า P-value ของสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก (P-HWE) จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 10 ตำแหน่ง ที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ในปลากัดป่าภาคกลาง (<i>Betta splendens</i>)	32
5 Genbank accession number (ภาคผนวก จ), ช่วงขนาดของแอลลีล, จำนวนแอลลีล (N_A), จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E), ค่า observed heterozygosity (H_O), ค่า expected heterozygosity (H_E) และค่า P-value ของสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก (P-HWE) จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 3 ตำแหน่ง ที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ในปลากัดป่าภาคอีสาน (<i>Betta smaragdina</i>)	38
6 Genbank accession number (ภาคผนวก จ), ช่วงขนาดของแอลลีล, จำนวนแอลลีล (N_A), จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E), ค่า observed heterozygosity (H_O), ค่า expected heterozygosity (H_E) และค่า P-value ของสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก (P-HWE) จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 6 ตำแหน่ง ที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ในปลากัดป่าภาคใต้ (<i>Betta imbellis</i>)	43
7 ขนาดแอลลีล (คู่เบส) จากไมโครแซทเทลไลต์แต่ละตำแหน่งในปลากัดป่า 3 ชนิด (<i>Betta splendens</i> , <i>Betta smaragdina</i> และ <i>Betta imbellis</i>)	45

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
1 ค่าการทดสอบ linkage disequilibrium ของเครื่องหมายดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง ในปลากัดป่าภาคกลาง (<i>Betta splendens</i>)	85
2 ค่าการทดสอบ linkage disequilibrium ของเครื่องหมายดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง ในปลากัดป่าภาคอีสาน (<i>Betta smaragdina</i>)	86
3 ค่าการทดสอบ linkage disequilibrium ของเครื่องหมายดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง ในปลากัดป่าภาคใต้ (<i>Betta imbellis</i>)	86

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การแพร่กระจายของปลากัดในประเทศไทย	5
2 ปลากัดป่าภาคกลาง (<i>Betta splendens</i>) (ก) ปลากัดป่าภาคอีสาน (<i>Betta smaragdina</i>) (ข) และปลากัดป่าภาคใต้ (<i>Betta imbellis</i>) (ค)	7
3 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลาในสกุล <i>Betta</i> (แถบสีดำคือปลากัดกลุ่มก่อหวอด, แถบสีเทาคือปลากัดกลุ่มอมไข่ และจุดสีดำนี้อาณาเขตอื่นๆ)	9
4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลากัด 7 ชนิด (Bsp = <i>Betta splendens</i> , Bim = <i>Betta imbellis</i> , Bsm = <i>Betta smaragdina</i> , Bpi = <i>Betta pi</i> , Bpn = <i>Betta pugnax</i> , Bsi = <i>Betta simplex</i> และ Bpr = <i>Betta prima</i>)	9
5 แผนที่แสดงบริเวณที่เก็บตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลาง (<i>Betta splendens</i>) ปลากัดป่าภาคอีสาน (<i>Betta smaragdina</i>) และปลากัดป่าภาคใต้ (<i>Betta imbellis</i>)	16
6 ผลการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ (ก) และผลผลิตพีซีอาร์หลังจากการตัดและต่อดีเอ็นเอปลากัด (ข) ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1% ใน TAE buffer	21
7 ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกสอดในพลาสมิดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% ใน TAE buffer	22
8 ผลการทำ dot blot hybridization ใน enriched library	23
9 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS4 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง	27
10 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS5 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง	27
11 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS8 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง	28
12 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS14 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง	28
13 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS15 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง	29

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
14 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS17 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง	29
15 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS23 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง	30
16 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS25 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง	30
17 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS28 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง	31
18 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS40 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง	31
19 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS4 ในปลากัดป่าภาคอีสานจำนวน 15 ตัวอย่าง	36
20 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS14 ในปลากัดป่าภาคอีสานจำนวน 15 ตัวอย่าง	37
21 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS28 ในปลากัดป่าภาคอีสานจำนวน 15 ตัวอย่าง	37
22 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS4 ในปลากัดป่าภาคใต้จำนวน 15 ตัวอย่าง	39
23 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS8 ในปลากัดป่าภาคใต้จำนวน 15 ตัวอย่าง	40
24 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS15 ในปลากัดป่าภาคใต้จำนวน 15 ตัวอย่าง	40
25 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS17 ในปลากัดป่าภาคใต้จำนวน 15 ตัวอย่าง	41
26 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS25 ในปลากัดป่าภาคใต้จำนวน 15 ตัวอย่าง	41

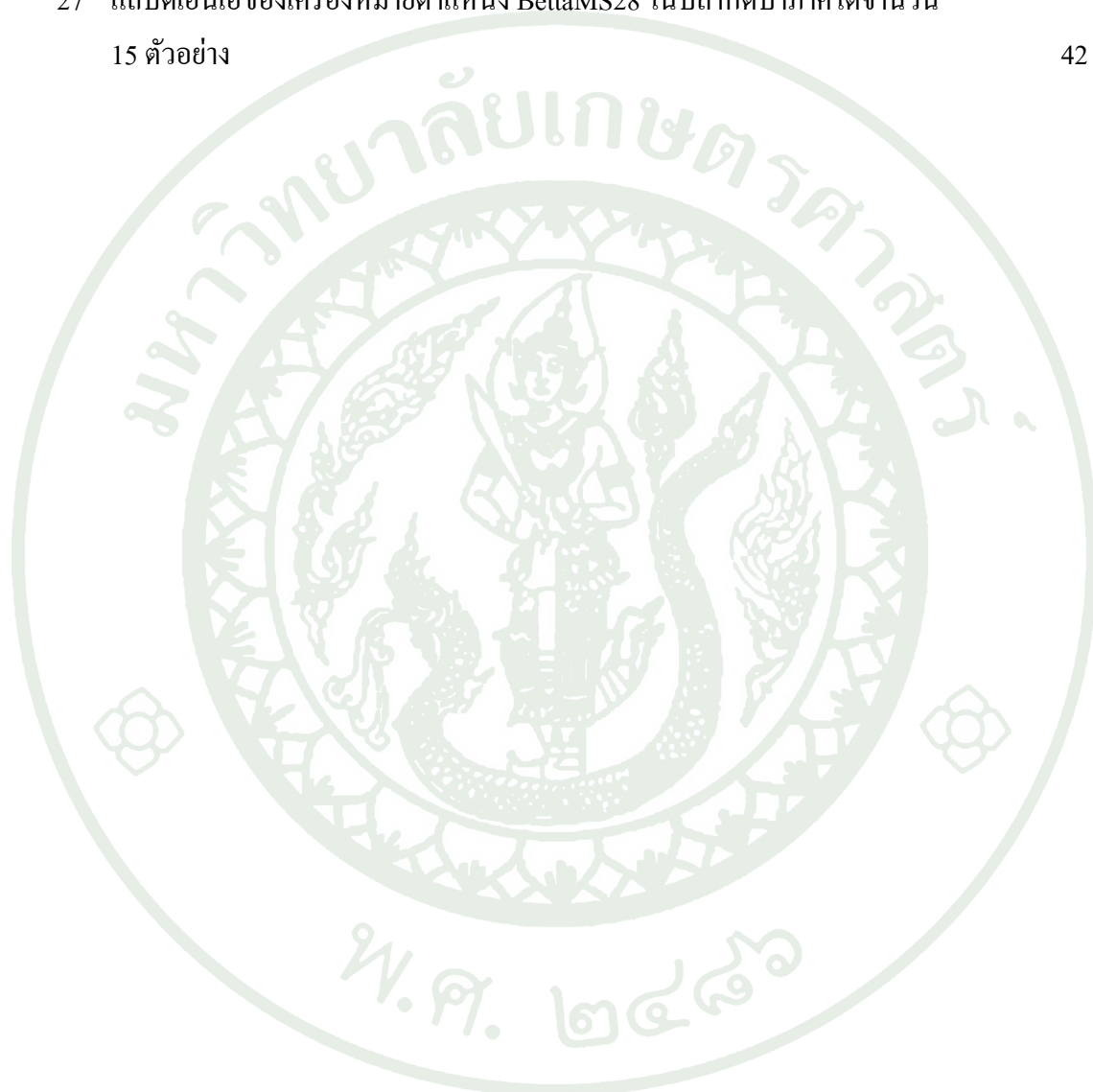
สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 27 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS28 ในปลากัดป่าภาคใต้จำนวน
15 ตัวอย่าง

42



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	=	Amplified Fragment Length Polymorphism
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
H _E	=	Expected heterozygosity
H _O	=	Observed heterozygosity
HWE	=	Hardy–Weinberg equilibrium
IPTG	=	Isopropyl–beta–D–thiogalactopyranoside
ISSR	=	Inter–simple sequence repeat
N _E	=	Effective number of alleles
mM	=	Millimolar
PCR	=	Polymerase chain reaction
Pmol	=	Picomol
RAPD	=	Random amplification of polymorphic DNA
RFLP	=	Restriction fragment length polymorphism
SCAR	=	Sequenced Characterized Amplified Region
SDS	=	Sodium dodecyl sulfat
SNP	=	Single–nucleotide polymorphism
SSC	=	Saline Sodium Citrate
TAE	=	Tris/Acetate/EDTA
TBE	=	Tris/Borate/EDTA
U	=	Unit
X–gal	=	5–bromo–4–chloro–3–indolyl–beta–D–galacto–pyranoside
μl	=	Microliter
μM	=	Micromolar

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในปลากัดป่าภาคกลาง (*Betta splendens*,
Osphronemidae, *Perciformes*) และการทดสอบข้ามชนิด

Development of Microsatellite Markers from a Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*, *Osphronemidae*, *Perciformes*) and Cross-Species Amplification in Closely Related Species

คำนำ

ปลากัด (*Betta splendens*) เป็นปลาพื้นเมืองดั้งเดิมของประเทศไทย มีชื่อสามัญว่า Siamese fighting fish พบการแพร่กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ปลากัดเป็นที่รู้จักกันดีทั้งในประเทศและต่างประเทศ มีผู้นิยมนำมาเลี้ยงอย่างกว้างขวางทั้งเพื่อความสวยงามและเพื่อใช้กัดกันสำหรับการกีฬา โดยปลากัดสามารถทำรายได้เข้าสู่ประเทศปีละไม่ต่ำกว่า 100 ล้านบาท และความต้องการปลากัดในตลาดโลกมีแนวโน้มที่สูงขึ้น จึงได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ ให้สวยงาม หรือแข็งแรงต่อการกีฬามากขึ้น

ในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม จากผลของการเพาะเลี้ยงปลากัดในโรงเพาะฟักที่เป็นระบบปิด ไม่มีการนำพ่อแม่พันธุ์จากแหล่งอื่นเข้ามาเพิ่มเติม ทำให้เกิดความเสี่ยงสูงที่จะเกิดการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม จากการผสมเลือดชิด นอกจากนี้ปลากัดในแหล่งธรรมชาติมีจำนวนลดน้อยลง สาเหตุจากแหล่งที่อยู่อาศัยถูกทำลาย มีมลพิษในแหล่งน้ำ รวมไปถึงการจับปลากัดจากแหล่งธรรมชาติ และการปล่อยปลากัดจากแหล่งอื่นเข้าไป ทำให้สมดุลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากัดเปลี่ยนแปลงไป การศึกษาความหลากหลายของปลากัดจะเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการจัดการประชากรปลากัดทั้งในโรงเพาะฟักและแหล่งธรรมชาติได้

ปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุลมีบทบาทที่สำคัญในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และช่วยในการคัดเลือกเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ สำหรับในปลากัดได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลากัดในโรงเพาะฟัก โดยใช้เครื่องหมายโปรตีนชนิดอัลโลไซม์ นอกจากนี้ยังใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดในปลากัดที่พบในประเทศไทย และศึกษาความสัมพันธ์ทาง

วิวัฒนาการของปลากัด โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 12S rRNA, tRNA Val, 16S rRNA, cytochrome *b* และ *RAG1* ทั้งนี้เครื่องหมายแต่ละชนิดต่างมีข้อดีและข้อด้อยที่แตกต่างกัน การเลือกใช้เครื่องหมายชนิดใดต้องดูจากเป้าหมายของงานวิจัยนั้น

เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์เป็นหนึ่งในเครื่องหมายโมเลกุล ที่มีการใช้ศึกษาความหลากหลายเป็นจำนวนมาก เนื่องจากเครื่องหมายชนิดนี้มีการข่มแบบร่วม (codominance) มีความผันแปรสูง พบกระจายอยู่ทั่วไปทั้งจีโนม สามารถใช้ได้ง่าย ต้นทุนในการทำไม่สูง แต่เครื่องหมายชนิดนี้จะสามารถนำมาใช้ได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่งของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาเครื่องหมายชนิดนี้มาก่อน

การศึกษารั้วนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) และทดสอบข้ามชนิดในปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) และปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) เพื่อนำเครื่องหมายที่ได้ไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งในประชากรธรรมชาติ และในโรงเพาะฟัก สำหรับการจัดการพ่อแม่พันธุ์ และการจัดการประชากรเพื่อการอนุรักษ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) และทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่พัฒนาได้
2. ทดสอบเครื่องหมายที่พัฒนาได้ในปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) และปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*)



การตรวจเอกสาร

ปลากัดไทย

ชีววิทยาและการแพร่กระจายของปลากัดไทย

ปลากัดไทย หรือ Siamese fighting fish มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Betta splendens* มีลำดับตามอนุกรมวิธานดังนี้ (Nelson, 2006)

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata (Craniata)

Superclass Gnathostomata

Class Actinopterygii

Subclass Neopterygii

Superorder Acanthopterygii

Order Perciformes

Suborder Anabantoidei

Family Osphronemidae

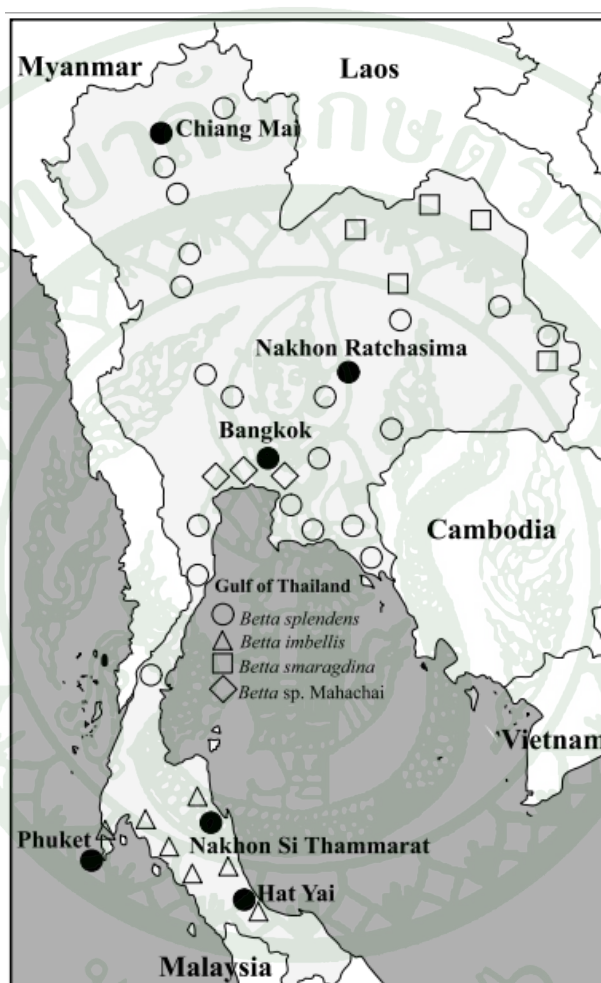
Subfamily Macropodinae

Genus *Betta*

Species *Betta splendens*

ปลากัดเป็นปลานขนาดเล็ก หัวเล็ก อาศัยในแหล่งน้ำจืด มีอวัยวะพิเศษในการหายใจ นอกเหนือจากเหงือก เรียกว่า labyrinth organ ซึ่งอยู่ในโพรงอากาศหลังช่องเหงือก ทำให้ปลากัดสามารถหายใจในน้ำที่มีออกซิเจนต่ำๆได้ ปลากัดมีลำตัวแบนยาว หลากสี เช่น แดง คราม เขียว น้ำเงิน และสีที่ได้จากการผสมสีต่างๆเข้าด้วยกัน โดยตัวผู้จะมีสีสันทสวยงามกว่าตัวเมีย จากลักษณะดังกล่าวจึงมีนักปรับปรุงพันธุ์นำปลากัดมาพัฒนาให้มีสีสวยงามมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ปลากัดยังมีนิสัยก้าวร้าว รักและหวงถิ่นอาศัย มักต่อสู้กันเสมอ ทำให้คนไทยในสมัยก่อนนิยมนำปลากัดมากัดกันเพื่อเป็นเกมกีฬาและการพนัน (วันเพ็ญ และคณะ, 2531)

ปลากัด (*B. splendens*) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแพร่กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (Monvises *et al.*, 2009) โดยแพร่กระจายมากที่สุดในเขตภาคกลาง (ภาพที่ 1) ปลากัดชอบอาศัยในแหล่งน้ำนิ่ง หรือน้ำไหลช้า มีพืชน้ำขึ้นอยู่ ไม่ว่าจะเป็น หนอง บึง แอ่งน้ำ ลำคลอง รวมถึงอ่างเก็บน้ำในบริเวณระดับน้ำตื้น



ภาพที่ 1 การแพร่กระจายของปลากัดในประเทศไทย

ที่มา: Monvises *et al.* (2009)

สายพันธุ์และชนิดของปลากัดไทย

ปลากัด (*B. splendens*) สามารถจำแนกออกได้เป็นหลายสายพันธุ์ ซึ่งมีความแตกต่างกันทั้งรูปร่างลักษณะ สี สัน นิ้วย เช่น ปลากัดลูกทุ่ง ปลากัดลูกหม้อ ปลากัดลูกผสม ปลากัดจีน และปลากัดเขมร เป็นต้น (นงพงา, 2546) อย่างไรก็ตาม ปลากัดในสกุล *Betta* ที่พบในประเทศไทยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มปลากัดคอมไข่ ประกอบด้วย *B. apollon*, *B. ferox*, *B. pallid*, *B. prima*, *B. simplex* และ *B. pi* (Schindler and Schmidt, 2006) และกลุ่มปลากัดก่อกวอด ประกอบด้วย *B. splendens*, *B. smaragdina*, *B. imbellis*, *B. siamorientalis* และ *B. mahachaiensis* (Goldstein, 2001; Kowasupat et al., 2012a, 2012b)

ปลากัดกลุ่ม *splendens*

ปลากัดกลุ่ม *splendens* เป็นปลากัดกลุ่มก่อกวอด มีรายงานอยู่ 4 ชนิด (Goldstein, 2001) ได้แก่ *B. splendens*, *B. smaragdina*, *B. imbellis* และ *B. rubra* ในประเทศไทยพบได้ 3 ชนิดคือ *B. splendens*, *B. smaragdina* และ *B. imbellis* ส่วน *B. rubra* พบได้ทางตอนเหนือของเกาะสุมาตรา ประเทศอินโดนีเซีย

ปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) เป็นปลาขนาดเล็ก ลำตัวยาว แบนข้าง หัวเล็ก ปากเขี้ยวขึ้นด้านบนเล็กน้อย ครีบหางกลมสั้น ครีบหลังอยู่ก่อนไปทางด้านหลัง ครีบกันมีฐานครีบยาวเริ่มจากครีบท้องไปสุดที่โคนครีบหาง ครีบท้องมีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อน 5 ก้าน ครีบอกมีขนาดเล็กที่สุด ปลากัดป่าภาคกลางมีสีน้ำตาลขุ่นหรือสีเทาแกมเขียว ด้านหลังมีสีเขียวเข้ม ด้านล่างมีสีแดง เกล็ดมีขอบสีส้ม มีแถบสีดำจากตาถึงกระดูกทรงแอกัม บางครั้งมีแถบสีดำตามความยาวของลำตัว 2 แถบ จากตาถึงครีบหาง เยื่อปิดเหงือกมีสีดำ ครีบท้องและครีบกันสีแดงตอนปลายมีสีเข้ม ส่วนครีบอกสีซีด (พิชัย, 2527; วันเพ็ญ และคณะ, 2531) จุดสังเกตที่สำคัญของปลากัดชนิดนี้คือมีแถบสีแดงอยู่บนขอบแผ่นปิดเหงือก (Rainboth, 1996) โดยปลากัดป่าภาคกลางจะแพร่กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย และพบมากที่สุดในภาคกลาง (ภาพที่ 2 (ก))



ภาพที่ 2 ปลากัดป่าภาคกลาง (*Betta splendens*) (ก) ปลากัดป่าภาคอีสาน (*Betta smaragdina*) (ข) และปลากัดป่าภาคใต้ (*Betta imbellis*) (ค)

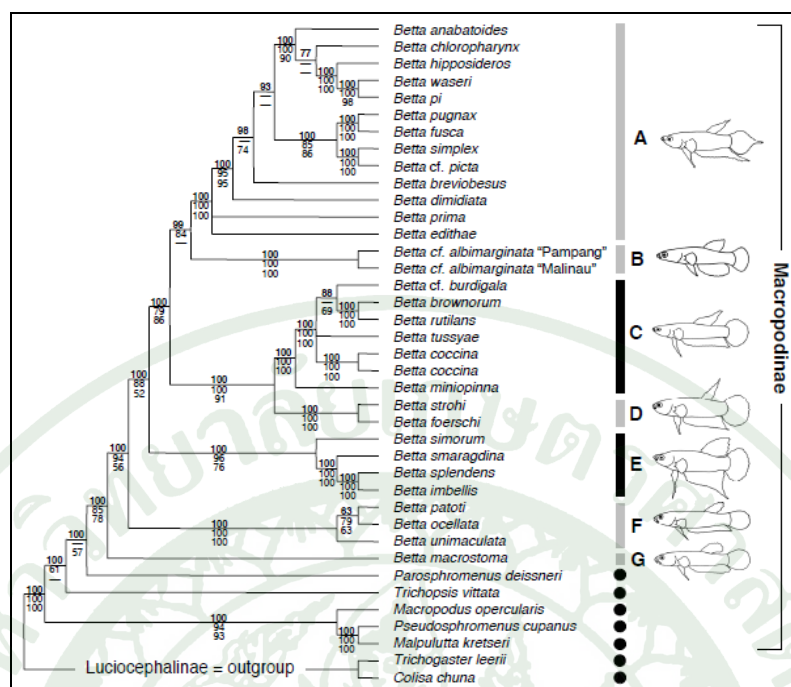
ที่มา: The Bettas4all Show Team. (2014)

ปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) มีรูปร่างเพรียวยาว ครีบหางกลมมน สีลำตัวเกือบดำ มีแนวเลื่อมสีน้ำเงินหรือเขียวบริเวณข้างลำตัว แผ่นปิดเหงือกมีสีสันสดใส ไม่มีเส้นสีแดงที่ปลายครีบหาง ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของปลากัดชนิดนี้ ตัวผู้จะมีสีสันสดใสกว่าและมีครีบที่ยาวกว่าในเพศเมีย (Kottelat, 2001) ปลากัดป่าภาคอีสานพบแพร่กระจายอยู่ในแถบบริเวณลุ่มแม่น้ำโขงในประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบการแพร่กระจายในประเทศลาว เวียดนาม และกัมพูชา (Goldstein, 2001; Monvises *et al.*, 2009) (ภาพที่ 2 (ข))

ปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) มีลักษณะคล้ายปลากัดป่าภาคกลางมาก ลำตัวมีสีน้ำเงินเข้ม มีครีบท้องสีสดใส ปลายสุดมีสีแดง มีแถบรูปพระจันทร์ครึ่งเสี้ยวสีแดงสดบนขอบของครีบหาง ซึ่งบางครั้งอาจไม่ชัดเจนและอาจใกล้เคียงกับลักษณะสีของปลากัดป่าภาคกลาง ดังนั้นจุดสำคัญที่ใช้บ่งชี้ปลากัดทั้ง 2 ชนิดนี้คือ ปลากัดป่าภาคใต้จะมีแถบสีเขียวหรือสีน้ำเงินสองแถบบนกระดูกปิดเหงือก ส่วนปลากัดป่าภาคกลางบนกระดูกปิดเหงือกจะมีแถบเป็นสีแดง (Goldstein, 2001) ปลากัดป่าภาคใต้มีการแพร่กระจายอยู่ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบบนเกาะปินัง ของประเทศมาเลเซีย เกาะบอร์เนียวตะวันออก และเกาะสุมาตรา ของประเทศอินโดนีเซีย (Goldstein, 2001; Monvises *et al.*, 2009) (ภาพที่ 2 (ค))

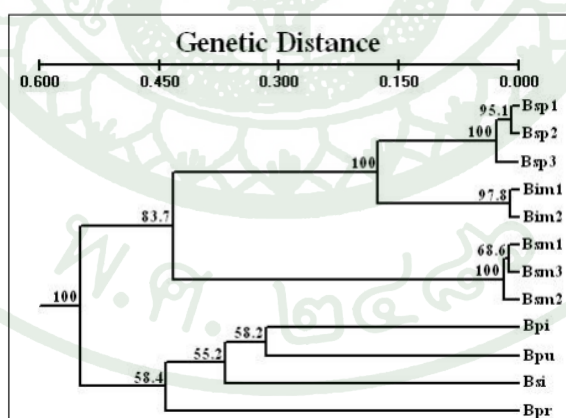
จากการศึกษาความสัมพันธ์ของปลากัดในกลุ่ม *splendens* เมื่อสังเกตลักษณะภายนอกพบว่าปลากัดป่าภาคกลางและปลากัดป่าภาคใต้มีความคล้ายคลึงกันมาก และเมื่อผสมโดยเอาปลากัดป่าภาคใต้มาผสมกับปลากัดป่าภาคกลางที่มีลักษณะที่แตกต่างกันเช่น มีครีบยาว หางคู่ สี และลักษณะอื่นๆ ที่แตกต่างกัน พบว่าลูกเกือบทั้งหมดมีลักษณะคล้ายคลึงกับปลากัดในธรรมชาติ (ครีบ

ดำ สั้น หางเดี่ยว) และยังสามารถให้ปลากัดในรุ่นต่อไปได้ แสดงให้เห็นว่าปลากัดป่าภาคกลางและปลากัดป่าภาคใต้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก (Goldstein, 2001) สอดคล้องกับผลจากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลากัด Rüber *et al.* (2004) ได้ใช้ข้อมูลระดับโมเลกุลของยีน 12S rRNA, tRNA Val, 16S rRNA, cytochrome *b* และ *RAG1* ในปลากัดสกุล *Betta* ทั้งในกลุ่มอมไข่และกลุ่มก่อกวน เมื่อเปรียบเทียบกับปลาชนิดอื่นๆ พบว่าปลาในสกุล *Betta* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเมื่อเปรียบเทียบกับปลาชนิดอื่น เมื่อพิจารณาในสกุลเดียวกันยังพบการจับกลุ่มของปลาในกลุ่มที่มีลักษณะที่ใกล้เคียงกันอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และยังพบว่าปลากัดกลุ่ม *splendens* มีความใกล้ชิดกันมากเมื่อเทียบกับปลากัดชนิดอื่นๆ ดังแสดงในแผนผังภาพที่ 3 และ ชวิน (2548) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากัดทั้ง 7 ชนิดที่พบในประเทศไทยทั้งในกลุ่มอมไข่และกลุ่มก่อกวน โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิด RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) พบว่าการแบ่งกลุ่มทางพันธุกรรมสอดคล้องกับพฤติกรรมการก่อกวนและอมไข่ และในกลุ่มก่อกวนยังพบปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) มากกว่าปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลาในสกุล *Betta* (แถบสีดำคือปลากัดกลุ่มก่อกวด, แถบสีเทาคือปลากัดกลุ่มอมไข่ และจุดสีดำคือปลาชนิดอื่นๆ)

ที่มา: Rüber *et al.*, (2004)



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลากัด 7 ชนิด (Bsp = *Betta splendens*, Bim = *Betta imbellis*, Bsm = *Betta smaragdina*, Bpi = *Betta pi*, Bpn = *Betta pugnax*, Bsi = *Betta simplex* และ Bpr = *Betta prima*)

ที่มา: ชวิน (2548)

เครื่องหมายโมเลกุล

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม คือ ความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมที่สิ่งมีชีวิตแต่ละชีวิตได้รับการถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่และส่งต่อไปยังรุ่นต่อไปได้ เช่น สี และลักษณะของครีบในปลากัด ความหลากหลายทางพันธุกรรมจัดเป็นองค์ประกอบหนึ่งในความหลากหลายทางชีวภาพ โดยมีสาเหตุมาจากการกลาย (mutation) ในระดับยีนหรือในระดับโครโมโซม หรือเกิดจากกลไกที่เรียกว่า crossing over ในระหว่างการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ หรือเกิดจากสมาชิกของประชากรมีการอพยพไปยังประชากรอื่น ทำให้เกิดการถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างประชากร สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ใดๆ จำเป็นต้องปรับตัวเพื่อความอยู่รอดต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ความหลากหลายทางพันธุกรรมจึงมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เพื่อเอื้อให้สิ่งมีชีวิตสามารถดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ ซึ่งประชากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จะมีประโยชน์ในการนำมาใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ได้อีกด้วย (Hedrick, 1985)

เครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers)

เครื่องหมายโมเลกุล หมายถึง ลักษณะหรือตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะเจาะจง สามารถนำไปใช้แยกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตในระดับต่างๆ และลักษณะนั้นสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ เครื่องหมายโมเลกุลจัดเป็นเครื่องมือที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ โดยเครื่องหมายโมเลกุลแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทดังนี้ (สุริพร, 2546; สุรินทร์, 2552)

1. เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เป็นการศึกษาโปรตีนที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ แม้กระทั่งในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ก็อาจพบความแตกต่างของโปรตีนได้ในแต่ละตัว เช่น การศึกษาอัลโลไซม์ และไอโซไซม์ เครื่องหมายชนิดนี้สามารถศึกษาได้ง่าย ไม่ซับซ้อนมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก ข้อมูลที่ได้ยังสอดคล้องกับข้อมูลทางสัตววิทยา อย่างไรก็ตามการแสดงออกของโปรตีนก็ยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต ทำให้โอกาสการตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนมีค่าต่ำกว่าความเป็นจริง นอกจากนี้ชนิดของโปรตีนที่ใช้ศึกษาความแตกต่างยังเป็นปัจจัยสำคัญเช่นกัน
2. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นการศึกษาจากข้อมูลดีเอ็นเอที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิต โดยเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงหนึ่งช่วงใดของดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความแตกต่างที่

เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมในนิวเคลียส หรือในออร์แกเนลล์ภายในเซลล์ เช่น ไมโทคอนเดรีย เครื่องหมายชนิดนี้ไม่แปรผันตามสภาพแวดล้อมเหมือนเครื่องหมายโปรตีน มีความคงตัวในทุกเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตนั้น ทำให้สามารถใช้เครื่องหมายชนิดนี้ได้ในทุกเนื้อเยื่อ ทุกเวลา อย่างไรก็ตามเครื่องหมายชนิดนี้จำเป็นต้องใช้เทคนิคและเครื่องมือที่ซับซ้อนมาก เครื่องหมายดีเอ็นเอมีอยู่หลากหลายชนิด แต่ละชนิดมีข้อดีและข้อด้อยที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 1

เครื่องหมายพันธุกรรมที่ดีโดยทั่วไปควรมีความหลากหลายสูง สามารถทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม แยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ หรือที่เรียกว่ามีการข่มแบบร่วม (codominance) มีการกระจายทั่วทั้งจีโนม สามารถแยกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันมากได้ ต้องไม่แปรผันไปตามการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ราคาไม่แพง และทำได้ง่าย ใช้เครื่องมือไม่ซับซ้อน (อมรา, 2542)

ตารางที่ 1 ข้อมูลการเป็นการข่มแบบร่วม (codominance) ระดับโพลิมอร์ฟิซึม ตำแหน่งจำเพาะ ระดับของเทคนิคที่ใช้ และค่าใช้จ่ายในแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมาย	ข่มแบบร่วม	โพลิมอร์ฟิซึม	ตำแหน่งจำเพาะ	เทคนิคที่ใช้	ค่าใช้จ่าย
RAPD	ไม่เป็น	ปานกลาง	ไม่จำเพาะ	ต่ำ	ต่ำ
RFLP	เป็น	ปานกลาง	จำเพาะ	สูง	ปานกลาง
AFLP	ไม่เป็น	สูง	ไม่จำเพาะ	ปานกลาง	ปานกลาง
SCAR	เป็น/ไม่เป็น	สูง/ปานกลาง	จำเพาะ	ปานกลาง	ต่ำ
SNP	เป็น	สูงมาก	จำเพาะ	สูง	สูง
ISSR	ไม่เป็น	สูง	จำเพาะ	ปานกลาง	ปานกลาง
ไมโครแซทเทลไลต์	เป็น	สูงมาก	จำเพาะ	ต่ำ*	ต่ำ*

* เมื่อมีการพัฒนาและออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะมาแล้ว

เมื่อเปรียบเทียบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆ พบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์มีการข้ามแบบร่วม (codominance) คือสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ มีโพลิมอร์ฟิซึมที่สูงมาก มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง ใช้เทคนิคที่ไม่ซับซ้อนและค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำ

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite marker)

ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ ซึ่งพบได้ตั้งแต่ 2 ถึง 100 ซ้ำ พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Gur-Arie *et al.*, 2000; Morgante *et al.*, 2002) และพบกระจายทั่วทั้งจีโนม (Chambers and MacAvoy, 2000) ไมโครแซทเทลไลต์อาจมีชื่อเรียกแบบอื่นๆ ได้ เช่น simple sequence repeats (SSR), short tandem repeats (STR), simple sequence length polymorphism (SSLP) และ variable number of tandem repeats (VNTR) โดยทั่วไปไมโครแซทเทลไลต์ประกอบไปด้วยนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ ตั้งแต่ 1–6 นิวคลีโอไทด์ ถ้านิวคลีโอไทด์ซ้ำ 1 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น $(A)_n$ และ $(G)_n$ ซึ่งไม่เหมาะสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ เพราะไม่เสถียรทำให้หาขนาดของแอลลีลที่ถูกต้องได้ยาก ถ้านิวคลีโอไทด์ซ้ำ 2 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น $(AC)_n$ และ $(GA)_n$ ถ้านิวคลีโอไทด์ซ้ำ 3 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า tri-nucleotide repeat เช่น $(TAC)_n$ และ $(GCA)_n$ โดย n เป็นจำนวนซ้ำ (สุริพร, 2546; สุรินทร์, 2552)

ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบไมโครแซทเทลไลต์มักมีลักษณะไม่เสถียร และมีอัตราการกลายสูงกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั่วไป ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของชุดซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์โดยกลไกที่ทำให้เกิดการกลายของไมโครแซทเทลไลต์มี 2 แบบ คือ (สุรินทร์, 2552; Litt and Luty, 1989)

1. slip-strand mispairing เป็นการเลื่อนของสายดีเอ็นเอที่จับคู่กัน ทำให้มีส่วนที่ไปออกไม่จับคู่ ดีเอ็นเอที่จำลองขึ้นมาใหม่จะมีจำนวนนิวคลีโอไทด์หรือชุดซ้ำต่างจากเดิม
2. unequal crossing over เป็นการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมคู่เหมือนขณะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ซึ่งการแลกเปลี่ยนนี้เกิดตอนการจับคู่ไม่ตรงกัน โดยตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์บางซ้ำเลื่อนไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดซ้ำขึ้นบนโครโมโซม

การแบ่งประเภทของลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ (Weber and May, 1989)

1. perfect repeat เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์ที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำชนิดเดียวเรียงต่อไปเรื่อยๆ ถ้าเป็นการซ้ำสองนิวคลีโอไทด์ เรียกว่า dinucleotide perfect repeat เช่น $(AC)_n$ แต่ถ้าเป็นซ้ำสามนิวคลีโอไทด์ เรียกว่า trinucleotide perfect repeat เช่น $(GCA)_n$

2. imperfect repeat เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นมาแทรกระหว่างช่วงนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ถ้าเป็นซ้ำสองนิวคลีโอไทด์ เรียกว่า dinucleotide imperfect repeat เช่น $(GT)_n(N)_n(GT)_n$ แต่ถ้าเป็นการซ้ำสามนิวคลีโอไทด์ เรียกว่า trinucleotide imperfect repeat เช่น $(CGT)_n(N)_n(CGT)_n$

3. compound repeat เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์ที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำมากกว่า 1 ชนิดอยู่ด้วยกัน ถ้าเป็นการซ้ำสองนิวคลีโอไทด์ เรียกว่า dinucleotide compound repeat เช่น $(AC)_n(GT)_n$ แต่ถ้าเป็นการซ้ำสามนิวคลีโอไทด์ เรียกว่า trinucleotide compound repeat เช่น $(TGC)_n(TGT)_n$

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เป็นการนำเอาดีเอ็นเอบริเวณที่มีไมโครแซทเทลไลต์ มาใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ซึ่งบริเวณดังกล่าวมีอัตราการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงกว่าบริเวณอื่นๆ ทำให้มีความหลากหลายสูง การตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์จะตรวจสอบตำแหน่งที่จำเพาะครั้งละ 1 ตำแหน่ง โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต้องการ โดยอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่บริเวณด้านข้างของไมโครแซทเทลไลต์ (flanking region) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ

การใช้ประโยชน์จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

เอกลักษณ์และคุณสมบัติที่โดดเด่นในเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ทำให้เครื่องหมายชนิดนี้เป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้ประโยชน์ (Morgante and Olivieri, 1993; Brown *et al.*, 1996; Paterson, 1996; Powell *et al.*, 1996) คือ

1. สามารถพบจำนวนแอลลีลได้หลายแอลลีลในหนึ่งตำแหน่ง หรือที่เรียกว่า multi-allelic nature จึงพบความหลากหลายในระดับสูง ทำให้สามารถลดจำนวนตำแหน่งในการตรวจสอบลงได้
2. มีการข่มแบบร่วม (codominance) สามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้
3. ตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ทำให้สามารถศึกษาได้แม้จะมีปริมาณดีเอ็นเอน้อย
4. สามารถนำไปใช้ทำแผนที่ยีนได้ เนื่องจากมีการกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม

จากเอกลักษณ์และคุณสมบัติของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จึงนิยมนำเครื่องหมายชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง

มีการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์น้ำหลายชนิดเช่น ปลาการ์ฟ (Kamonrat, 1996) ปลา Northern Pike (Miller and Kapuscinski, 1996) และ กุ้งกุลาดำ (Xu *et al.*, 2001) อีกทั้งยังนำมาใช้ในการศึกษาหาความแตกต่างทางพันธุกรรมและใช้ในการแยกกลุ่มประชากรในสัตว์น้ำหลายชนิดเช่น ปลา Whiting fish (Rico *et al.*, 1997), ปลาแอตแลนติกแซลมอน (McConnell *et al.*, 1995; Norris *et al.*, 1999) และ ปลาเรนโบว์เทราต์ (Beacham *et al.*, 2000)

การติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของประชากรในโรงเพาะฟักที่อาจเกิดมาจากการจัดการพ่อแม่พันธุ์ที่ไม่เหมาะสม ซึ่งส่งผลกระทบต่อลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม และการตรวจสอบการผสมเลือดชิด ทำให้ใช้ประโยชน์ในการวางแผนจัดการพ่อแม่พันธุ์ต่อไปได้ เช่น ปลาไน (Desvignes *et al.*, 2001) ปลา Japanese flounder (Hara and Sekino, 2003) และปลาหางนกยูง (Shikano and Taniguchi, 2002) นอกจากนี้ เนื่องจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เป็นเครื่องหมายที่มีพอลิมอร์ฟิซึมสูง จึงมักใช้ศึกษาหา linkage กับยีนที่สนใจได้ดี และในลักษณะปริมาณที่เป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ ถ้าทราบยีนที่มีผลต่อลักษณะดังกล่าว ก็สามารถทำ QTL (Quantitative trait loci) ได้ เพื่อใช้ติดตามยีนที่สนใจ อย่างไรก็ตามการสร้าง QTL mapping นั้นจำเป็นต้องอาศัยเครื่องหมายพันธุกรรมเป็นจำนวนมากเพื่อหา linkage ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมกับตำแหน่งของ QTL เช่น ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Lee and

Kocher, 1996) ปลาม้าลาย (Shimoda *et al.*, 1999) และปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) (Ozaki *et al.*, 2000)

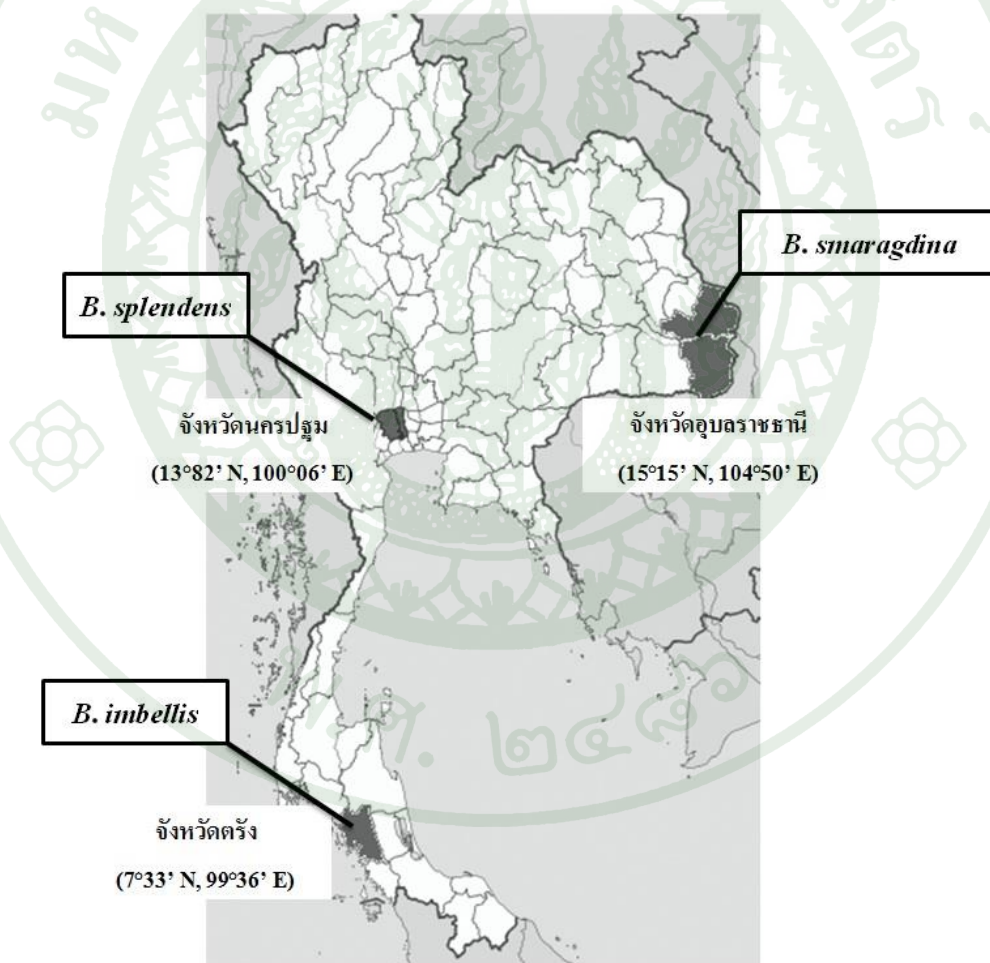
ในสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ จะพบส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (conserved sequence) ทำให้สามารถใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ใช้อีกสิ่งมีชีวิตหนึ่งได้ เช่น ไพรเมอร์ที่พัฒนามาจากปลา *Seriola dumerili* สามารถนำไปใช้กับปลาในสกุลเดียวกันสองชนิดได้ คือ *S. fasciata* และ *S. rivoliana* (Babbucci *et al.*, 2006) และไพรเมอร์จากปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) นำไปใช้ได้กับปลานิล (*O. niloticus*) และปลาหมอสี (*Pseudotropheus lombardoi*) (Saju *et al.*, 2010)

สำหรับในปลากัด มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ขึ้นมาเพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยในปัจจุบันมีจำนวน 5 คู่ คือ *Bsp1*, *Bsp4*, *Bsp8*, *Bsp9* และ *Bsp10* มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งเท่ากับ 10, 9, 6, 3 และ 3 ตามลำดับ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีอยู่ในช่วง 0.2–0.7 และพบว่าตำแหน่ง *Bsp10* ไม่อยู่ในทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ซึ่งพบ null allele ในตำแหน่งดังกล่าว (สุตาวัดย์, 2546)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บรวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติในจังหวัดนครปฐม (13°82' N, 100°06' E) ตัวอย่างปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) จำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บรวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติในจังหวัดอุบลราชธานี (15°15' N, 104°50' E) และตัวอย่างปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) จำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บรวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติในจังหวัดตรัง (7°33' N, 99°36' E) ตามภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แผนที่แสดงบริเวณที่เก็บตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลาง (*Betta splendens*) ปลากัดป่าภาคอีสาน (*Betta smaragdina*) และปลากัดป่าภาคใต้ (*Betta imbellis*)

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากหางของปลากัด โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) วัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) และประเมินจากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) บนอะกาโรสเจล (agarose gel) เข้มข้น 1 % เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การสร้าง microsatellite enriched library

สร้างโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์ตามวิธีของ Yaish and Vega (2003) โดยนำดีเอ็นเอปลากัดป่าภาคกลางที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* (New England Biolabs, Beijing, China) และเชื่อมต่อกับ *MseI* adaptor (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' และ 5'-TACTCAGGACTCAT-3') จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปคัดเลือกลำดับที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธีไฮบริดเซชัน โดยนำโพรบแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide probes) ที่เชื่อมต่อกับไบโอติน (biotin) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 8 ชนิด คือ (CA)₁₅, (GA)₁₅, (GC)₁₀, (ACC)₁₀, (CCT)₁₀, (GAT)₁₀, (CAG)₁₀, และ (GCT)₁₀ มาไฮบริดกับดีเอ็นเอที่ตัดได้ไบโอตินที่ติดกับโพรบจะจับกับ streptavidin ที่เคลือบบนเม็ดแม่เหล็ก (magnetic beads (Dynabeads® Myone™ Streptavidin C1, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)) นำชิ้นดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้ไปเชื่อมต่อกับเข้ากับพลาสมิด pGEM®-T easy Vector (Promega) และถ่ายพลาสมิดที่เชื่อมต่อแล้วเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH-5α (ภาคผนวก ก)

4. การคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์จาก microsatellite enriched library

คัดเลือกโคโลนีสีขาวมาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกสอดในพลาสมิดด้วยวิธีพีซีอาร์ และตรวจสอบหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธี dot blot hybridization โดยนำเอาผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากแต่ละโคลนมาหยดลงบนแผ่นเมมเบรน แล้วทำไฮบริดเซชันกับโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน และตรวจสอบผลการไฮบริดเซชันด้วยชุด North2South® Chemiluminescent Hybridization and Detection kit (Pierce, USA) (ภาคผนวก ข)

5. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และออกแบบไพรเมอร์

คัดเลือกโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์มาสกัดพลาสมิด โดยชุดสกัดสำเร็จรูป Invisorb® Spin Plasmid Mini Two (Invitek, Berlin, Germany) และนำพลาสมิดที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท 1st Base DNA sequencing service (Seri Kembangan, Malaysia) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ โดยออกแบบไพรเมอร์บริเวณที่ขนานข้างลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์ (flanking region) ด้วยโปรแกรม Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000)

6. การทดสอบไพรเมอร์

นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทดสอบกับปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลากัดป่าภาคกลางในสารละลายปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของปลากัดที่สกัดมาได้ปริมาณ 25 นาโนกรัม, ไพรเมอร์ทั้ง 2 สาย Forward/Reverse ปริมาณสายละ 2.5 μ M, 1X PCR buffer, $MgCl_2$ ปริมาณ 1.5 mM, dNTP ปริมาณ 0.2 mM และ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, California, USA) ปริมาณ 1 unit โดยใช้รอบอุณหภูมิในการทำพีซีอาร์ดังนี้ เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยรอบวงจรปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 50 – 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (ตารางที่ 3) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 6% โพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) แล้วย้อมเจลที่ได้ด้วยวิธี silver staining (Benbouza *et al.*, 2006) (ภาคผนวก ค) ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากแถบที่ปรากฏบนเจล และประมาณขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม GelAnalyzer 2010 (Lazar and Lazar, 2010) ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้โดยตัดแถบดีเอ็นเอจากเจล แล้วนำไปโคลน นำโคลนที่ได้ไปสกัดพลาสมิดและส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปลงในฐานข้อมูล DDBJ (DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>) (ภาคผนวก ง)

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

7.1. จำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (allelic number; N_A) หาได้จากจำนวนแอลลีลที่แตกต่างกันที่เกิดขึ้นในตำแหน่งนั้นๆ

7.2. จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (effective number of allele; N_E) วิเคราะห์ค่าตามวิธีของ Kimura and Crow (1964) ดังนี้

$$N_E = 1/\sum p_i^2$$

เมื่อ P_i คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i

7.3. ค่า observed heterozygosity (H_O) และค่า expected heterozygosity (H_E) วิเคราะห์ค่าตามวิธีของ Nei (1978) จากโปรแกรม Excel Microsatellite Toolkit 3.1.1 (Park, 2001)

7.4. การทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy–Weinberg equilibrium; HWE) วิเคราะห์สมดุลจากค่า P-value (P-HWE) โดยใช้โปรแกรม GENEPOP program (Rousset, 2008)

7.5. การทดสอบ linkage disequilibrium วิเคราะห์จากค่า P-value โดยใช้โปรแกรม GENEPOP program (Rousset, 2008)

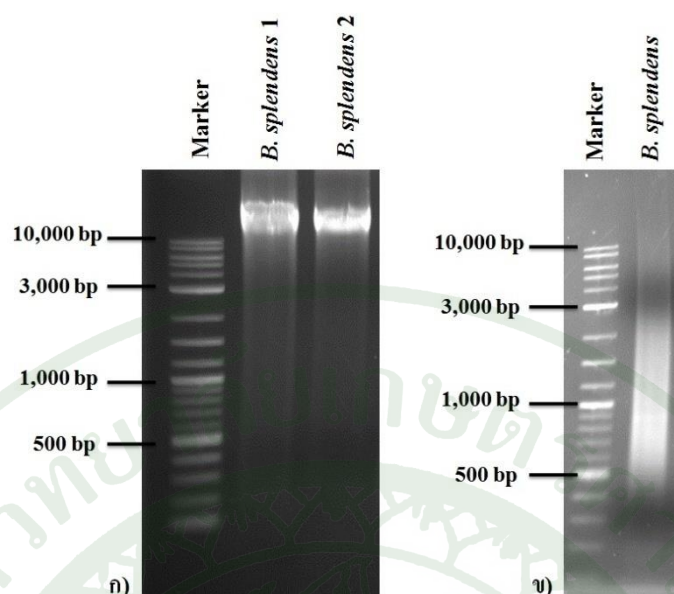
ผลและวิจารณ์

การสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอปลากัดที่สกัดได้ นำมาวัดปริมาณด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอปลากัดทั้งหมดมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 240 – 295 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยหาอัตราส่วนของ $A_{260}:A_{280}$ พบว่าดีเอ็นเอปลากัดที่สกัดได้มีค่าอัตราส่วนของ $A_{260}:A_{280}$ อยู่ที่ 1.8–1.99 แสดงว่าตัวอย่างดีเอ็นเอมีโปรตีนปนเปื้อนอยู่น้อย และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 6 (ก)) พบว่าดีเอ็นเอปลากัดที่สกัดได้มีการแตกหักเล็กน้อย ดังนั้นดีเอ็นเอที่สกัดได้สามารถนำไปพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ต่อไปได้

การตัดต่อดีเอ็นเอปลากัด

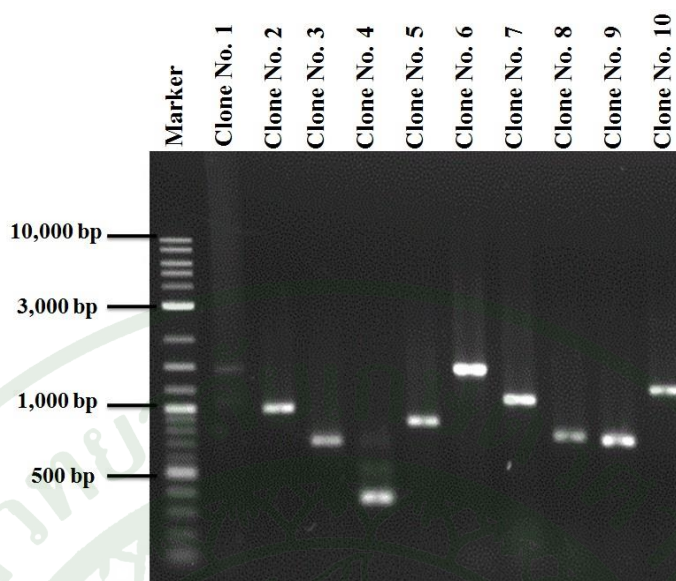
เมื่อทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* แล้วต่อด้วย *MseI* adaptor จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ และตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าดีเอ็นเอถูกตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดตั้งแต่ 500 – 3,000 คู่เบส (ภาพที่ 6 (ข)) ซึ่งเหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ต่อไป เนื่องจากขนาดตั้งแต่ 500 คู่เบสขึ้นไปจะมีความยาวของบริเวณที่ขนานข้างดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ (flanking region) พอที่จะพัฒนาไพรเมอร์ได้



ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ (ก) และผลผลิตพีซีอาร์หลังจากการตัดและต่อดีเอ็นเอปลากัด (ข) ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% ใน TAE buffer

การสร้าง microsatellite enriched library

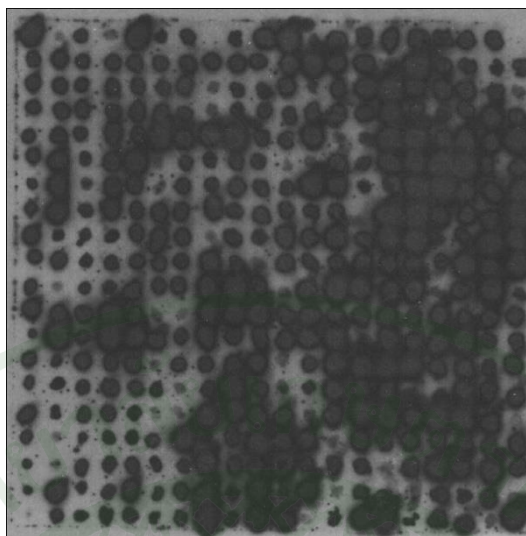
เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้หลังจากการตัดและต่อดีเอ็นเอไปคัดเลือกชั้นดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์ ด้วยวิธีไฮบริดเซชันกับโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์จำนวน 8 ชนิดคือ (CA)₁₅, (GA)₁₅, (GC)₁₀, (ACC)₁₀, (CCT)₁₀, (GAT)₁₀, (CAG)₁₀, และ (GCT)₁₀ และนำชั้นดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้ไปโคลน พบโคลนีสืบจำนวน 767 โคลน ตรวจสอบขนาดชั้นดีเอ็นเอที่แทรกในพลาสมิดด้วยวิธีพีซีอาร์ (ภาพที่ 7) พบว่ามีโคลนที่มีขนาดชั้นดีเอ็นเอที่แทรกในพลาสมิดไม่น้อยกว่า 500 คู่เบส จำนวน 685 โคลน (89.31%) โดยชั้นดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นกว่า 500 คู่เบสไม่เลือกนำมาออกแบบไพรเมอร์



ภาพที่ 7 ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกสอดในพลาสมิดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล เข้มข้น 1% ใน TAE buffer

การตรวจสอบหาโคลนที่มีดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์

เมื่อตรวจสอบหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธี dot blot hybridization (ภาพที่ 8) จากโคลนจำนวน 767 โคลน พบโคลนที่มีดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 591 โคลน (77.05%) โดยการสร้าง enriched library จะให้ร้อยละของโคลนเป้าหมายที่สูงกว่าการสร้าง library แบบธรรมดา สอดคล้องกับการสร้าง library ในสิ่งมีชีวิตอื่นด้วยวิธีนี้ เช่น ปลา Asia arowana (*Scleropages formosus*) พบไมโครแซทเทลไลต์ถึง 77.8% (Yue *et al.*, 2000) กล้วยไม้สกุล *Dendrobium* พบ 90% (ฐนิตา, 2550) และปลานิล (*Oreochromis niloticus*) พบ 96% (Carleton *et al.*, 2002)



ภาพที่ 8 ผลการทำ dot blot hybridization ใน enriched library

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการสุ่มเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ และมีขนาดชั้นดีเอ็นเอที่แทรกในพลาสมิดความยาวไม่น้อยกว่า 500 คู่เบส จำนวน 114 โคลนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามี 94 โคลนที่พบดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ (82.46%) ส่วนอีก 10 โคลนไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 94 โคลน พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำแบบ perfect repeat จำนวน 66 โคลน (70.21%) ลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำแบบ imperfect repeat จำนวน 26 โคลน (27.66%) และลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำแบบ compound repeat จำนวน 2 โคลน (2.13%) (ตารางที่ 2) ซึ่งคล้ายกับที่พบในปลาตุ๊กตา ซึ่งพบลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำแบบ perfect repeat มากที่สุด รองลงมาเป็นแบบ imperfect repeat และ compound repeat ตามลำดับ (ศรีจรรยา, 2546)

จากการศึกษาได้คัดเลือกไมโครแซทเทลไลต์แบบ dinucleotide ทุกรูปแบบ ((CA)₁₅, (GA)₁₅ และ (GC)₁₀) โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์แบบ GT/AC มากที่สุดในปลาปัก ซึ่งแบบ dinucleotide perfect repeat พบ GT/AC 37.23% (GA/TC พบ 19.15%) และแบบ dinucleotide imperfect repeat พบ GT/AC 13.83% (GA/TC พบ 8.51%) (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับ

สัดส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลท์ในจีโนมของปลาชนิดอื่นที่พบแบบ GT/AC มากที่สุด เช่น ปลาอมไข่ (*Apogon doederleini*) (Miller-Sims *et al.*, 2004), ปลาหางเหลือง (*Caesio cuning*) (Ablan, 2006) และปลาช่อน (*Channa striata*) (Jamsari *et al.*, 2011)

ตารางที่ 2 จำนวนโคลนและร้อยละของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ในแต่ละชนิด

ชนิดของไมโครแซทเทลไลท์	จำนวนโคลน	ร้อยละ
Perfect repeat	66	70.21
dinucleotide perfect repeat		
(GT) _n /(AC) _n	35	37.23
(GA) _n /(TC) _n	18	19.15
trinucleotide perfect repeat		
(GAT) _n /(ATC) _n	3	3.19
(GCT) _n /(AGC) _n	5	5.32
(GGA) _n /(TCC) _n	4	4.26
(CAA) _n /(TTG) _n	1	1.06
Imperfect repeat	26	27.66
dinucleotide imperfect repeat		
(GT) _n (N) _n (GT) _n	13	13.83
(GA) _n (N) _n (GA) _n	8	8.51
trinucleotide imperfect repeat		
(GCT) _n (N) _n (GCT) _n	3	3.19
(GAT) _n (N) _n (GAT) _n	2	2.13
Compound repeat	2	2.13
dinucleotide compound repeat		
(CT) _n (CA) _n	1	1.06
tetranucleotide compound repeat		
(TGC) _n (TGT) _n	1	1.06

การออกแบบไพรเมอร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 94 สายมาออกแบบไพรเมอร์ พบว่าสามารถออกแบบได้เพียง 44 สาย (46.81%) ส่วนที่เหลือไม่สามารถออกแบบได้ เนื่องจากบริเวณที่ขนานข้างดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ (flanking region) สั้นเกินไป ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จับกันเองเป็นไดเมอร์ หรือฟอร์มตัวเป็น secondary structure คู่ไพรเมอร์มี melting temperature และ GC content ต่างกันมาก เป็นต้น

การทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ในปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*)

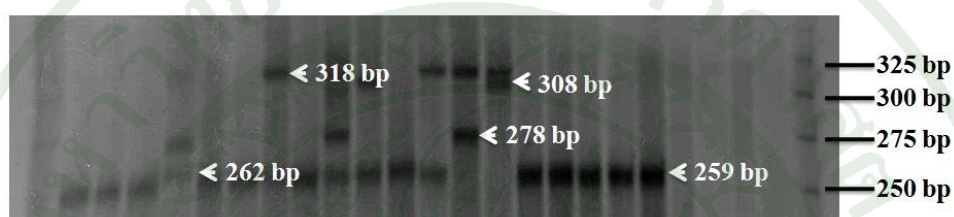
จากการทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 44 คู่ในปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการตัดแถบดีเอ็นเอ โคลน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีไพรเมอร์เพียง 10 คู่เท่านั้นที่สามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ได้ตามขนาดที่ออกแบบไว้ ได้แก่ BettaMS4, BettaMS5, BettaMS8, BettaMS14, BettaMS15, BettaMS17, BettaMS23, BettaMS25, BettaMS28 และ BettaMS40 (ตารางที่ 3) สำหรับคู่ไพรเมอร์ที่เหลืออีก 34 คู่ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ตามขนาดที่ออกแบบไว้

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำและอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ จำนวน 10 ตำแหน่งที่พัฒนาได้จากปาลักด

ตำแหน่ง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5'-3')	ลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ	T _A (C°)
BettaMS4	F: GTTTCATCAGGAGCAGCAGCATAA R: CTGTTTGATGGCCGACTTTT	(GA) _n (N) _n (GA) _n	59
BettaMS5	F: GTTTCGTCACCTTCTGAGCAAACA R: AAATGCGCTGGGTAGACTTG	(GA) _n	59
BettaMS8	F: CGTGAGCTGCAAAGAAAACA R: GCTGTTGCACATGAATCCAG	(GA) _n	57
BettaMS14	F: GCTGAGCTCTGAGGAACACC R: CAAGGTGTTGAGCGTTTCAG	(CA) _n (N) _n (CA) _n	57
BettaMS15	F: ACTGTAACCGGGCTGTTCTG R: AACGCACCCAGAAACAAATC	(GA) _n (N) _n (GA) _n	57
BettaMS17	F: AAGCAGGTCTTTCACCTCCA R: TCACCCTGCGTCTAAGTCAA	(GA) _n (N) _n (GA) _n	61
BettaMS23	F: GTTTGAGAGAAATGGGTCTTCG R: TCACTACGCTGCCAAATCAG	(CT) _n (CA) _n	55
BettaMS25	F: GTTTGGGTAAAACCCAACTCTGG R: AACGTCACGTGGAACAGATG	(GT) _n	55
BettaMS28	F: GTTTCTATTGCCTTAGGGCTCCA R: TGCTCCTGAGAGGACTATTGG	(GA) _n (N) _n (GA) _n	57
BettaMS40	F: CAGTACATTTGACTGATCGCAGA R: CAGGATGCTTCCTTGGGTAA	(GA) _n (N) _n (GA) _n	57

BettaMS4

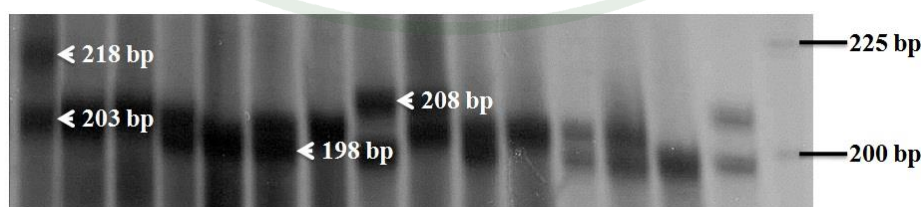
ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS4 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 5 แอลลีล (259, 262, 278, 308 และ 318 คู่เบส) (ภาพที่ 9) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 2.09 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.47 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.54 การทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้อยู่ในสมดุล (ค่า P-HWE เท่ากับ 0.1670) (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 9 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS4 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS5

ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS5 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 4 แอลลีล (198, 203, 208 และ 218 คู่เบส) (ภาพที่ 10) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 2.57 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.67 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.63 การทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้อยู่ในสมดุล (ค่า P-HWE มากกว่า 0.9999) (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 10 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS5 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS8

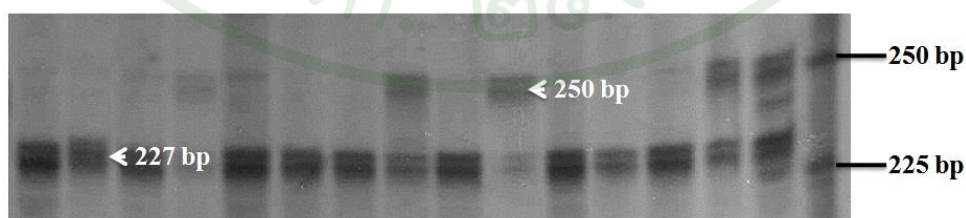
ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS8 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 1 แอลลีล (223 คู่เบส) (ภาพที่ 11) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 1 ค่า observed heterozygosity (H_O) และค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0 (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 11 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS8 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS14

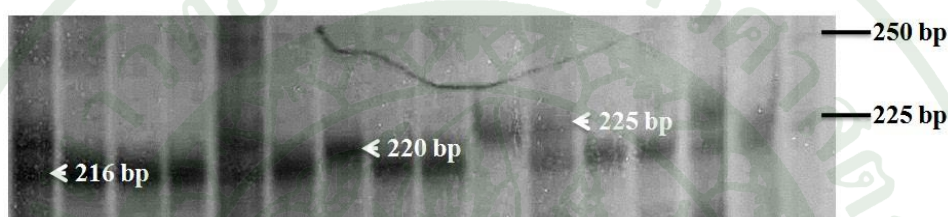
ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS14 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 2 แอลลีล (227 และ 250 คู่เบส) (ภาพที่ 12) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 0.62 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.33 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.29 การทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้อยู่ในสมดุล (ค่า P -HWE มากกว่า 0.9999) (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 12 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS14 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS15

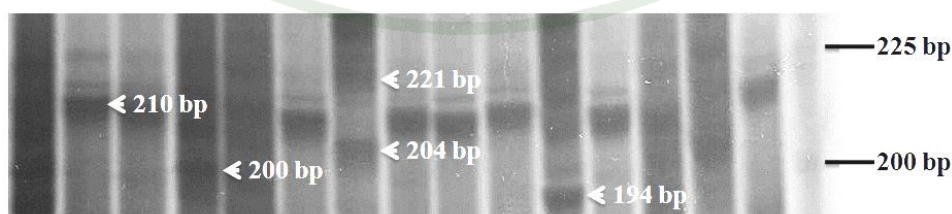
ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS15 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 3 แอลลีล (216, 220 และ 225 คู่เบส) (ภาพที่ 13) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 1.85 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.33 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.48 การทดสอบสมมติฐานฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้อยู่ในสมดุล (ค่า P-HWE เท่ากับ 0.1479) (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 13 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS15 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS17

ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS17 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 5 แอลลีล (194, 200, 204, 210 และ 221 คู่เบส) (ภาพที่ 14) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 1.65 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.27 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.41 การทดสอบสมมติฐานฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้อยู่ในสมดุล (ค่า P-HWE เท่ากับ 0.0863) (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 14 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS17 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS23

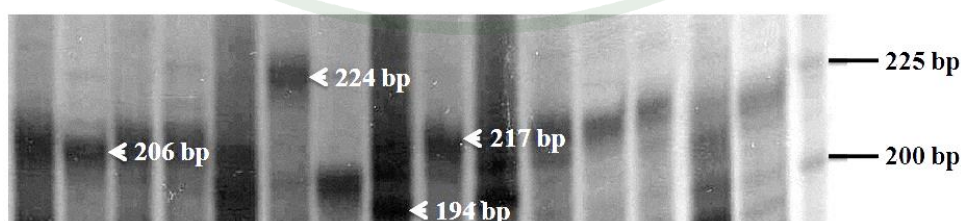
ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS23 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 3 แอลลีล (277, 285 และ 296 คู่เบส) (ภาพที่ 15) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 1.51 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.13 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.35 การทดสอบสมมติฐานฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้ไม่อยู่ในสมดุล (ค่า P -HWE เท่ากับ 0.0045) (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 15 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS23 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS25

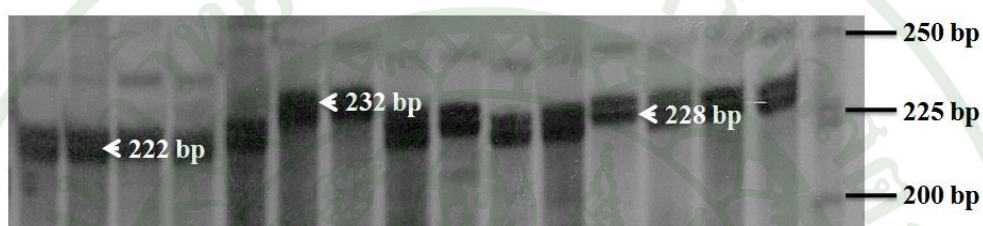
ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS25 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 4 แอลลีล (194, 206, 217 และ 224 คู่เบส) (ภาพที่ 16) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 2.38 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.47 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.60 การทดสอบสมมติฐานฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้ไม่อยู่ในสมดุล (ค่า P -HWE เท่ากับ 0.1032) (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 16 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS25 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS28

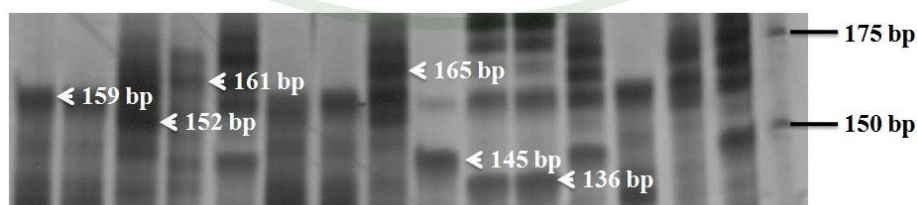
ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS28 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 3 แอลลีล (222, 228 และ 232 คู่เบส) (ภาพที่ 17) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 2.42 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.13 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.61 การทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้ไม่อยู่ในสมดุล (ค่า P-HWE เท่ากับ 0.0001) (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 17 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS28 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS40

ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS40 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 6 แอลลีล (136, 145, 152, 159, 161 และ 165 คู่เบส) (ภาพที่ 18) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 2.51 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.67 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.62 การทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้อยู่ในสมดุล (ค่า P-HWE เท่ากับ 0.3066) (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 18 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS40 ในปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง

ตารางที่ 4 Genbank accession number (ภาคผนวก จ), ช่วงขนาดของแอสลิล, จำนวนแอสลิล (N_A), จำนวนแอสลิลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E), ค่า observed heterozygosity (H_O), ค่า expected heterozygosity (H_E) และค่า P-value ของสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก (P-HWE) จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 10 ตำแหน่ง ที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ใน ปลากัดป่าภาคกลาง (*Betta splendens*)

<i>Betta splendens</i>							
ตำแหน่ง	Genbank accession number	ขนาด แอสลิล (bp)	N_A	N_E	H_O	H_E	P-HWE
BettaMS4	AB777403	259–315	5	2.09	0.47	0.54	0.167
BettaMS5	AB777406	198–218	4	2.57	0.67	0.63	> 0.9999
BettaMS8	AB777407	223	1	1	0	0	-
BettaMS14	AB777409	227–250	2	0.62	0.33	0.29	> 0.9999
BettaMS15	AB777411	216–225	3	1.85	0.33	0.48	0.1479
BettaMS17	AB777413	194–221	5	1.65	0.27	0.41	0.0863
BettaMS23	AB777415	277–296	3	1.51	0.13	0.35	0.0045*
BettaMS25	AB777416	194–224	4	2.38	0.47	0.6	0.1032
BettaMS28	AB777418	222–232	3	2.42	0.13	0.61	0.0001*
BettaMS40	AB777421	136–165	6	2.51	0.67	0.62	0.3066
Average**			3.89	1.96	0.39	0.50	

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

** ค่าเฉลี่ยหาจาก 9 ตำแหน่งที่มี polymorphic (ไม่คำนวณตำแหน่ง BettaMS8 ซึ่งมีสภาพ monomorphic)

ผลจากการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ในปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบเครื่องหมายที่มีลักษณะโพลีเมอร์ฟิค (BettaMS4, BettaMS5, BettaMS14, BettaMS15, BettaMS17, BettaMS23, BettaMS25, BettaMS28 และ BettaMS40) จำนวน 9 คู่ และ ไม่พบลักษณะโพลีเมอร์ฟิค (BettaMS8) จำนวน 1 คู่ โดยมีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (N_A) อยู่ระหว่าง 2 ถึง 6 แอลลีล (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.89) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) อยู่ระหว่าง 0.62 ถึง 2.57 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.96) ค่า observed heterozygosity (H_O) อยู่ระหว่าง 0.13 ถึง 0.67 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.39) ค่า expected heterozygosity (H_E) อยู่ระหว่าง 0.29 ถึง 0.63 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.50) (ตารางที่ 4) เมื่อทดสอบ linkage disequilibrium ไม่พบสภาพ linkage ของทุกตำแหน่ง (ตารางผนวกที่ 1)

เมื่อพิจารณาจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งของปลากัดป่าภาคกลาง (2–6 แอลลีล) กับปลาพื้นเมืองของไทย เช่น ปลากะรังหน้างอน (*Cromileptes altivelis*) ที่พัฒนาโดย Na-Nakorn *et al.* (2010) ซึ่งพบจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งอยู่ที่ 2–20 แอลลีล และในปลานู๋ทราย (*Oxyleotris marmorata*) ที่พัฒนาโดยนภาพร และคณะ (2551) พบจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งอยู่ที่ 2–14 แอลลีล พบว่าจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งที่พบในปลากัดป่าภาคกลางน้อยกว่าในปลากะรังหน้างอนและปลานู๋ทราย อาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างที่ไม่เท่ากัน ในการศึกษาที่ใช้ปลากัดป่าภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง ในขณะที่ปลากะรังหน้างอนใช้ 258 ตัวอย่าง และปลานู๋ทรายใช้ 54 ตัวอย่าง ซึ่งทำให้มีโอกาสพบแอลลีลที่หลากหลายมากกว่า แต่เมื่อพิจารณาจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งของปลาช่อน (*Channa striata*) ที่พัฒนาโดย Jamsari *et al.* (2011) ซึ่งใช้จำนวนตัวอย่าง 25 ตัวอย่าง พบจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งประมาณ 2–7 แอลลีล ซึ่งไม่แตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้

จากการทดสอบสมดุฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กทั้ง 9 ตำแหน่ง พบว่ามีเพียง 2 ตำแหน่งที่ไม่อยู่ในสมดุ คือ ตำแหน่ง BettaMS23 และ BettaMS28 อาจเกิดจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบนั้นมีจำนวนน้อยเกินไป (Lessios, 1992) ทำให้ไม่ครอบคลุมจำนวนแอลลีลที่มีอยู่จริงทั้งหมด หรือตัวอย่างปลากัดที่เก็บมาศึกษามีมากกว่า 1 ประชากร (Hedrick, 1985) อย่างไรก็ตามเครื่องหมายในตำแหน่งอื่นที่ศึกษาด้วยตัวอย่างปลาชุดเดียวกันมีค่าอยู่ในสมดุ (BettaMS4, BettaMS5, BettaMS17, BettaMS25 และ BettaMS40) จึงอาจเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากการผสมเลือดชิด จึงทำให้เกิดโฮโมไซโกตมากขึ้น ส่งผลให้ค่า observed heterozygosity มีค่าต่ำกว่าค่า expected heterozygosity อย่างไรก็ตามถ้าเกิดผลของการผสมเลือดชิดกันจะต้องส่งผลต่อเครื่องหมายทุกตำแหน่ง ไม่ควรเกิดเพียงแค่ 2 ตำแหน่ง นอกจากนี้ อาจเกิดจากสภาวะ null allele ซึ่ง null allele เป็นปรากฏการณ์ที่สามารถพบได้บ่อยในเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (Pemberton *et al.*, 1995) โดยเกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอ

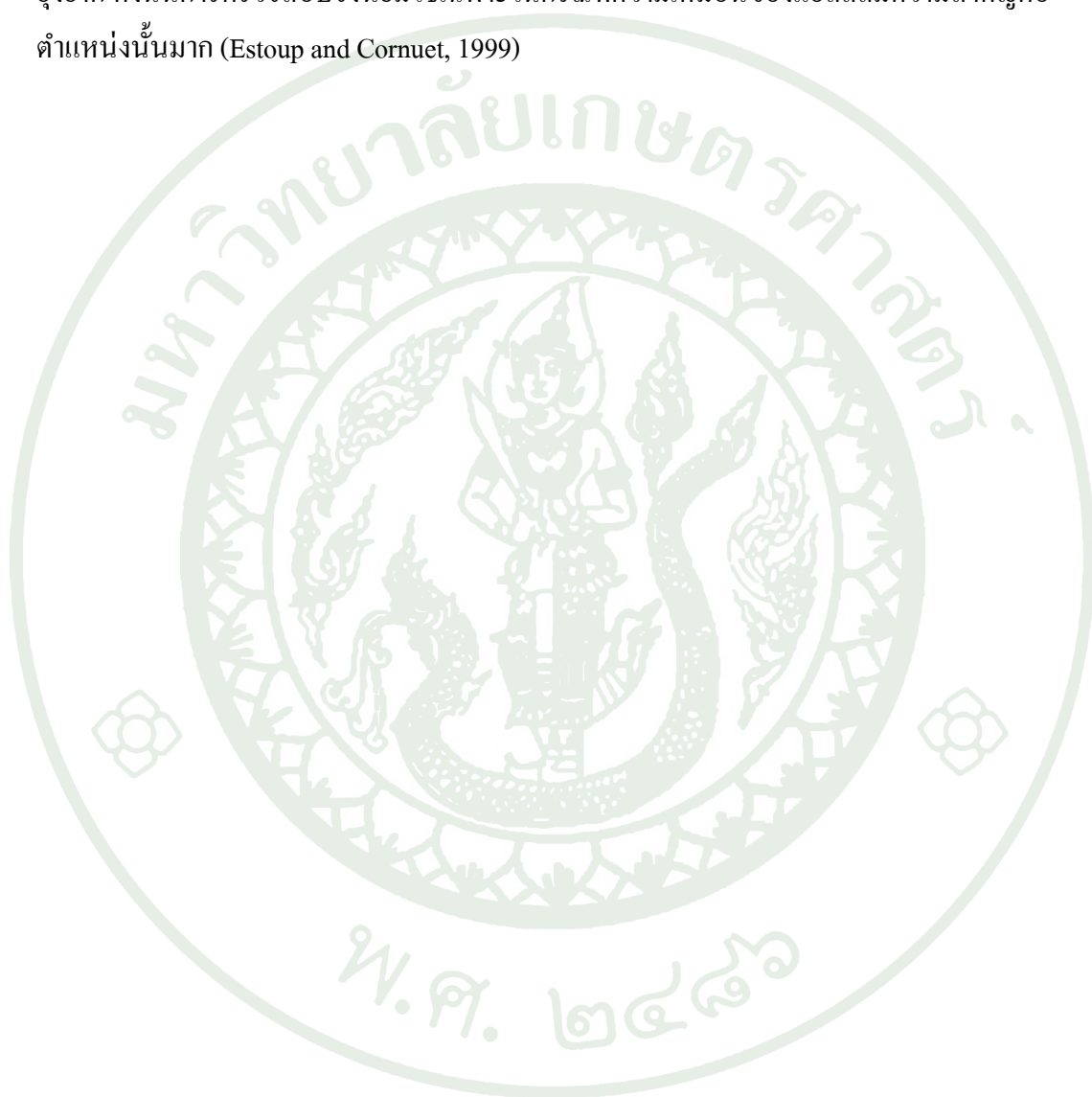
ไทด์บริเวณตำแหน่งจับของไพรเมอร์ ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ตำแหน่งดังกล่าว และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้เห็น ทำให้เกิดเฮเทอโรไซโกตน้อยกว่าความเป็นจริง (Rico *et al.*, 1997)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 5 ตำแหน่ง (*Bsp1*, *Bsp4*, *Bsp8*, *Bsp9* และ *Bsp10*) ที่พัฒนาจากปลากัดโดยสุดาวลัย (2546) พบจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (N_A) ระหว่าง 3 ถึง 10 แอลลีล (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.2) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) อยู่ระหว่าง 2.2 ถึง 8.3 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.78) ค่า observed heterozygosity (H_O) อยู่ระหว่าง 0.2 ถึง 0.7 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.46) ค่า expected heterozygosity (H_E) อยู่ระหว่าง 0.56 ถึง 0.92 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.76) เมื่อเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้พบว่าจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งน้อยกว่าการศึกษาของสุดาวลัย (2546) อาจเกิดจากการใช้ปลากัดที่มาจากแหล่งประชากรที่มีความแตกต่างกัน ทำให้มีโอกาสที่จะพบจำนวนแอลลีลได้มากกว่า นอกจากนี้ยังมีรายงานพบ null allele ที่ตำแหน่ง *Bsp10* ด้วย และควรมีการนำเอาเครื่องหมายทั้ง 5 เครื่องหมาย มาทดสอบกับปลากัดป่าภาคกลางทั้ง 15 ตัวเพื่อใช้เปรียบเทียบความหลากหลายของรูปแบบแอลลีลกับเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นมาได้ใหม่

เมื่อรวมการศึกษาทั้ง 2 พบว่าจะมีไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ที่สามารถใช้ในปลากัดจำนวน 11 คู่ ซึ่งได้จากการศึกษานี้จำนวน 7 คู่ และจากการศึกษาของสุดาวลัย (2546) จำนวน 4 คู่ โดยตัดตำแหน่งที่ไม่พบเฮเทอโรไซโกต และพบ null allele ออก เมื่อพิจารณากับโครโมโซมของปลากัดที่มีจำนวน 42 แท่ง ($2n = 42$) (Grazyna *et al.*, 2008) และลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์มีการกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม (Chambers และ MacAvoy, 2000) จะพบว่ายังมีความต้องการที่จะพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เพิ่มเป็นจำนวนมาก เพื่อนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และทำแผนที่ต่อไป

นอกจากปัญหาเกี่ยวกับ null allele ที่มักพบในเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ แล้วยังอาจพบปัญหาที่เกี่ยวกับแถบดีเอ็นเอเป็นปื้นไม่สามารถแยกเป็นแถบเดี่ยวๆ ได้ (stutter band) สาเหตุเกิดจากการเข้าสู่ตำแหน่งของไพรเมอร์ขณะเกิดกระบวนการพีซีอาร์ (Litt and Luty, 1989) หรือเกิดจากการแยกผลผลิตพีซีอาร์เป็นสายเดี่ยวได้ไม่สมบูรณ์ก่อนนำไปทำการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (O'Reilly and Wright, 1995) ทำให้เกิดการวิเคราะห์ผลผิดพลาดไป พบลักษณะโฮโมไซโกตมากกว่าความเป็นจริง และทำให้โอกาสที่ประชากรจะเบี่ยงเบนไปจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กมีมากขึ้นด้วย

นอกจากนี้อาจพบว่าการกลายภายในลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำแต่ให้ผลขนาดแอลลีลเท่าเดิม เรียกว่า homoplasious alleles มีผลให้ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีต่ำกว่าความเป็นจริง อย่างไรก็ตามการตรวจสอบ homoplasious alleles นั้นต้องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาบริเวณที่เกิดการกลายภายในลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ (Angers and Bernatchez, 1997; Taylor *et al.*, 1999) แต่ก่อนข้าง ยุ่งยาก ดังนั้นการตรวจสอบจึงนิยมใช้เฉพาะในกรณีที่ความเหมือนของแอลลีลมีความสำคัญต่อ ตำแหน่งนั้นมาก (Estoup and Cornuet, 1999)

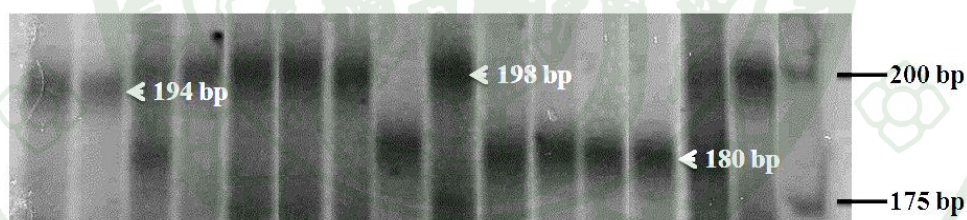


การทดสอบข้ามชนิดในปลากัดป่าภาคอีสาน (*Betta smaragdina*) และปลากัดป่าภาคใต้ (*Betta imbellis*)

จากการทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 10 คู่ในปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) จำนวน 15 ตัวอย่าง และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการตัดแถบดีเอ็นเอ โคลนแล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีไพรเมอร์เพียง 3 คู่เท่านั้น ที่สามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ในตำแหน่งเป้าหมายได้ ได้แก่ BettaMS4, BettaMS14 และ BettaMS28

BettaMS4

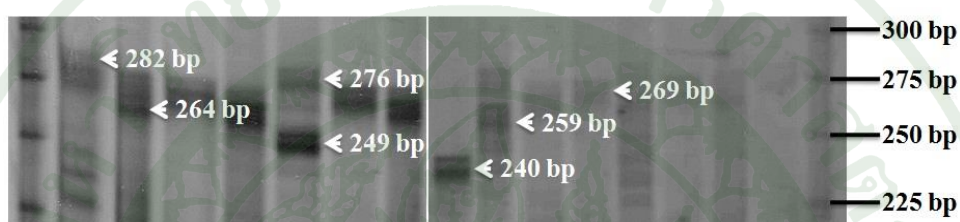
ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS4 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 3 แอลลีล (180, 194 และ 198 คู่เบส) (ภาพที่ 19) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 2.87 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.13 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.67 การทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้ไม่อยู่ในสมดุล (ค่า P -HWE น้อยกว่า 0.0001) (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 19 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS4 ในปลากัดป่าภาคอีสานจำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS14

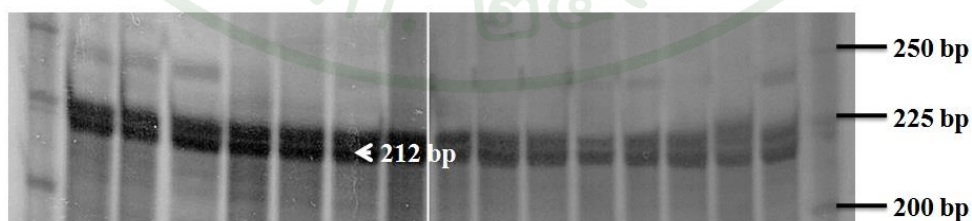
ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS14 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 7 แอลลีล (240, 249, 259, 264, 269, 276 และ 282 คู่เบส) (ภาพที่ 20) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 3.41 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.67 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.73 การทดสอบสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้ไม่อยู่ในสมดุล (ค่า P-HWE เท่ากับ 0.0008) (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 20 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS14 ในปลากัดป่าภาคอีสานจำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS28

ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS28 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 1 แอลลีล (212 คู่เบส) (ภาพที่ 21) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 1 ค่า observed heterozygosity (H_O) และค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0 (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 21 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS28 ในปลากัดป่าภาคอีสานจำนวน 15 ตัวอย่าง

ตารางที่ 5 Genbank accession number (ภาคผนวก จ), ช่วงขนาดของแอลลีล, จำนวนแอลลีล (N_A), จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E), ค่า observed heterozygosity (H_o), ค่า expected heterozygosity (H_e) และค่า P-value ของสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก (P-HWE) จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 3 ตำแหน่ง ที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ใน ปลากัดป่าภาคอีสาน (*Betta smaragdina*)

ตำแหน่ง	<i>Betta smaragdina</i>						
	Genbank accession number	ขนาด แอลลีล (bp)	N_A	N_E	H_o	H_e	P-HWE
BettaMS4	AB777404	180–198	3	2.87	0.13	0.67	< 0.0000*
BettaMS14	AB777410	240–282	7	3.41	0.67	0.73	0.0008*
BettaMS28	AB777419	212	1	1	0	0	-
		Average**	5	3.14	0.40	0.70	

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

** ค่าเฉลี่ยจาก 2 ตำแหน่งที่มี polymorphic (ไม่คำนวณตำแหน่ง BettaMS28)

ผลที่ได้จากการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ในปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบเครื่องหมายที่มีลักษณะโพลิมอร์ฟิก (BettaMS4 และ BettaMS14) จำนวน 2 คู่ และ ไม่พบลักษณะโพลิมอร์ฟิก (BettaMS28) จำนวน 1 คู่ โดยมีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (N_A) อยู่ระหว่าง 3 ถึง 7 แอลลีล (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) อยู่ระหว่าง 2.87 ถึง 3.41 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.14) ค่า observed heterozygosity (H_o) อยู่ระหว่าง 0.13 ถึง 0.67 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.40) ค่า expected heterozygosity (H_e) อยู่ระหว่าง 0.67 ถึง 0.73 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.70) (ตารางที่ 5) เมื่อทดสอบ linkage disequilibrium ไม่พบสภาพ linkage ระหว่างเครื่องหมายสองตำแหน่งนี้ (ตารางผนวกที่ 2)

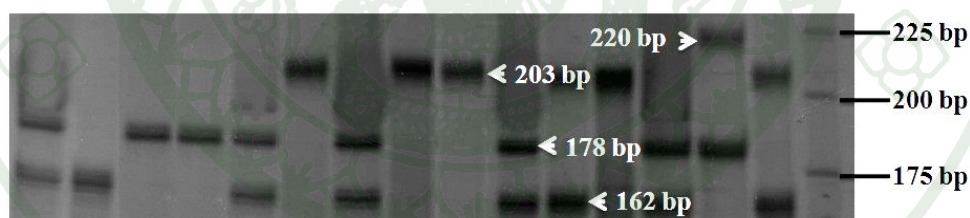
จากการทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์กทั้ง 2 ตำแหน่ง พบว่าทั้ง 2 ตำแหน่งไม่อยู่ในสมดุล โดยที่ตำแหน่ง BettaMS4 พบจำนวนแอลลีล 3 แอลลีล มีค่า observed heterozygosity เท่ากับ 0.13 อาจเกิดจาก null allele เมื่อพิจารณาที่ตำแหน่ง BettaMS14 มีค่า observed heterozygosity เท่ากับ

0.67 และพบจำนวนแอลลีลถึง 7 แอลลีล ซึ่งอาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างไม่เพียงพอ จึงควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นเพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว

การทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 10 คู่ ในปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) จำนวน 15 ตัวอย่าง และเมื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการตัดแถบดีเอ็นเอ โคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีไพรเมอร์เพียง 6 คู่ เท่านั้น ที่สามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ในตำแหน่งเป้าหมายได้ ได้แก่ BettaMS4, BettaMS8, BettaMS15, BettaMS17, BettaMS25 และ BettaMS28 ซึ่งแต่ละตำแหน่งให้ผลดังนี้

BettaMS4

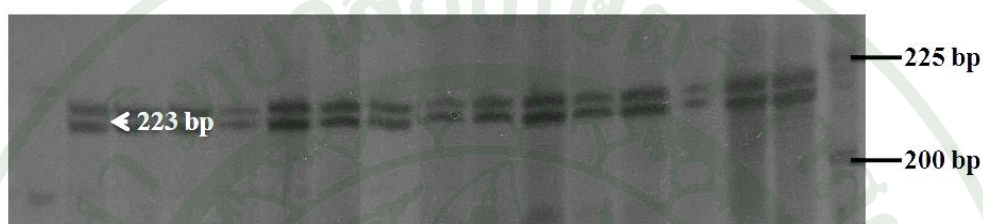
ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS4 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 4 แอลลีล (162, 178, 203 และ 220 คู่เบส) (ภาพที่ 22) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 3.20 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.53 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.71 การทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้ไม่อยู่ในสมดุล (ค่า P -HWE เท่ากับ 0.0157) (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 22 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS4 ในปลากัดป่าภาคใต้จำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS8

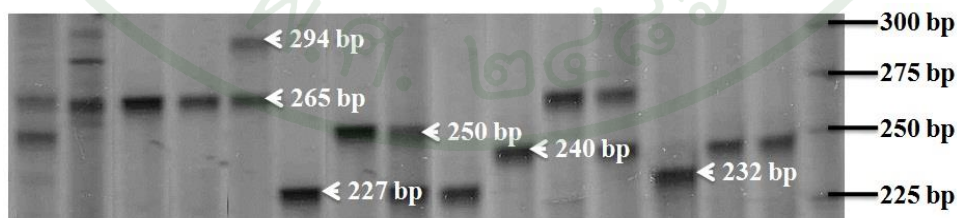
ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS8 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 1 แอลลีล (223 คู่เบส) (ภาพที่ 23) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 1 ค่า observed heterozygosity (H_O) และค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0 (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 23 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS8 ในปลากัดป่าภาคใต้จำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS15

ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS15 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 6 แอลลีล (227, 232, 240, 250, 265 และ 294 คู่เบส) (ภาพที่ 24) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 4.17 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.27 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.79 การทดสอบสมมติฐานฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้ไม่อยู่ในสมดุล (ค่า P -HWE น้อยกว่า 0.0000) (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 24 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS15 ในปลากัดป่าภาคใต้จำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS17

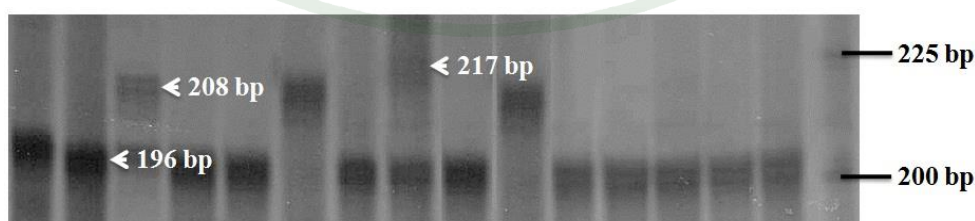
ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS17 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 5 แอลลีล (182, 186, 200, 209 และ 217 คู่เบส) (ภาพที่ 25) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 2.56 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.27 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.63 การทดสอบสมมติฐานฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้ไม่อยู่ในสมดุล (ค่า P -HWE เท่ากับ 0.0017) (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 25 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS17 ในปลากัดป่าภาคใต้จำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS25

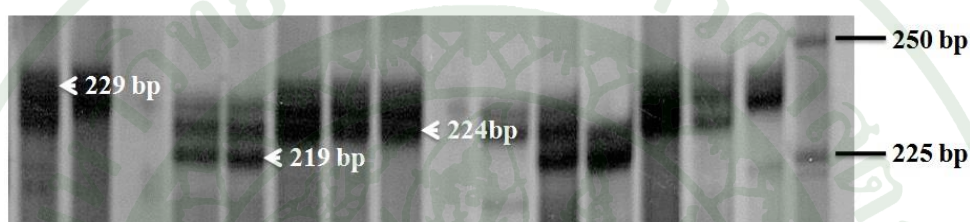
ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS25 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 3 แอลลีล (196, 208 และ 217 คู่เบส) (ภาพที่ 26) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 1.50 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.13 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.34 การทดสอบสมมติฐานฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้ไม่อยู่ในสมดุล (ค่า P -HWE เท่ากับ 0.0220) (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 26 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS25 ในปลากัดป่าภาคใต้จำนวน 15 ตัวอย่าง

BettaMS28

ผลการทดสอบตำแหน่ง BettaMS28 ในตัวอย่างปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีล (N_A) 3 แอลลีล (219, 224 และ 229 คู่เบส) (ภาพที่ 27) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) เท่ากับ 2.66 ค่า observed heterozygosity (H_O) เท่ากับ 0.67 ค่า expected heterozygosity (H_E) เท่ากับ 0.65 การทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งนี้อยู่ในสมดุล (ค่า P -HWE เท่ากับ 0.1175) (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 27 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายตำแหน่ง BettaMS28 ในปลากัดป่าภาคใต้จำนวน 15 ตัวอย่าง

ผลที่ได้จากการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ ในปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบเครื่องหมายที่มีลักษณะโพลิมอร์ฟิซึม (BettaMS4, BettaMS15, BettaMS17, BettaMS25 และ BettaMS28) จำนวน 5 คู่ และไม่พบลักษณะโพลิมอร์ฟิซึม (BettaMS8) จำนวน 1 คู่ โดยมีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (N_A) อยู่ระหว่าง 3 ถึง 6 แอลลีล (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.2) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) อยู่ระหว่าง 1.50 ถึง 4.17 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.82) ค่า observed heterozygosity (H_O) อยู่ระหว่าง 0.13 ถึง 0.67 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.37) ค่า expected heterozygosity (H_E) อยู่ระหว่าง 0.34 ถึง 0.79 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.62) (ตารางที่ 6) เมื่อทดสอบ linkage disequilibrium ไม่พบสภาพ linkage ของทุกตำแหน่ง (ตารางผนวกที่ 3)

จากการทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์กทั้ง 5 ตำแหน่ง พบว่ามี 4 ตำแหน่งที่ไม่อยู่ในสมดุล คือ ตำแหน่ง BettaMS4, BettaMS15, BettaMS17 และ BettaMS25 อาจเนื่องจากตัวอย่างปลากัดที่เก็บมามีมากกว่า 1 ประชากร การที่จำนวนตำแหน่งที่ไม่อยู่ในสมดุลหลายตำแหน่ง สาเหตุจาก null allele จึงไม่ใช่สาเหตุของการไม่อยู่ในสมดุล การที่ตัวอย่างที่เก็บมามีมากกว่า 1 ประชากรจะทำให้ค่า observed heterozygosity มีค่าน้อยกว่าค่า expected heterozygosity ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า

Wahlund effect (Hedrick, 1985) การคำนวณสมมูลจะพบว่าไม่อยู่ในสมมูล โดยเฉพาะตำแหน่งที่มีจำนวนแอลลีลมาก

ตารางที่ 6 Genbank accession number (ภาคผนวก จ), ช่วงขนาดของแอลลีล, จำนวนแอลลีล (N_A), จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E), ค่า observed heterozygosity (H_O), ค่า expected heterozygosity (H_E) และค่า P-value ของสมมูลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (P-HWE) จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 6 ตำแหน่ง ที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ในปลากัดป่าภาคใต้ (*Betta imbellis*)

<i>Betta imbellis</i>							
ตำแหน่ง	Genbank accession number	ขนาด แอลลีล (bp)	N_A	N_E	H_O	H_E	P-HWE
BettaMS4	AB777405	162–220	4	3.20	0.53	0.71	0.0157*
BettaMS8	AB777408	223	1	1	0	0	-
BettaMS15	AB777412	227–294	6	4.17	0.27	0.79	< 0.0000*
BettaMS17	AB777408	182–217	5	2.56	0.27	0.63	0.0017*
BettaMS25	AB777408	196–217	3	1.50	0.13	0.34	0.0220*
BettaMS28	AB777419	219–229	3	2.66	0.67	0.65	0.1175
Average**			4.2	2.82	0.37	0.62	

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

** ค่าเฉลี่ยหาจาก 5 ตำแหน่งที่มี polymorphic (ไม่คำนวณตำแหน่ง BettaMS8)

บริเวณที่ขนานข้างลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์ (flanking region) ในสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกัน ในตำแหน่งเดียวกันส่วนใหญ่จะเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ซึ่งบริเวณนี้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก การศึกษาบริเวณอนุรักษ์บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์สามารถนำมาใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เช่น ปลาสำลีน้ำลึก (Babbucci *et al.*, 2006) และปลาหมอเทศ (Saju *et al.*, 2010) เมื่อพิจารณาจำนวนตำแหน่งที่สามารถเพิ่มผลผลิตฟิชอร์ได้ในแต่ละชนิดพบว่าในปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) สามารถเพิ่มผลผลิตฟิชอร์ได้ 10 ตำแหน่ง ในปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) และปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) สามารถเพิ่มผลผลิตฟิชอร์ได้ 3 และ 6 ตำแหน่งตามลำดับ จำนวนตำแหน่งที่ได้แตกต่างกันอาจมีสาเหตุจากปลากัดป่าภาคใต้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปลากัดป่าภาคกลางมากกว่าปลากัดป่าภาคอีสาน จึงทำให้ปลากัดป่าภาคใต้สามารถเพิ่มผลผลิตฟิชอร์ได้จำนวนตำแหน่งมากกว่าปลากัดป่าภาคอีสาน ผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Rüber *et al.* (2004) และชวิน (2548) ที่พบว่าปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) และปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) มีความสัมพันธ์กันมากกว่าปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) นอกจากนี้ พบว่ามี 2 ตำแหน่ง คือ BettaMS4 และ BettaMS28 ที่สามารถเพิ่มผลผลิตฟิชอร์ได้ในปลากัดทั้ง 3 ชนิด แสดงว่าทั้ง 2 ตำแหน่งดังกล่าวนี้เป็นบริเวณอนุรักษ์ในปลากัดทั้ง 3 ชนิดนี้

ขนาดแอลลีลสามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายที่ใช้จำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกันได้ มีการพัฒนาการใช้ขนาดของแอลลีลมาใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์มาใช้ในการจำแนกชนิดแมลงหวี่ในพื้นที่ยุโรปเหนือ (Routtu *et al.*, 2007) และปลาเตอร์เจียนในบริเวณสหภาพโซเวียต (Barmintseva and Mugue, 2013) จากผลของขนาดแอลลีลในปลากัดทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 7) พบว่าตำแหน่ง BettaMS4 สามารถนำมาใช้พัฒนาเป็นเครื่องหมายที่ใช้จำแนกชนิดปลากัดป่าภาคกลาง ออกจากปลากัดป่าภาคอีสาน และปลากัดป่าภาคใต้ โดยปลากัดป่าภาคกลางจะพบขนาดแอลลีลอยู่ระหว่าง 259–315 คู่เบส ในขณะที่ปลากัดป่าภาคอีสานที่พบขนาดแอลลีลอยู่ระหว่าง 180–198 คู่เบส และปลากัดป่าภาคใต้ที่พบขนาดแอลลีลอยู่ระหว่าง 162–220 คู่เบส อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนตัวอย่างปลากัดจากแหล่งประชากรที่หลากหลายยังจำเป็นเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของเครื่องหมายในการแยกชนิดปลากัดป่าโดยใช้เครื่องหมาย 1 ตำแหน่งดังกล่าว

ตารางที่ 7 ขนาดแอลลีล (คู่เบส) จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งในปลากัดป่า 3 ชนิด (*Betta splendens*, *Betta smaragdina* และ *Betta imbellis*)

ตำแหน่ง	<i>Betta splendens</i>	<i>Betta smaragdina</i>	<i>Betta imbellis</i>
BettaMS4	259–315	180–198	162–220
BettaMS5	198–218	-	-
BettaMS8	223	-	223
BettaMS14	227–250	240–282	-
BettaMS15	216–225	-	227–294
BettaMS17	194–221	-	182–217
BettaMS23	277–296	-	-
BettaMS25	194–224	-	196–217
BettaMS28	222–232	212	219–229
BettaMS40	136–165	-	-

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาได้ข้อสรุปดังนี้

1. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) ด้วยวิธี microsatellite enrichment สามารถสร้าง microsatellite enriched library ได้จำนวน 767 โคลน พบว่ามีโคลนที่มีดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์อยู่จำนวน 591 โคลน (77.05%) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลท์แบบ dinucleotide ชนิด GT/AC พบมากที่สุด ซึ่งพบถึง 51.06% รองลงมาคือชนิด GA/TC พบ 27.66%
2. ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 44 ตำแหน่ง และมี 10 ตำแหน่งที่สามารถออกแบบไพรเมอร์ แล้วเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ในตำแหน่งเป้าหมายได้ คือ BettaMS4, BettaMS5, BettaMS8, BettaMS14, BettaMS15, BettaMS17, BettaMS23, BettaMS25, BettaMS28 และ BettaMS40
3. ผลที่ได้จากการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ในปลากัดป่าภาคกลาง (*B. splendens*) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบเครื่องหมายที่มีลักษณะโพลิมอร์ฟิก (BettaMS4, BettaMS5, BettaMS14, BettaMS15, BettaMS17, BettaMS23, BettaMS25, BettaMS28 และ BettaMS40) จำนวน 9 คู่ และไม่พบลักษณะโพลิมอร์ฟิก (BettaMS8) จำนวน 1 คู่ โดยมีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (N_A) อยู่ระหว่าง 2 ถึง 6 แอลลีล (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.89) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) อยู่ระหว่าง 0.62 ถึง 2.57 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.96) ค่า observed heterozygosity (H_O) อยู่ระหว่าง 0.13 ถึง 0.67 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.39) ค่า expected heterozygosity (H_E) อยู่ระหว่าง 0.29 ถึง 0.63 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.50)
4. จากการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กทั้ง 9 ตำแหน่งพบว่า มี 2 ตำแหน่งที่ไม่อยู่ในสมดุลคือ ตำแหน่ง BettaMS23 และ BettaMS28 ซึ่งอาจเกิดจากสภาวะ null allele และเมื่อทดสอบ linkage disequilibrium ไม่พบสภาพ linkage จากทั้ง 9 ตำแหน่ง
5. การทดสอบการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ข้ามชนิดในปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) และปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ได้ 3 ตำแหน่ง (BettaMS4, BettaMS14 และ BettaMS28) ในปลากัดป่าภาคอีสาน (*B. smaragdina*) โดยมีจำนวน

แอลลีลต่อตำแหน่ง (N_A) อยู่ระหว่าง 3 ถึง 7 แอลลีล (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) อยู่ระหว่าง 2.87 ถึง 3.41 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.14) ค่า observed heterozygosity (H_O) อยู่ระหว่าง 0.13 ถึง 0.67 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.40) ค่า expected heterozygosity (H_E) อยู่ระหว่าง 0.67 ถึง 0.73 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.70) และสามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ได้ 6 ตำแหน่ง (BettaMS4, BettaMS8, BettaMS15, BettaMS17, BettaMS25 และ BettaMS28) ในปลากัดป่าภาคใต้ (*B. imbellis*) โดยมีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (N_A) อยู่ระหว่าง 3 ถึง 6 แอลลีล (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.2) จำนวนแอลลีลที่แท้จริงต่อตำแหน่ง (N_E) อยู่ระหว่าง 1.50 ถึง 4.17 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.82) ค่า observed heterozygosity (H_O) อยู่ระหว่าง 0.13 ถึง 0.67 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.37) ค่า expected heterozygosity (H_E) อยู่ระหว่าง 0.34 ถึง 0.79 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.62)

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชวิน ต้นพิทยคุปต์. 2548. ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลากัด (*Betta spp.*) ในประเทศไทย โดยอาศัย Random Amplified Polymorphic DNAs. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฐนิตา บุญสร้างสม. 2550. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นางพาง พลอยสายทอง. 2546. คู่มือปลากัด. เพ็ท-แพล้น พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

นภาพร ศรีพุฒินิพนธ์, อภิรติ หันพงษ์ศักดิ์กุล และ วงศ์ปฐม กมลรัตน์. 2551. การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ไพรมเมอร์สำหรับปลาบู่ทราย เพื่อการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร. เอกสารวิชาการฉบับที่ 8/2551. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 16 หน้า.

พิชัย สราญรมย์. 2557. ปลากัดไทย. ข่าวสารเกษตรศาสตร์ 26 (6): 54-59.

วันเพ็ญ มินกาญจน์, นงนุช เล่าหะวิสุทธิ และ สุภาพ พรหมยศ. 2531. การเพาะพันธุ์ปลากัด. เอกสารเผยแพร่ ฉบับที่ 14. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง. 16 หน้า.

ศรีจรรยา สุขมนโนมนต์. 2546. การพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ไพรมเมอร์สำหรับปลาดุกอูยและการประยุกต์เพื่อการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุดาวลัย ศรีไพโรจน์. 2546. การพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ไพรมเมอร์ในปลากัด, *Betta splendens*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการ ม.อบ. 5 (2): 37–58.

อมรา คัมภีรานนท์. 2542. พันธุศาสตร์มนุษย์. บริษัทแท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.

Ablan, M.C.A. 2006. Microsatellite loci for studies on population differentiation and connectivity of the red-bellied yellow tail fusilier, *Caesio Cuning* (Caesionidae). **Mol. Ecol. Notes.** 6 (1): 170–172.

Angers, B. and L. Bernatchez. 1997. Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. **Mol. Biol. Evol.** 14: 230–238.

Babbucci, M., L. Zane, F. Andaloro and T. Patarnello. 2006. Isolation and characterization of microsatellite loci from yellowtail *Seriola dumerilii* (Perciformes: Carangidae). **Mol. Ecol. Notes.** 6 (4): 1126–1128.

Barmintseva, A.E. and N.S. Mugué. 2013. The use of microsatellite loci for identification of sturgeon species (Acipenseridae) and hybrid forms. **Russ. J. Genet.** 49 (9): 950–961.

Beacham, T.D., S. Pollard and K.D. Le. 2000. Microsatellite DNA population structure and stock identification of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Nass and Skeena river in northern British Columbia. **Mar. Biotechnol.** 2: 587–600.

Benbouza, H., J.M. Jacquemin, J.P. Baudin and G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. **Biotech. Agron. Soc. Environ.** 10: 77–81.

Brown, S.M., A.K. Szewc–McFadden and S. Kresovich. 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis, pp.147–159. *In* Jauhar,

p.p., ed. **Methods of Plant Genome Analysis: Their Merits and Pitfalls**. CRS Press, U.S.A.

Carleton, K.L., J.T. Streelman, B.Y. Lee, N. Garnhart, M. Kidd and T.D. Kocher. 2002. Rapid isolation of CA microsatellite from the tilapia genome. **Anim. Genet.** 33: 140–144.

Chambers, G.K. and E.S. MacAvoy. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. **Comp. Biochem. Physiol.** 126: 455–476.

Desvignes, J.F., J. Laroche, J.D. Durand and Y. Bouvet. 2001. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. **Aquaculture** 194: 291–301.

Estoup, A. and J.M. Cornuet. 1999. Microsatellite evolution: inferences from population data, pp. 49–65. In D.B. Goldstein and C. Schlotterer, eds. **Microsatellites Evolution and Applications**. Oxford University Press Inc., New York.

Goldstein, R. J. 2001. **Bettas a Complete Pet Owner's Manual**. Barron's Educational Series Inc, New York.

Grazyna, F.S., D.F. Bayat, M. Jankun, S. Krejszeff and A. Mamcarz. 2008. Note on the karyotype and NOR location of siamese fighting fish, *Betta splendens* (Perciformes, Osphronemidae). **Caryologia** 61 (4): 349-353.

Gur-Arie, R., C.J. Cohen, Y. Eitan, L. Shelef, E.M. Hallerman and Y. Kashi. 2000. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. **Genome Res.** 10: 62–71.

Hara, M. and M. Sekino. 2003. Efficient detection of parentage in a cultured japanese flounder *paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. **Aquaculture** 217: 107–114.

- Hedrick, P.W. 1985. **Genetics of Population**. Jones and Baettett Publishers, Inc., USA.
- Jamsari, A.F.J., T. Min–Pau and M.N. Siti–Azizah. 2011. Isolation and multiplex genotyping of polymorphic microsatellite DNA markers in the snakehead murrel, *Channa striata*. **Genet. Mol. Biol.** 34 (2): 345–347.
- Kamonrat, W. 1996. **Spatial Genetic Structure of Thai Silver Barb *Puntius gonionotus* (Bleeker) Populations in Thailand**. Ph.D. Thesis, Dalhousie University.
- Kimura, M. and J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics** 49: 725–738.
- Kottelat, M. 2001. **Fishes of Laos**. WHT Publications Ltd., Colombo 5, Sri Lanka.
- Kowasupat, C., B. Panijpan, N. Sriwattanothai and P. Ruenwongsa. 2012a. *Betta mahachaiensis*, a new species of bubble–nesting fighting fish (Teleostei: Osphronemidae) from Samut Sakhon Province, Thailand. **Zootaxa** 3522: 49–60.
- Kowasupat, C., B. panijpan, P. Ruenwongsa and T. jeenthong. 2012b. *Betta siamorientalis*, a new species of bubble–nest building fighting fish (Teleostei: Osphronemidae) from eastern Thailand. **Vertebrate Zoology** 62(3): 387–397.
- Lazar, I. and I. Lazar. 2010. **Gel Analyzer**. Available Source: <http://www.gelanalyzer.com/index.html>, April 4, 2012.
- Lee, W.J. and T.D. Kocher. 1996. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. **J. Fish. Biol.** 49: 169–171.
- Lessios, H.A. 1992. Testing electrophoretic data for agreement with Hardy–Weinberg expectaions. **Mar. Biol.** 112: 517–523.

- Litt, M. and J.A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.** 44: 397–401.
- McConnell, S.K., P. O'Reilly, L. Hamilton, J.M. Wright and P. Bentzen. 1995. Polymorphic microsatellite loci from atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiation of north American and European populations. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 52: 1863–1872.
- Miller, L.M. and A.R. Kapuscinski. 1996. Microsatellite DNA markers reveal new levels of genetic variation in northern pike. **Trans. Am. Fish. Soc.** 125: 971–977.
- Miller–Sims, V., J. Atema, M.J. Kingsford and G. Gerlach. 2004. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers in the cardinalfish (*Apogon Doederleini*). **Mol. Ecol. Notes.** 4 (3): 336–338.
- Monvises, A., B. Nuangsaeng, N. Sriwattanarothai and B. Panijpan. 2009. The siamese fighting fish: well-known generally but little-known scientifically. **ScienceAsia** 35 (1): 8–16.
- Morgante, M. and A.M. Olivieri. 1993. PCR–amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant J.** 3: 175–182.
- Morgante, M., M. Hanafer and W. Powell. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nat. Genet.** 30: 194–200.
- Na–Nakorn, U., R. Yashiro, A. Wachirachaikarn, W. Prakoon and N. Pansaen. 2010. Novel microsatellites for multiplex PCRs in the humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828), and applications for broodstock management. **Aquaculture** 306 (1–4): 57–62.

- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 89: 583–590.
- Nelson, J.S. 2006. **Fishes of the World**. 4th ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Norris, A.T., D.G. Bradley and E.P. Cunningham. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. **Aquaculture** 180: 247–264.
- O'Reilly, P.T. and J.M. Wright. 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. **J. Fish Biol.** 47 (Sup. A): 29–55.
- Ozaki, A., T. Sakamoto, S. Khoo, K. Nakamura, M.R.M. Coimbra, T. Akutsu and N. Okamoto. 2000. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Mol. Genet. Genomics**. 265: 23–31.
- Park, S.D.E. 2001. **Trypanotolerance in West African cattle and the Population Genetic Effects of Selection**. Ph.D. thesis, University of Dublin.
- Paterson, A.H. 1996 . **Genome Mapping in Plants**. Academic Press, Inc., U.S.A.
- Powell, W., C. Machray and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Sci.** 1: 215–222.
- Rainboth, W.J. 1996. Fishes of the Cambodian Mekong. **FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes**. FAO, Rome.

- Pemberton, J.M., J. Slate, D.R. Bancroft and J.A. Barrett. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. **Mol. Ecol.** 4: 249–252.
- 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.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: A complete reimplementation of the genepop software for windows and linux. **Mol. Ecol. Resources** 8: 103–106.
- Routtu, J., A. Hoikkala and M. Kankare. 2007. Microsatellite-based species identification method for *Drosophila virilis* group species. **Hereditas** 144: 213–221.
- Rozen, S. and H.J. Skaletsky. 2000. Primer3: bioinformatics methods and protocols, pp. 365–386. In Krawetz, S. and S. Misener, eds. **Methods in Molecular Biology**. Humana Press, New Jersey. Available at [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi].
- Rüber, L., R. Britz, H.H. Tan, P.K.L. Ng and R. Zardoya. 2004. Evolution of mouthbrooding and life-history correlates in the fighting fish genus *Betta*. **Evolution**. 58 (4):799–813.
- Saju, J.M., W.J. Lee and L. Orban. 2010. Characterization of nine novel microsatellites isolated from mozambique tilapia, *Oreochromis Mossambicus*. **Conserv. Genet. Resour.** 2 (1): 385–387.
- Schindler, I. and J. Schmidt. 2006. Review of the mouthbrooding betta (Teleostei, Osphronemidae) from Thailand, with descriptions of two new species. **Z. Fischk. Bd.** 8 Heft 1/2: 47–69.

- Shikano, T. and N. Taniguchi. 2002. Relationships between genetic variation measured by microsatellite DNA markers and a fitness-related trait in the guppy (*Poecilia reticulata*). **Aquaculture** 209: 77–90.
- Shimoda, N., E.W. Knapik, J. Ziniti, C. Sim, E. Yamada, S. Kaplan, D. Jackson, F. De Sauvage, H. Jacob and M.C. Fishman. 1999. Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. **Genomics** 58: 219–232.
- Taylor, J.S., J.S.P. Sanny and F. Breden. 1999. Microsatellite allele size homoplasy in the guppy (*Poecilia reticulata*). **J. Mol. Evol.** 48: 245–247.
- The Bettas4all Show Team. 2014. **Betta Territory**. Available Source: <http://www.bettaterritory.nl/BT-AABcoppergenetics.htm>, April 14, 2014.
- Weber, J.L. and P.E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be types using polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.** 44: 388–396.
- Xu, Z., J.H. Primavera, L.D. de la Pena, P. Pettit, J. Belak and A. Alcivar-Warren. 2001. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. **Aquaculture** 199: 13–40.
- Yaish, M.W.F. and M. Pérez de la Vega. 2003. Isolation of (GA)_n microsatellite sequences and description of a predicted MADS-Box sequence isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genet. Mol. Biol.** 3: 337–342.
- Yue, G.H., F. Chen and L. Orban. 2000. Rapid isolation and characterization of microsatellites from the genome of asian arowana (*Scleropages formosus*, Osteoglossidae, Pisces). **Mol. Ecol.** 9: 1007–1009.





การสร้างโคลนที่มีดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธี SSR enrichment (Yaish and Vega, 2003)

1. การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

1.1. ตัดดีเอ็นเอปลายกั๊ดที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* (New England Biolabs, Beijing, China) โดยเติมสารต่างๆดังนี้

ดีเอ็นเอปลายกั๊ดที่สกัดได้ (200 ng/μl)	5 ไมโครลิตร
10X reaction buffer	5 ไมโครลิตร
<i>MseI</i> restriction enzyme (10,000 U/ml)	1 ไมโครลิตร
BSA (10mg/ml)	0.5 ไมโครลิตร
เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้	50 ไมโครลิตร

1.2. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12–18 ชั่วโมง

2. การต่อดีเอ็นเอที่ตัดแล้วเข้ากับ adaptor

2.1. เชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ตัดแล้วเข้ากับ *MseI* adaptor ใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (New England Biolabs, Massachusetts, USA) โดยเติมสารต่างๆดังนี้

ดีเอ็นเอที่ตัดแล้ว	45 ไมโครลิตร
<i>MseI</i> adaptor (12.5 pmol/μl)	8 ไมโครลิตร
10X T4 ligase buffer	10 ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (1U/μl)	4 ไมโครลิตร
เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้	100 ไมโครลิตร

2.2. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิห้องอีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดย *MseI* adaptor มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

5'GACGATGAGTCCTGAG 3'

3'TACTCAGGACTCAT 5'

3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตัดต่อแล้วด้วยวิธีพีซีอาร์

3.1. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเติมสารต่างๆดังนี้

ดีเอ็นเอที่ตัดต่อแล้ว	20 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ M1 (5 pmol/μl)	4 ไมโครลิตร
(5'GACGATGAGTCCTGAG 3')	
dNTP (2 mM)	6 ไมโครลิตร
10X PCR buffer	6 ไมโครลิตร
MgCl ₂ (50mM)	0.6 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.4 ไมโครลิตร
(Invitrogen, California, USA)	
เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้	60 ไมโครลิตร

3.2. ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำพีซีอาร์ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1	denaturation	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นตอนที่ 2	detaturation	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
	annealing	45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
	extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
	ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 30 รอบ	
ขั้นตอนที่ 3	extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.3. ตรวจสอบผลการตัดต่อดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล เข้มข้น 1 % ใน TAE buffer และย้อมเจลด้วย etidium bromide นำไปส่องดูภายใต้แสง ultra violet

4. การไฮบริไดเซชันชิ้นดีเอ็นเอกับโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน(biotin)

4.1. นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มา 40 ไมโครลิตร ไฮบริไดเซชันกับโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับเบสซ้ำจำนวน 8 ชนิดได้แก่ B- (CA)₁₅,

B-(GA)₁₅, B-(CA)₁₅, or B-(ACC)₁₀, B-(CCT)₁₀, B-(GAT)₁₀, B-(CAG)₁₀ และ B-(GCT)₁₀ (First base, Seri Kembangan, Malaysia) ซึ่งโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 5 pmol/μl โดยใช้ปริมาตรชนิดละ 2 ไมโครลิตร นำไปรวมกับ hybridization buffer (6X SSC, 0.1% SDS) ปริมาตร 44 ไมโครลิตร จะมีปริมาตรรวมเท่ากับ 100 ไมโครลิตร

4.2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10–15 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว แล้วย้ายไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12–18 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอของปลากัดและโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์จับเข้าคู่กัน

5. การคัดเลือกรหัสดีเอ็นเอที่มีดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ด้วยการทำปฏิกิริยาระหว่างไบโอตินกับสเตรปตาวิดิน (streptavidin) ที่เคลือบอยู่บนเม็ดแม่เหล็ก (magnetic beads)

5.1. การเตรียมเม็ดแม่เหล็ก (Dynabeads[®] Myone[™] Streptavidin C1 (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway))

5.1.1. ดูดเม็ดแม่เหล็กออกมาใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

5.1.2. เติม Binding and Washing buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1M NaCl) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

5.1.3. วางหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ลงบนแท่นแม่เหล็กทิ้งไว้ 1 นาที เพื่อให้เม็ดแม่เหล็กถูกดูดไปรวมกันที่ข้างหลอด แล้วดูดเอาสารละลายทิ้งไป

5.1.4. ทำซ้ำตามขั้นตอนในข้อ 5.1.2 – 5.1.3 จำนวน 3–4 ครั้ง

5.1.5. เติม Hybridization buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

5.2. นำดีเอ็นเอที่ไฮบริไดเซชันกับโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์แล้วมาผสมรวมกับเม็ดแม่เหล็กที่เตรียมไว้ เพื่อให้ไบโอตินที่ติดอยู่กับโพรบจับกับสเตรปตาวิดินที่เคลือบอยู่บนเม็ดแม่เหล็ก โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–4 ชั่วโมง (ผสมให้เข้ากันทุก 30 นาที)

6. การล้างดีเอ็นเอออกจากเม็ดแม่เหล็ก

6.1. นำหลอดไมโครเซนตริฟิวส์วางลงบนแท่นแม่เหล็กทิ้งไว้ 1 นาที เพื่อให้เม็ดแม่เหล็กถูกดูดไปรวมกันที่ข้างหลอด แล้วดูดเอาสารละลายทิ้งไป

6.2. เติมสารละลาย 2XSSC, 0.1% SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

6.3. นำหลอดไมโครเซนตริฟิวส์วางลงบนแท่นแม่เหล็กทิ้งไว้ 1 นาที แล้วดูดสารละลายทิ้งไป

6.4. ทำซ้ำข้อ 6.2 – 6.3 อีกครั้ง

6.5. เติมสารละลาย 1XSSC, 0.1% SDS ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6.6. นำหลอดไมโครเซนตริฟิวส์วางลงบนแท่นแม่เหล็กทิ้งไว้ 1 นาที แล้วดูดสารละลายทิ้งไป

6.7. ทำซ้ำข้อ 6.5 – 6.6 อีกครั้ง

6.8. เติมสารละลาย 1XSSC, 0.1% SDS ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6.9. นำหลอดไมโครเซนตริฟิวส์วางลงบนแท่นแม่เหล็กทิ้งไว้ 1 นาที แล้วดูดสารละลายทิ้งไป

6.10. ทำซ้ำข้อ 6.8 – 6.9 อีกครั้ง

6.11. ล้างดีเอ็นเอออกจากเม็ดแม่เหล็ก โดยเติม TE ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6.12. นำหลอดไมโครเซนตริฟิวส์วางลงบนแท่นแม่เหล็กทิ้งไว้ 1 นาที แล้วดูดสารละลาย ย้ายไปลงหลอดใหม่อย่างรวดเร็ว

7. การสร้างดีเอ็นเอสายคู่จากชิ้นดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้

7.1. สร้างดีเอ็นเอสายคู่จากดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่คัดเลือกได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเติมสารต่างๆ ดังนี้

ดีเอ็นเอที่คัดเลือกมาได้จากข้อ 6.12	2 ไมโครลิตร
Primer M1 (5 pmol/μl) (5'GACGATGAGTCCTGAG 3')	2 ไมโครลิตร
dNTP (2 mM)	2 ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2 ไมโครลิตร
MgCl ₂ (50mM)	0.8 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 U/μl) (Invitrogen, California, USA)	0.5 ไมโครลิตร
เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 20 ไมโครลิตร	

7.2. ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำพีซีอาร์เหมือนข้อ 3.2

7.3. ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล เข้มข้น 1 % ใน TAE buffer และย้อมเจลด้วย etidium bromide นำไปส่องดูภายใต้แสง ultra violet

8. การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด

8.1. เชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ทำเป็นสายคู่แล้วเข้ากับพลาสมิด (PGEM®-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA)) โดยเติมสารต่างๆดังนี้

ผลผลิตพีซีอาร์ที่เป็นดีเอ็นเอสายคู่	3 ไมโครลิตร
2X Ligation buffer	5 ไมโครลิตร
Plasmid pGEM [®] –T Vector	1 ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (400,000 U/μl)	1 ไมโครลิตร

8.2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12–18 ชั่วโมง

9. การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

9.1. นำเอาพลาสมิดที่เชื่อมต่อกับดีเอ็นเอเป้าหมายแล้วไปถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดยนำเอาพลาสมิดที่เชื่อมต่อได้มาใส่ลงในคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell) สายพันธุ์ DH-500 และนำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที

9.2. นำคอมพีเทนต์เซลล์ไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสอย่างรวดเร็ว (heat shock) เป็นเวลา 45 วินาที แล้วย้ายหลอดลงน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว แช่ไว้เป็นเวลา 2 นาที

9.3. เติม SOC (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20 mM glucose pH 6.8–7) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

9.4. คูลเซลล์แบคทีเรียที่ได้ มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 μg/ml, X-gal 40 μg/ml และ IPTG 40 μg/ml

9.5. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลงเชื้อไปแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาทำการทดสอบต่อไป



การตรวจสอบและคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์

1. การตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกสอดในพลาสมิด โดยวิธีพีซีอาร์

1.1. เก็บโคโลนีสีขาว โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยโคโลนีสีขาว นำเชื้อลงไปละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร ที่อยู่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์

1.2. ตรวจหาขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกสอดอยู่ในพลาสมิดด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเติมสารต่างๆ ดังนี้

ตัวอย่างเชื้อจากโคโลนีที่แยกมาได้จากข้อ 1.1	2 ไมโครลิตร
M13 forward primer (5 pmol/μl) (5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3')	0.5 ไมโครลิตร
M13 reverse primer (5 pmol/μl) (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3')	0.5 ไมโครลิตร
dNTP (2 mM)	2 ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2 ไมโครลิตร
MgCl ₂ (50mM)	0.8 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 U/μl) (Invitrogen, California, USA)	0.1 ไมโครลิตร
เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 20 ไมโครลิตร	

1.3. ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำพีซีอาร์ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1	denaturation	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นตอนที่ 2	detaturation	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
	annealing	50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
	extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
	ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 30 รอบ	
ขั้นตอนที่ 3	extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.4. ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล เข้มข้น 1 % ใน TAE buffer และย้อมเจลด้วย etidium bromide นำไปส่องดูภายใต้แสง ultra violet

2. การตรวจสอบหาโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลท์ โดยวิธี dot-blot hybridization

2.1. การเตรียมแผ่นเมมเบรน

- 2.1.1. ตัดแผ่นไนลอนเมมเบรนให้ได้ขนาด 10x10 ตารางเซนติเมตร
- 2.1.2. ตัดกระดาษกรองให้มีขนาดใหญ่กว่าแผ่นไนลอนเมมเบรนเล็กน้อย
- 2.1.3. นำแผ่นไนลอนเมมเบรนจุ่มลงในน้ำกลั่น และสารละลาย 20X SSC ให้ทั่วแผ่น
- 2.1.4. วางแผ่นไนลอนเมมเบรนลงบนกระดาษกรอง เพื่อซับเอาน้ำและสารละลาย 20X SSC ส่วนเกินออก และย้ายแผ่นไนลอนเมมเบรนไปวางบนถุงพลาสติกใสเพื่อเตรียมหยดตัวอย่างดีเอ็นเอลงแผ่นไนลอนเมมเบรน
- 2.1.5. นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 1 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว และย้ายลงน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว
- 2.1.6. หยดผลผลิตพีซีอาร์ที่เตรียมไว้แล้วลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน ตัวอย่างละ 1 ไมโครลิตร
- 2.1.7. ตรึงตัวอย่างดีเอ็นเอกับแผ่นไนลอนเมมเบรนโดยนำเอาแผ่นไนลอนเมมเบรนไปฉายแสง ultra violet เป็นเวลา 10 นาที

2.2. การไฮบริไดเซชัน

- 2.2.1. ย้ายแผ่นไนลอนเมมเบรนลงในขวดไฮบริไดเซชัน และเติม Hybridization buffer (6XSSC, 0.1%SDS, 5% dextran sulphate และ 5% liquid block) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

2.2.2. นำขวดไฮบริไดเซชันไปใส่ในตู้ไฮบริไดเซชัน เพื่อทำการเตรียมแผ่นไนลอนเมมเบรนให้พร้อมก่อนที่จะไฮบริไดเซชัน (Pre-hybridization) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.2.3. เตรียมโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับเบสจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ B- (CA)₁₅, B- (GA)₁₅, B- (CA)₁₅, or B- (ACC)₁₀, B- (CCT)₁₀, B- (GAT)₁₀, B- (CAG)₁₀ และ B- (GCT)₁₀ (First base, Seri Kembangan, Malaysia) ซึ่งโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 5 pmol/μl โดยใช้ปริมาตรชนิดละ 2 ไมโครลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 184 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายลงน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว

2.2.4. เติมโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.3 ลงในขวดไฮบริไดเซชันที่มีแผ่นไนลอนเมมเบรนอยู่

2.2.5. นำขวดไฮบริไดเซชันไปใส่ในตู้ไฮบริไดเซชัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2.2.6. ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนเพื่อเอาโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้เข้าจับกับดีเอ็นเอที่อยู่บนแผ่นไนลอนเมมเบรนออก ด้วย 1X hybridization stringency wash (6XSSC and 0.1% SDS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง

2.3. การตรวจสอบผลการไฮบริไดเซชัน

2.3.1. นำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาตรวจจับหาโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ชุดตรวจจับสำเร็จรูป Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) ซึ่งชุดนี้จะเข้าจับกับไบโอตินที่ติดอยู่กับโพรบ และจะทำปฏิกิริยาแล้วปล่อยสัญญาณออกมา

2.3.2. การตรวจจับสัญญาณด้วยฟิล์ม X-ray

2.3.2.1. นำแผ่นในลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 2.3.1 มาห่อด้วยแผ่นฟิล์ม
ถนอมอาหาร (wrap)

2.3.2.2. นำแผ่นในลอนเมมเบรนที่ห่อแล้วไปติดบน cassette (Kodak
[Rochester, NY] X-Omatic Cassette)

2.3.2.3. นำฟิล์ม X-ray และ cassette ย้ายไปในห้องมืด ที่มีแต่แสงสีแดง
(filtered safelight)

2.3.2.4. นำแผ่นฟิล์ม X-ray มาประกบกับแผ่นในลอนเมมเบรนใน
cassette ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที

2.3.2.5. นำแผ่นฟิล์ม X-ray ออกมาแช่ในน้ำยา Developer (Kodak liquid
X-ray developer) จนกว่าจะเห็นจุดสีดำ

2.3.2.6. ย้ายแผ่นฟิล์ม X-ray ลงในน้ำกลั่น แช่ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที

2.3.2.7. ย้ายแผ่นฟิล์ม X-ray ลงในน้ำยา Fixer (Kodak liquid X-ray
Fixer) ประมาณ 2 นาที แล้วนำแผ่นฟิล์ม X-ray ไปตากให้แห้ง



การทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนโพลีอะครีลาไมด์เจล ความเข้มข้น 6% และการย้อมเจลที่ได้ด้วยวิธี silver staining

1. การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

- 1.1. ล้างกระจกให้สะอาด และเช็ดกระจกด้วย 95% แอลกอฮอล์
- 1.2. เคลือบสารที่ทำให้เจลติดกระจกบนกระจกแผ่นหลังโดยการเท bind silane (bine silane 1.5 ไมโครลิตร, glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และ 95% แอลกอฮอล์ 500 ไมโครลิตร) แล้วปล่อยให้แห้ง
- 1.3. เคลือบสารที่ทำให้เจลไม่ติดกระจกบนกระจกแผ่นหน้าโดยการเช็ดกระจกแผ่นหน้าด้วย repel silane
- 1.4. นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกบกัน แล้วใช้แผ่นพลาสติก (spacer) คั่นระหว่างกระจก บริเวณขอบกระจกทั้ง 2 ข้าง เพื่อให้มีช่องว่างระหว่างกระจกสำหรับการเทเจล
- 1.5. หนีบกระจกด้วยตัวหนีบ เพื่อป้องกันกระจกทั้ง 2 แผ่นแยกออกจากกัน

2. การเตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจล เข้มข้น 6% และเทเจลลงในกระจก

- 2.1. ชั่งยูเรีย 6.75 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 3.75 มิลลิลิตร และเติม 5X TBE ปริมาณ 3 มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่ 50 องศาเซลเซียสเพื่อให้ยูเรียละลายให้หมด
- 2.2. เติม acrylamide:bisacrylamide (19:1) ความเข้มข้น 30% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร, ammonium persulfate (APS) ความเข้มข้น 30% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ TEMED (Tetramethylethylenediamine) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงไปในละลายละลายยูเรีย ผสมให้เข้ากัน
- 2.3. นำโพลีอะครีลาไมด์เจลที่ผสมเสร็จแล้วมาเทลงช่องว่างระหว่างกระจกที่เตรียมไว้ ระวังฟองอากาศในกระจก นำหวี (comb) เสียบลงไปบริเวณช่องว่างระหว่างกระจกด้านบน เพื่อทำ

เป็นช่องสำหรับใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอ เมื่อเทเสร็จเรียบร้อยแล้วให้ตั้งทิ้งไว้ 2–3 ชั่วโมงเพื่อให้เจลแข็งตัวอย่างสมบูรณ์

3. การทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนโพลีอะครีลาไมด์เจล

3.1. ดึงหัวออกจากกระบอก นำกระบอกไปล้างทำความสะอาดเอาเศษเจลที่ติดข้างกระบอกออกจนหมด โดยไม่เอาแผ่นพลาสติกที่กั้นระหว่างกระบอกออก

3.2. นำกระบอกที่ทำความสะอาดแล้วไปประกอบกับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส และเติม 1X TBE buffer ลงไปในช่องทั้งด้านบนและด้านล่าง

3.3. ทำการเตรียมพร้อมเจล โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 300 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

3.4. นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ต้องการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนโพลีอะครีลาไมด์เจล ไปเติม loading dye (98% formamide, 10mM EDTA, 0.1% bromphenol blue และ 0.1% xylene cyanol) และผสมให้เข้ากัน

3.5. นำผลผลิตพีซีอาร์ที่เติม loading dye แล้วไปอุ่นที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำลงน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว

3.6. ถ่ายผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ลงในช่องว่างที่เกิดจากหัวระหว่างกระบอกที่เตรียมไว้ โดยใส่ผลผลิตพีซีอาร์ที่ต้องการลงไปช่องละ 10 ไมโครลิตร

3.7. ทำอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยต่อเข้ากับกระแสไฟฟ้าขนาด 300 โวลต์ เป็นเวลา 3–5 ชั่วโมง

3.8. นำกระบอกออกจากเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส และแยกกระบอกทั้ง 2 แผ่นออกจากกัน เจลจะติดอยู่ที่กระบอกแผ่นหลัง นำกระบอกแผ่นหลังไปย้อมสีเจลต่อไป

4. การย้อมสีเจลด้วยวิธี silver staining (Benbouza *et al.*, 2006)

4.1. นำกระจกแผ่นหลังที่มีเจลติดอยู่ไปแช่ใน Fixer (95% แอลกอฮอล์ ปริมาตร 32 มิลลิลิตร, glacial acetic acid ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 265 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 5 นาที

4.2. ย้ายกระจกมาแช่ใน silver nitrate (silver nitrate 0.38 กรัม, น้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร และ formaldehyde ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 นาที

4.3. ย้ายกระจกมาแช่ในน้ำกลั่นเพื่อล้าง silver nitrate ส่วนเกินออก และย้ายลงไปแช่ใน developer (NaOH 3.75 กรัม, น้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร และ formaldehyde ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) จนกว่าจะเห็นแถบสีขึ้นมาชัดเจน

4.4. ย้ายกระจกมาแช่ใน Fixer (95% แอลกอฮอล์ ปริมาตร 32 มิลลิลิตร, glacial acetic acid ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 265 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 5 นาที

4.5. นำกระจกจากข้อ 4.4 มาล้างน้ำเปล่า โดยปล่อยให้ น้ำไหลผ่าน แล้วนำไปผึ่งให้แห้ง



ภาคผนวก ง

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอจากเจลเพื่อหาดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอจากเจลเพื่อหาดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์

1. การตัดแถบดีเอ็นเอจากโพลีอะครีลาไมด์เจล

1.1. ตัดแถบดีเอ็นเอจากโพลีอะครีลาไมด์เจล โดยใช้ปลายมีดกรีดตัดเอาเจลบริเวณที่มีแถบ ไปใส่น้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

1.2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3. เพิ่มประมาณดีเอ็นเอที่ตัดออกมาได้โดยวิธีพีซีอาร์โดยเติมสารต่างๆดังนี้

สารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดแถบ	2 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่งที่ตัด	2 ไมโครลิตร
dNTP (2 mM)	2 ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2 ไมโครลิตร
MgCl ₂ (50mM)	0.8 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.5 ไมโครลิตร
(Invitrogen, California, USA)	
เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 20 ไมโครลิตร	

1.4. ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำพีซีอาร์ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1	denaturation	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นตอนที่ 2	detaturation	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
	annealing	50–60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
	extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
	ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 30 รอบ	
ขั้นตอนที่ 3	extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

2.1. การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด

2.1.1. เชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดแถบดีเอ็นเอจากเจล เข้ากับพลาสมิด (PGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA)) โดยเติมสารต่างๆดังนี้

ผลผลิตพีซีอาร์ที่เป็นดีเอ็นเอสายคู่	3 ไมโครลิตร
2X Ligation buffer	5 ไมโครลิตร
Plasmid pGEM [®] – T Vector	1 ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (400,000 U/μl)	1 ไมโครลิตร

2.1.2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12–18 ชั่วโมง

2.2. การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

2.2.1. นำเอาพลาสมิดที่เชื่อมต่อกับดีเอ็นเอเป้าหมายแล้วไปถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดยนำเอาพลาสมิดที่เชื่อมต่อได้มาใส่ลงในคอมพิเทนต์เซลล์ (competent cell) สายพันธุ์ DH-500 และนำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที

2.2.2. นำคอมพิเทนต์เซลล์ไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสอย่างรวดเร็ว (heat shock) เป็นเวลา 45 วินาที แล้วย้ายหลอดลงน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว แช่ไว้เป็นเวลา 2 นาที

2.2.3. เติม SOC (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20 mM glucose pH 6.8–7) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

2.2.4. คูดเซลล์แบคทีเรียที่ได้ มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 μg/ml, X-gal 40 μg/ml และ IPTG 40 μg/ml

2.2.5. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลงเชื้อไปแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาทำการทดลองต่อไป

2.3. การตรวจสอบคุณภาพของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกสอดในพลาสมิด โดยวิธีพีซีอาร์

2.3.1. เก็บโคโลนีสีขาว โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อจิ้มโคโลนีสีขาว นำเชื้อลงไปละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร ที่อยู่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์

2.3.2. ตรวจหาขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกสอดอยู่ในพลาสมิดด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเติมสารต่างๆดังนี้

ตัวอย่างเชื้อจากโคโลนีที่แยกมาได้จากข้อ 1.1	2 ไมโครลิตร
M13 forward primer (5 pmol/μl) (5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3')	0.5 ไมโครลิตร
M13 reverse primer (5 pmol/μl) (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3')	0.5 ไมโครลิตร
dNTP (2 mM)	2 ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2 ไมโครลิตร
MgCl ₂ (50mM)	0.8 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 U/μl) (Invitrogen, California, USA)	0.1 ไมโครลิตร
เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 20 ไมโครลิตร	

2.3.3. ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำพีซีอาร์ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1	denaturation	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นตอนที่ 2	detaturation	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
	annealing	50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
	extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
	ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 30 รอบ	
ขั้นตอนที่ 3	extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.3.4. ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล เข้มข้น 1 % ใน TAE buffer และย้อมเจลด้วย etidium bromide นำไปส่องดูภายใต้แสง ultra violet

3. นำโคลนที่ได้มาสกัดพลาสมิด โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Spin Plasmid Mini Two (Invitex, Berlin, Germany) และนำพลาสมิดที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1st Base DNA sequencing service (Seri Kembangan, Malaysia)





ภาคผนวก จ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในทุกระยะของเครื่องหมายไมโครเซทเทลไลท์ ที่ได้ฝากข้อมูลไว้ใน
ฐานข้อมูล DDBJ (DNA Data Bank of Japan, www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในทุกตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่ได้ฝากข้อมูลไว้ใน
ฐานข้อมูล DDBJ (DNA Data Bank of Japan, www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html)

Accession number: AB777403

> 50f6661bb6e6bc3240000001.BettaMS4_BSP
CTGTTTGATGGCCGACTTTTCTTATCTTTACAACTATCTTTACTGGTCTGTCTCTGCT
GTGTCACTGCCATCATCCCCTCTCTCTCTCTCCCTCGCTCGCTCTCTCTCTCTCTT
TCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTCGCACTCTCTCTCACATGCTCACTT
GGTTGTTTTATGCTGCTGCTCCTGATGAAAC

Accession number: AB777404

> 50f6661bb6e6bc3240000001.BettaMS4_BSM
GTTTCATCAGGAGCAGCAGCATAAAAACAACCAAGTGAGCATGTGAGAGAGAGGGA
GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
GAGGGGGTGATCGCAGTGACACAGCAGAGACAGACCAGTAAAGATAGTGTGTAAAG
ATAAGAAAAGTCGGCCATCAAACAG

Accession number: AB777405

> 50f6661bb6e6bc3240000001.BettaMS4_BIM
GTTTCATCAGGAGCAGCAGCATAAAAACAACCAAGTGAGCATGTGAGAGAGAGAGG
GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGGGATGATGGCAGTGACACAGCAGAGACAG
ACCAGTAAAGATAGTGTGTAAAGATAAGAAAAGTCGGCCATCAAACAG

Accession number: AB777406

> 50f6661bb6e6bc3240000001.BettaMS5_BSP

Accession number: AB777410

> 50f6661bb6e6bc3240000001.BettaMS14_BSM

CAAGGTGTTGAGCGTTTCAGCGGCGGCAGCTAAAGTCGCGCTTTCATCGCCTGCGCG
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGACGGCTGGCGGCGCCGCC
GCCTGTTAGATGAAGTGATAAAAACCAACATGATTGACTGAAGCATTTTTGCTTTTCT
TTGTATTGTCCTTTTACCCTCTTATTCTCTTGTCTGATGAAAACTGCACCCGGTGTTC
CTCAGAGCTCAGC

Accession number: AB777411

> 50f6661bb6e6bc3240000001.BettaMS15_BSP

AACGCACCCAGAAACAAATCACGTTAGACTGAGAGCAGGCTGTCAGGTTGGTGCCA
CCTCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTTCTCT
CTCTCTCTCTCAGCCTCTGCAGTCGGTGACCGTCTATGTTTCATCTCACCAATGAAGGA
ATCCGTCACACGCGCTGTGCATCATTTGGCCAGAACAGCCCGGTTACAGT

Accession number: AB777412

> 50f6661bb6e6bc3240000001.BettaMS15_BIM

ACTGTAACCGGGCTGTTCTGGCCCAGTGATGCTCAGCGCGTGTGACGGATTCCTTTAT
TGGTGAGATGAGAGAGAGAGAGAGAGACAGAGAGAGAGAGAGACAGAGAGACAGA
GAGAGAGAGACAGAGAGACAGAGAGAGAGAGAGAGACAGAGAGAGACAGAGAGA
GAGAGAGAGAGTGAGAGGTGGCACCAACCTGACGGCCTGCTCTCAGTCTAATGTGAT
TTGTTTCTGGGTGCGTT

Accession number: AB777413

> 50f6661bb6e6bc3240000001.BettaMS17_BSP

Accession number: AB777417

> 50f6661bb6e6bc3240000001.BettaMS25_BIM

TTCGTCACGTGGAACAGATGGTTGTAGTAGAACACCTCTTTAGCCGAGTGGTCCCTCA
TGGGCCTCACCGATATTATGTCCCCATACCTGGAGTCTGAGAAACCCTGGTCTCACAC
ACACACACACACACATACGTAATGTCATTTGTCACACAGAAAGACTCTCCTGCAT
TAGAACCCAGAGTTGGGTTTTACCCAAAC

Accession number: AB777418

> 50f6661bb6e6bc3240000001.BettaMS28_BSP

TGCTCCTGAGAGGACTATTGGGTTTTCTTCCCTATTTTCTTATTTAGTTTACATTGTT
TGTGTTTTCTCCAACATACGTGTGTCGTCTCCCCATCTCTCTCTCTCTCTCGCTCT
CGCTCGCTCGTTGTTTGTGTTTGTGTTTCCCTGACAATGTCTGAATCTGCTCTCCTTCTT
TACGGCCTGATTTCGATGAGCAGAGTATGACTGGAGCCCTAAGGCAATAGAAAC

Accession number: AB777419

> 50f6661bb6e6bc3240000001.BettaMS28_BSM

TGCTCCTGAGAGGACTATTGGGTTTTCTTCCCTATTTTCTTATTTAGTTTACATTGT
TTGTGTTTTCTCCAACATACGTGTGTCGTCTCTCCATCTCTCTCGCTCTCGCTCGCTC
GTTGTTTGTGTTTGTGTTTCCCTGACAATGTCTGAATCTGCTCTCCTTCTTTACAGCCT
GATTTCGATGAGCAGAGTATGACTGGAGCCCTAAGGCAATAGAAAC

Accession number: AB777420

> 50f6661bb6e6bc3240000001.BettaMS28_BIM

GTTTCTATTGCCTTAGGGCGCCGGTCATACTCTGCTCATCGAATCAGGCTGTAAAGAA
GGAGAGCAGATTCAGACATTGTCAGGGAAACAAACAACAAACGAGCGAGCGA
GAGCGAGAGAGAGAGAGATGGGGAGACAACACACGTATGTTGGAGGAAAACGC

AAACAATGTAAACTAAATAAGAAAAATAGGGAAAGAAAACCCAATAGTCCTCTCAG
GAGCA

Accession number: AB777421

> 50f6661bb6e6bc3240000001.BettaMS40_BSP

CAGGATGCTTCCTTGGGTAAGCAGAGCCAAAGCCACTTCTCCTGCTCTCTCTCTCT
CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCCCTCTCTCTCCTGAGGACTCACCTCCATCTGAGCCT
GTTCAATACCAGACTGCGTTTGATCTGCGATCAGTCAATGTACTA



ตารางผนวกที่ 1 ค่าการทดสอบ linkage disequilibrium ของเครื่องหมายดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง
ในปลากัดป่าภาคกลาง (*Betta splendens*)

Locus pair	P-Value	Locus pair	P-Value
BettaMS4 & BettaMS5	0.9158	BettaMS8 & BettaMS25	No contingency table
BettaMS4 & BettaMS8	No contingency table	BettaMS14 & BettaMS25	0.2469
BettaMS5 & BettaMS8	No contingency table	BettaMS15 & BettaMS25	0.4897
BettaMS4 & BettaMS14	1.0000	BettaMS17 & BettaMS25	0.7901
BettaMS5 & BettaMS14	0.2348	BettaMS23 & BettaMS25	0.5933
BettaMS8 & BettaMS14	No contingency table	BettaMS4 & BettaMS28	0.4401
BettaMS4 & BettaMS15	0.5909	BettaMS5 & BettaMS28	0.8772
BettaMS5 & BettaMS15	0.1011	BettaMS8 & BettaMS28	No contingency table
BettaMS8 & BettaMS15	No contingency table	BettaMS14 & BettaMS28	0.6449
BettaMS14 & BettaMS15	0.3962	BettaMS15 & BettaMS28	0.6484
BettaMS4 & BettaMS17	0.8023	BettaMS17 & BettaMS28	0.8778
BettaMS5 & BettaMS17	0.3534	BettaMS23 & BettaMS28	0.5495
BettaMS8 & BettaMS17	No contingency table	BettaMS25 & BettaMS28	0.1749
BettaMS14 & BettaMS17	0.5671	BettaMS4 & BettaMS40	0.5699
BettaMS15 & BettaMS17	0.2520	BettaMS5 & BettaMS40	0.7031
BettaMS4 & BettaMS23	0.1576	BettaMS8 & BettaMS40	No contingency table
BettaMS5 & BettaMS23	0.4570	BettaMS14 & BettaMS40	0.0762
BettaMS8 & BettaMS23	No contingency table	BettaMS15 & BettaMS40	0.9310
BettaMS14 & BettaMS23	0.7802	BettaMS17 & BettaMS40	0.3074
BettaMS15 & BettaMS23	0.9233	BettaMS23 & BettaMS40	0.1492
BettaMS17 & BettaMS23	0.8411	BettaMS25 & BettaMS40	0.5226
BettaMS4 & BettaMS25	0.2374	BettaMS28 & BettaMS40	0.2415
BettaMS5 & BettaMS25	0.9854		

ตารางผนวกที่ 2 ค่าการทดสอบ linkage disequilibrium ของเครื่องหมายดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง
ในปลากัดป่าภาคอีสาน (*Betta smaragdina*)

Locus pair	P-Value
BettaMS4 & BettaMS14	0.9214
BettaMS4 & BettaMS28	No contingency table
BettaMS14 & BettaMS28	No contingency table

ตารางผนวกที่ 3 ค่าการทดสอบ linkage disequilibrium ของเครื่องหมายดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง
ในปลากัดป่าภาคใต้ (*Betta imbellis*)

Locus pair	P-Value	Locus pair	P-Value
BettaMS4 & BettaMS8	No contingency table	BettaMS15 & BettaMS25	0.8436
BettaMS4 & BettaMS15	0.5039	BettaMS17 & BettaMS25	0.4050
BettaMS8 & BettaMS15	No contingency table	BettaMS4 & BettaMS28	0.2681
BettaMS4 & BettaMS17	0.9642	BettaMS8 & BettaMS28	No contingency table
BettaMS8 & BettaMS17	No contingency table	BettaMS15 & BettaMS28	0.3762
BettaMS15 & BettaMS17	0.6062	BettaMS17 & BettaMS28	0.6563
BettaMS4 & BettaMS25	0.8543	BettaMS25 & BettaMS28	0.5261
BettaMS8 & BettaMS25	No contingency table		

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายวิศรุต ชัยเลิศฤทธิ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	12 สิงหาคม 2530
สถานที่เกิด	อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ร.บ. มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิชาการประมง ระดับปฏิบัติการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำปทุมธานี สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ
ผลงานทางวิชาการ	Charoenta, T., A. Swatdipong, V. Chalertrit , C. Indananda, P. Wonnapijit, K. Srikulnath and S. Peyachoknagul. 2011. Distinguish of three bubble nesting brooder fighting fishes by multiplex PCR, pp. 231–234. In Proceedings of the 17th National Genetic Conference , Thailand. Chalertrit, V. , A. Swatdipong, S. Peyachoknagul, J. Salaenoi and K. Srikulnath. Isolation and characterization of ten novel microsatellite markers from Siamese fighting fish (<i>Betta splendens</i> , Osphronemidae, Anabantoidae) and their transferability to related species, <i>B. smaragdina</i> and <i>B. imbellis</i> . Gen. Mol. Res. (In press)