สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำในประเทศไทย โดยใช้ RFLP

RFLP analysis of genetic diversity of seahorse (*Hippocampus spp.*) in Thailand

สำนักหอสมุดกลาง
มหาวิทยาลัยบูรพา

นางชูตา บุญภักดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้
งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2540 และ 2541

ประกาศคุณูปการ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยการได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลและหน่วยงานต่างๆ หลายหน่วยงาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยบูรพา และได้รับการสนับสนุนและช่วยเหลือด้านสถานที่และอุปกรณ์เป็นอย่างดีจากภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาวาริชศาสตร์ และโครงการจัดตั้งบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ประกอบการวิจัยครั้งนี้ และงานวิจัยนี้สมบูรณ์ได้ด้วยคุณ Marie-Annick Moreau แห่งมหาวิทยาลัย McGill ที่ยืนยันการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำ ข้าพเจ้าขอขอบคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

ชูตา บุญภักดี

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำที่พบในประเทศไทย ทำการศึกษาในม้าน้ำ 3 ชนิดคือ *Hippocampus spinosissimus*, *H. kuda* และ *H. trimaculatus* โดยเตรียมดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์จากเลือดของม้าน้ำด้วยวิธีการเก็บตัวอย่างเลือดไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea (10 mM Tris-HCl, pH7.5; 125 mM NaCl; 10 mM EDTA; 1% SDS; Urea 4 M) สามารถเตรียมดีเอ็นเอได้ประมาณ 2-5 ไมโครกรัมต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ลักษณะของดีเอ็นเอมีความเป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างสมบูรณ์ มีขนาดมากกว่า 23.1 กิโลเบส เมื่อวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดของม้าน้ำในบริเวณยีน 18S rRNA พบว่า *H. spinosissimus* มีแถบดีเอ็นเอเข้ม 2 แถบ ขนาดประมาณ 900 และ 650 คู่เบส *H. kuda* มีแถบดีเอ็นเอเข้ม 1 แถบ ขนาดประมาณ 900 คู่เบส และ *H. trimaculatus* มีแถบดีเอ็นเอเข้ม 1 แถบ และจาง 3 แถบ ขนาดประมาณ 900 คู่เบส และต่ำกว่า 500 คู่เบส ตามลำดับ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ทำโดยวิเคราะห์ชิ้นส่วนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ตั้งแต่บริเวณยีน cytochrome b จนถึง 12S rRNA ของม้าน้ำจาก จ. ชลบุรี, จ. ระยอง และ จ. ตราด โดยย่อยชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Taq*I เมื่อใช้ *Taq*I พบความแตกต่างทางพันธุกรรมในม้าน้ำจาก จ. ระยอง ซึ่งเกิดขึ้นภายในแหล่งเดียวกันและต่างจากแหล่งอื่นด้วย ส่วนการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ *H. kuda* ทำการศึกษาม้าน้ำจาก จ.ชลบุรี และ จ. ตราด โดยวิเคราะห์ในบริเวณยีน ATPase ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอและทดสอบเช่นเดียวกับม้าน้ำ *H. spinosissimus* แต่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. kuda*

ABSTRACT

Three species of seahorse, *Hippocampus spinosissimus, H. kuda* and *H. trimaculatus* were studied on their genetic diversity. Total DNA was prepared from whole blood preserved in TNES-Urea buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.5; 125 mM NaCl; 10 mM EDTA; 1% SDS; Urea 4 M). DNA yield was about 2-5 μg DNA/μl blood with high molecular weight and more than 23.1 kb. in length. The specific DNA pattern of each species was performed on PCR amplified DNA fragment of 18S rRNA gene. The results showed that *H. spinosissimus* has two intent bands approximately 900 and 650 bp. *H. kuda* has only one intent band approximately 900 bp. and *H. trimaculatus* has one intent band and three light bands approximately 900 and less than 500 bp., respectively. Genetic diversity within species of *H. spinosissimus* from Chonburi, Rayong, and Trad was investigated in PCR amplified mtDNA fragment from cytochrome b gene to 12S rRNA. After digestion those DNA fragments with *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I and *Taq*I, DNA pattern of Rayong samples digested with *Taq*I was not only distinct from other samples but also differed from those in the same locality. While genetic diversity within species of *H. kuda* from Chonburi and Trad investigated on ATPase gene of PCR amplified mtDNA fragment. After digestion those DNA fragments with *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I and *Taq*I, different DNA pattern of all samples was not found. This result indicated that genetic variation within species of *H. kuda* could not be detected.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ

บทคัดย่อภาษาไทย..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ง

สารบัญ..... จ

สารบัญตาราง..... ฉ

สารบัญภาพ..... ช

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา..... 3

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์..... 16

วิธีดำเนินการศึกษา..... 18

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 24

บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง..... 33

เอกสารอ้างอิง..... 39

ภาคผนวก..... 43

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ กัน..... 8
3.1 ปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR..... 21
4.1 ขนาดของผลิตผล PCR ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ..... 25

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 แผนภาพไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของหนู..... 7
3.1. ม้าน้ำตัวเต็มวัย..... 19
4.1 รูปแบบดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ของม้าน้ำ 27
4.2 รูปแบบผลิตผล PCR บริเวณยีน 18S rRNA ของม้าน้ำ..... 27
4.3 รูปแบบผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของ
ม้าน้ำ *H. spinosissimus*..... 28
4.4 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย
เรสทริกชันเอนไซม์..... 28
4.5 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *EcoR*I..... 29
4.6 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Hae*III..... 29
4.7 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Hha*I..... 30
4.8 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Msp*I..... 30
4.9 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Taq*I..... 31
4.10 ผลิตผล PCR ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณยีน ATPase
ของม้าน้ำ *H. kuda* 31
4.11 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. kuda* ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์.. 32
4.12 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. kuda* ภายหลังย่อยด้วย *Hae*III..... 32