รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรน้ำกลุ่ม Cladocerans ที่พบในกรุงเทพมหานคร

Genetic variation of water flea (*Moina macrocopa*) in Cladocerans group found in Bangkok

โดย

นางรุ่งตะวัน ยมหล้า

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สนับสนุนโดย

งบประมาณประจำปี พ.ศ. 2552 ตามมติคณะรัฐมนตรี

RC171
Q4
A44
B83
ร621ค

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 131048
วัน,เดือน,ปี 21 พค. 2557

b12596670
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรน้ำ (*Moina macrocopa*) จาก 3 แหล่ง ได้แก่ บริเวณวัดอุทัยธรรมาราม วัดสังฆราชา และวัดศรีวารีน้อย เป็นตัวแทนของไรแดงในกรุงเทพมหานครด้วยเทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 รูปแบบ OPA 03, OPA 04, OPA 05, OPA 07, OPA 08, OPA 09, OPA 10, OPA 13, OPA 17 และ OPA 19 ไรแดงที่เก็บรวบรวมจากทั้ง 3 แหล่งพักไว้ในห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 1 วันและเปลี่ยนถ่ายน้ำ 2-3 ชั่วโมง อย่างน้อย 3 ครั้ง ผลการศึกษาพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficient) ระหว่างไรแดงบริเวณวัดอุทัยธรรมารามกับไรแดงบริเวณวัดสังฆราชา และวัดศรีวารีน้อยเท่ากับ 0.688 และ 0.625 ตามลำดับ ส่วนระหว่างไรแดงที่สุ่มรวบรวมจากวัดสังฆราชากับวัดศรีวารีน้อยเท่ากับ 0.938 ดังนั้นแนวโน้มของไรแดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรน้ำจากทั้ง 3 แหล่ง อาจแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ไรน้ำจากบริเวณวัดสังฆราชากับวัดศรีวารีน้อย และไรน้ำจากบริเวณวัดอุทัยธรรมาราม

คำสำคัญ (Keywords) ของโครงการวิจัย
ไรน้ำ (*Moina macrocopa*) ความหลากหลายทางพันธุกรรม เทคนิคRAPD และกรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Study on genetic variation of water flea (*Moina macrocopa*) were ramdomised collection near by 3 areas which were Wat Utai-thammaram, Wat Sangkaracha and Wat Sriwareenoi, these areas are represented of water flea found in Bangkok. The RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique was used to study by testing with 10 primers which were OPA 03, OPA 04, OPA 05, OPA 07, OPA 08, OPA 09, OPA 10, OPA 13, OPA 17 and OPA 19. Water flea were randomised and acclimated in laboratory room for 1 day, these were cleaned 2-3 hours per time before DNA extraction. Resultes found the similarity coefficient between Wat Utai-hammaram and Wat Sangkaracha, Wat Sriwareenoi were 0.688 and 0.625, respectively. In addition, 0.938 was the similarity coefficient between Wat Sangkaracha and Wat Sriwareenoi. Genetic variation of water flea could be separate 2 stocks which were Wat Sangkaracha, Wat Sriwareenoi and Wat Utai-thammaram.

Keywords

Water flea (*Moina macrocopa*), genetic variation, RAPD and Bangkok

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 สำรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	11
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	17
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	26
เอกสารอ้างอิง	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ต้นทุนอาหารแต่ละชนิดในการเลี้ยงปลากัดต่อรุ่น	5
3.1	ส่วนประกอบชุดสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (Wizard®SV Genomic DNA Purification System)	14
3.2	ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA	15
3.3	ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณจีโนมมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยา PCR	15
3.4	รหัสและลำดับเบสของ RAPD ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	16
4.1	ผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกัน (similarity coefficients) ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากผลผลิต RAPD-PCR ของไพรเมอร์ทั้ง 8 ชนิด ของไรแดงทั้ง 3 แหล่ง	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะของไรแดงที่ตักจากแหล่งน้ำ (A) และภาพไรแดงที่ส่องผ่านใต้กล้องสเตอริโอ (B)	4
2.2	ภาพโดยรวมการผลิตไรแดงด้วยนมผงและนมหมักกรด หรือ นมวัววัยอ่อน	6
3.1	ตำแหน่งแรกเก็บที่บ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณที่วัดอุทัยธรรมาราม (ลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร) ตำแหน่ง A วัดอุทัยธรรมาราม ตำแหน่งเก็บไรแดง B	11
3.2	ตำแหน่งที่ 2 ทำการเก็บที่บ่อเลี้ยงปลาชะโดใกล้กับวัดสังฆราชา (ลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร) A บ่อที่ทำการเก็บไรแดง B	12
3.3	ตำแหน่งที่ 3 ทำการเก็บในเขตอำเภอบางเสาธง เข้าทางวัดศรีวารีน้อย	12
4.1	แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (A) และแถบจีโนมมิคดีเอ็นเอของไรแดงที่สกัดได้ (B)	17
4.2	บ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณวัดอุทัยธรรมาราม	18
4.3	ผลจากการทำ PCR (16s) พบการปนเปื้อนของจีโนมิคแบคทีเรียในตัวอย่างดเอ็นเอไรแดงวัดอุทัยธรรมาราม	18
4.4	บ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณวัดสังฆราชา	19
4.5	ผล PCR (16s) พบการปนเปื้อนของจีโนมิคแบคทีเรียในตัวอย่างดีเอ็นเอไรแดงวัดสังฆราชา (M: Marker , 1 คือ band ของแบคทีเรียที่เกิดจากการทำ PCR (16S), 2 คือ negative)	19
4.6	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA03 OPA04 OPA05 OPA07 ของบ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณวัดอุทัยธรรมาราม บ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณวัดสังฆราชา และบ่อเลี้ยงปลาบริเวณวัดศรีวารีน้อย	21
4.7	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA08 OPA09 OPA10 OPA13 ของบ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณวัดอุทัยธรรมาราม บ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณวัดสังฆราชา และบ่อเลี้ยงปลาบริเวณวัดศรีวารีน้อย	22
4.8	Phylogenetic tree ของไรแดงทั้ง 3 แหล่ง ไรแดงวัดอุทัยธรรมาราม (M1), ไรแดงวัดสังฆราชา (M2) และไรแดงวัดศรีวารีน้อย (M3)	24
4.9	ระบบการสืบพันธุ์ของไรแดง	24
4.10	แผนที่แสดงการเชื่อมกันของคลองบริเวณที่ทำการเก็บไรแดงในตำแหน่งต่างๆ ได้แก่ วัดอุทัย (M1) วัดสังฆราชา (M2) และวัดศรีวารีน้อย (M3)	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ไรแดง หรือไรน้ำจืด เป็นสัตว์น้ำไม่มีกระดูกสันหลังที่มีขนาดเล็กและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เกษตรกรนิยมเก็บรวบรวมไรแดงจากธรรมชาติเพื่อใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน ซึ่งการเก็บรวบรวมไรแดงจากธรรมชาตินั้นไม่สามารถประเมินผลผลิตที่เก็บรวบรวมได้ในแต่ละครั้ง จึงอาจส่งผลกระทบโดยตรงต่ออนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน ดังนั้นการเพาะเลี้ยงไรแดงจึงเกิดการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ได้ผลิตไรแดงที่แน่นอนและสามารถตอบสนองความต้องการของตลาดทั้งในกลุ่มผู้เลี้ยงปลาสวยงาม และผู้เพาะเลี้ยงลูกปลาเศรษฐกิจ ไรแดงที่พบในแหล่งน้ำทั่วไปส่วนใหญ่เป็นชนิด *Moina macrocopa* อย่างไรก็ตาม สุนันท์ ทวยเจริญ (2520) ได้รายงานพบไรน้ำจืดอีกประมาณ 12 ชนิด ได้แก่ *Diaphanosoma brachyurum*, *Pseudosida bidentata*, *Alona costata*, *Kurzia latissima*, *Ceriodaphnia rigaudi*, *Moinodaphnia macleayii*, *Simocephalus exspinosus*, *S. vetulus*, *Macrothrix rosea*, *Macrothrix hirsuticornis* และ *Grimaldina brazzai* ที่พบได้ทั่วไปทั้งตามแหล่งน้ำใส แหล่งน้ำเน่า รวมทั้งแหล่งน้ำที่มีวัชพืชและพรรณไม้น้ำ

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันพบว่าปัญหาหลักไรแดง คือ ไรแดงที่เก็บรวบรวมและผลผลิตจากการเลี้ยงที่มีปริมาณไม่แน่นอน โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนที่ฟ้าครึ้มและไม่มีแสงแดดทำให้คลอเรลล่าซึ่งเป็นแพลงก์ตอนพืชและเป็นอาหารที่สำคัญของไรแดงไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ จึงส่งผลกระทบต่อผลผลิตไรแดงและส่งผลกระทบต่อเนื่องในการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนทั้งปลาเศรษฐกิจหรือปลาสวยงาม รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ (2548 และ 2549) ได้รายงานเทคนิคการเพาะเลี้ยงไรแดงโดยไม่ต้องใช้คลอเรลล่าเป็นแหล่งอาหารของไรแดง ด้วยเทคนิคดังกล่าวทำให้สามารถผลิตไรแดงได้ตลอดช่วงฤดูฝนที่ไม่มีแสงแดด เทคนิคดังกล่าวเป็นการเลี้ยงไรแดงด้วยการใช้นมผงที่ระดับความเข้มข้น 400-500 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำนมดิบที่ระดับความเข้มข้น 5-10 มิลลิลิตรต่อลิตร หลังจากนั้นหมักไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 4-6 วัน แล้วปล่อยไรแดงประมาณ 0.1-0.15 มิลลิกรัมหรือ 10-20 ตัวต่อลิตร วิธีการเลี้ยงดังกล่าวทำให้ผลิตไรแดงได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่จำเป็นต้องใช้แพลงก์ตอนพืช

เนื่องจากการเพาะขยายพันธุ์ไรแดงนั้นสามารถใช้อาหารต่างชนิดกัน ได้แก่ น้ำเขียว น้ำนมดิบ และแบคทีเรีย ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณค่าทางโภชนาการในไรแดงแตกต่างกันด้วย โดยระดับของโปรตีนมีค่าตั้งแต่ 53.3-78.7 ระดับไขมัน 9.5-11.4 คาร์โบไฮเดรต 11.6-12.1 และเถ้า 3.2-3.6 เปอร์เซนต์ต์น้ำหนักแห้ง (ปรัชญานี ตรียวง, 2549 ; กวิน หาญบูรณะพงศ์, 2548 และ เนติมา คูเจริญ, 2548) ปริมาณไขมันในไรแดงนับว่ามีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องไขมันเป็นแหล่งพลังงาน เป็นสื่อของวิตามินบางตัวที่ละลายในไขมัน เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ และยังเป็นแหล่งของกรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acid : EPA) เพื่อสนับสนุนกิจกรรมและหน้าที่ต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ และการควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อ (สุพิศ ทองรอด, 2535) โดย Hanaee *et al.* (2005) รายงานว่ากรด PUFA เป็นต้นกำเนิดในการสังเคราะห์กรดไขมัน เช่น กรดอะราคิโดนิค (arachiodionic acid : 20:4n-6) โดยกรดไขมันชนิดนี้มีผลทำให้การเจริญเติบโตและการพัฒนาของตัวอ่อน รวมทั้งจุดสีในร่างกายปลาทะเลเพิ่มขึ้น ซึ่ง ณิชนันทน์ ทินปราณี (2549) พบว่าไรแดงที่เลี้ยงด้วยน้ำนมดิบมีปริมาณของไขมันสูงสุด โดยกรดไขมันที่พบในไรแดง เช่น กรดปาลมิติก (C16: 0) กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดลิโนเลอิก (C18:2) สิ่งต่างๆ เหล่านี้ล้วนเป็นเหตุผลที่สำคัญในการการสนับสนุนกิจกรรมการเพาะเลี้ยงไรแดงเพื่อการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน

การศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพพื้นฐานทางชีวภาพของไรแดงซึ่งเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรแดง นับได้ว่าเป็นความรู้พื้นฐานเพื่อก่อให้เกิดกระทบทางด้านบวกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไปในอนาคต โครงการวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรน้ำในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ด้วยเทคนิค PCR-RAPD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

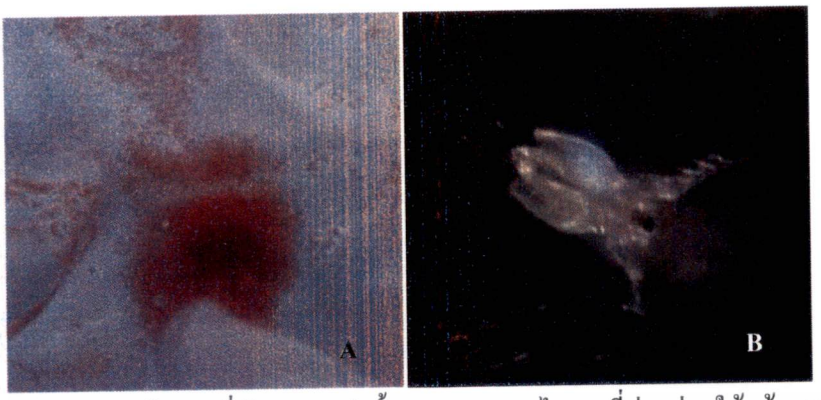
บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1 ชีววิทยาของไรแดง

ไรแดง (ภาพที่ 2.1) เป็นสัตว์น้ำขนาดเล็กที่พบได้ตามแหล่งน้ำที่มีสารอินทรีย์สูง โดยทั่วไปไรแดงมีพฤติกรรมอาศัยร่วมกันเป็นฝูงและเป็นกลุ่มใหญ่ทำไปบริเวณผิวน้ำที่มีไรแดงอาศัยปรากฏลักษณะสีแดงเรื่อๆ หรือถ้าอยู่รวมกันเป็นจำนวนมากยิ่งปรากฏเป็นสีแดงอย่างชัดเจน จึงนิยมเรียกว่า ไรแดง ไรแดงมีขนาด 0.4-1.8 มิลลิเมตร ลำตัวมีเปลือกหรือฝาคลุมแบบ 2 ฝาประกบกัน ส่วนหัวกว้างมีตารวมขนาดใหญ่ มีแอ่งที่ซอกคอ (cervical sinus) หนวดคู่แรกมีขนาดใหญ่สั้นไม่แบ่งเป็นปล้อง ปลายหนวดมีขนเล็กๆ 5-6 เส้น ตรงเกือบกึ่งกลางมีขนรับความรู้สึก (sense hair) 1 เส้น หนวดคู่ที่ 2 มีขนาดใหญ่ตรงปลายแบ่งเป็น 2 แขนง แต่ละแขนงมี 3 ปล้องเท่าๆ กัน ไรแดงเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าไรแดงเพศผู้ และมีตัวอ่อนที่เจริญอยู่ภายใน broodchamber ส่วนไรแดงเพศผู้จะมีขาคู่แรกเป็นลักษณะของตะขอเกี่ยว (hook) ไรแดงจัดอยู่ในกลุ่ม Crustacean จัดอยู่ใน

Phylum Arthropoda
Class Crustacacea
Subclass Branchiopoda
Order Cladocera
Suborder Calyptomera
Family Daphnidae
Genus Moina (กมลศิริ พันธนียะ, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของไรแดงที่ตักจากแหล่งน้ำ (A) และภาพไรแดงที่ส่องผ่านใต้กล้องสเตอริโอ (B)

สุนันท์ ทวยเจริญ (2520) รายงานการพบไรน้ำทั้งในแหล่งน้ำใส แหล่งน้ำเน่า รวมถึงแหล่งน้ำที่มีวัชพืชและพรรณไม้น้ำในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 10 สกุล และ 12 ชนิด ได้แก่ *Diaphanosoma brachyurum*, *Pseudosida bidentata*, *Alona costata*, *Kurzia latissima*, *Ceriodaphnia rigaudi*, *Moinodaphnia macleayii*, *Moina macrocopa*, *Simocephalus exspinosus*, *S. vetulus*, *Macrothrix rosea*, *Macrothrix hirsuticornis* และ *Grimaldina brazzai* โดยชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ด้วยอาหารผสม คือ *Moina macrocopa* เนื่องจากตัวอ่อนไรแดงจะมีขนาดกว้างประมาณ 0.27 มิลลิเมตร และยาวประมาณ 0.53 มิลลิเมตร เมื่อโตเต็มวัยจะมีขนาดกว้างประมาณ 0.6 มิลลิเมตร และยาว 1.04 มิลลิเมตร และไรแดงสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย รวมทั้งมีคุณค่าทางโภชนการสูงจึงนิยมใช้อนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน (สันทนา ดวงสวัสดิ์ และคณะ, 2524) มีรายงานการวิจัยที่ใช้ไรแดงในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน ได้แก่ ลูกปลาไน ลูกปลาสลิด ลูกปลาดุกอุย ลูกปลาบู่ ลูกปลาบึก ลูกปลาตะเพียนขาว ลูกปลาหมอช้างเหยียบ ปลากะพงขาว ปลาแรดวัยอ่อน กุ้งกุลาดำ ปลาหางนกยูง และปลากัด เป็นต้น (สุปราณี บำรุงสุข, 2513 ; ศราวุธ เจะโส๊ะ และอนุศักดิ์ อังศุภานิช, 2531 ; วิรัตดา สีตะสิทธิ์ และวิมล จันทรโรทัย, 2526 ; วีระ วัชรกรโยธิน และคณะ, 2531 ; ทวี วิพุทธานุมาศ และคณะ, 2529. ; สำรวจ เสร็จกิจ และประเสริฐ สีตะสิทธิ์, 2533 ; ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล และคณะ, 2531 ; ธนวัฒน์ ชัชวาลธาตรี และคณะ, 2535 ; บรรจง จำนงศิตธรรม และคณะ, 2535 ; พูนสิน พานิชสุข. 2539 ; สุทัศน์ เผือกจีน, 2540 ; ประจวบ ดลสุจิต, 2541 ; วันเพ็ญ มีนกาญจน์ และศุภรัตน์ ฉัตรจริยเวศน์, 2542 ; อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล และสุดารัตน์ บวรศุภกิจกุล, 2544)

2.2 ประเมินมูลค่าทางเศรษฐกิจของไรแดงต่ออุตสาหกรรมการเพาะและอนุบาลสัตว์น้ำ

เมื่อพิจารณาจากมูลค่าการซื้อขายไรแดง กรณีเพื่อใช้ในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลากัดในจังหวัดนครปฐมโดย อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล และสุดารัตน์ บวรศุภกิจกุล (2544) จากเพาะเลี้ยงปลากัดแต่ละรุ่นใช้เวลาประมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

126.69 วัน มีประมาณ 50 ราย เกษตรกรมีค่าใช้จ่ายส่วนของอาหาร ได้แก่ ไข่แดง ไข่ตุ๋น ไรแดง และลูกน้ำ ประเมินแล้วประมาณ 63.55 เปอร์เซนต์ต์ของค่าใช้จ่ายทั้งหมด (ตามตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ต้นทุนอาหารแต่ละชนิดในการเลี้ยงปลากัดต่อรุ่น

รายการอาหารที่ใช้เลี้ยงทั้งหมด	หน่วย	ราคา (บาท)	จำนวนเงิน (บาทต่อวัน)	รวมต้นทุนการเลี้ยงต่อรุ่น (บาท)
ไข่แดง (ฟอง)	0.07	1.36	0.09	12.06
ไข่ตุ๋น (ฟอง)	25.45	1.36	34.61	4,384.99
ไรแดง (กิโลกรัม)	4.33	26.33	114.01	14,443.79
ลูกน้ำ (กิโลกรัม)	0.62	60.00	37.20	4,712.87

ข้อมูลเบื้องต้นพบว่าเกษตรกรต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการซื้อไรแดง เมื่อประเมินแล้วพบว่าเฉพาะเกษตรกรในจังหวัดนครปฐมมีมูลค่าการซื้อ-ขายไรแดง แต่ละรุ่นประมาณ 722,189.38 บาท หรือประมาณ 3 ล้านบาทต่อปี นอกจากนี้ วิรัตดา สีตะวิทย์ (2544) รายงานว่าศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดและสถานีประมงน้ำจืดของกรมประมงประมาณ 41 แห่ง มีความต้องการปริมาณไรแดงปีละประมาณ 6 เดือน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ถึงเดือนตุลาคมตั้งแต่ 50 กิโลกรัม มากกว่า 200 กิโลกรัม ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าไรแดงเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก

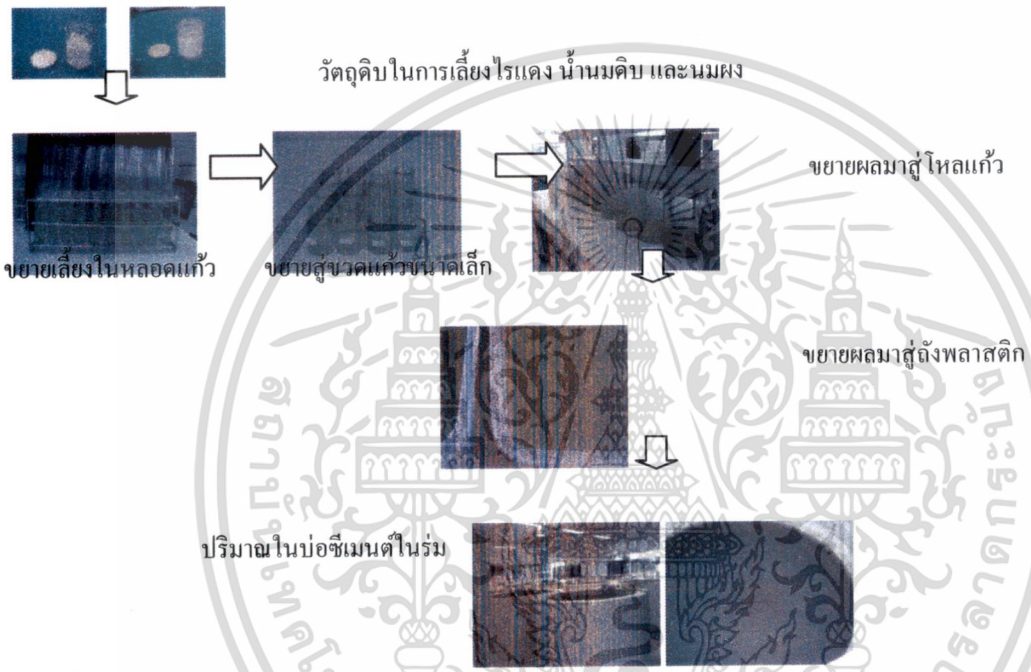
2.3 การเพาะเลี้ยงไรแดง

ส่วนใหญ่การเพาะเลี้ยงไรแดงนิยมใช้คอลเรลล่าเป็นแหล่งอาหารของไรแดง อย่างไรก็ตามชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงคลอเรลล่ายังแตกต่างกันด้วย เช่น ปุ๋ยอนินทรีย์และกากเหลือจากโรงงาน น้ำเสียจากแหล่งชุมชน ปลาป่น รำละเอียด วิตามินร่วมกับกากถั่วเหลืองและรำ การใช้รำละเอียดหมัก น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำนมถั่วเหลือง วัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดต่าง ๆ รวมถึงการใช้เลือดวัวผสมดิน หรือการใช้มูลไก่ มูลโค หรือแม้กระทั่งฟางข้าว เป็นต้น (สุนันท์ ทวยเจริญ, 2520 ; อโณทัย คมเศวต, 2521 ; ลัดดา วงรัตน์ และคณะ, 2524 ; มารศรี นวนราเศรษฐ์, 2528 ; สำรวจ เสร็จกิจ, 2531 ; ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล และคณะ, 2532 ; ทวี วิพุทธานุมาศ และเรวดี ศรีประเสริฐ, 2538)

เนื่องจากคอลเรลล่าเป็นแพลงก์ตอนพืชที่ต้องใช้แสงเดดในการเพิ่มจำนวนเซลล์ ดังนั้นถึงแม้จะมีอาหารที่ใช้เลี้ยงคลอเรลล่าที่แตกต่างกัน แต่การเพาะเลี้ยงไรแดงก็ยังคงประสบกับปัญหาหลัก คือ แสงแดดที่ขาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วงในฤดูฝน จึงส่งผลกระทบต่อปริมาณไรแดงที่ผลิตได้ไม่เพียงพอและไม่สม่ำเสมอ รวมทั้งส่งผลกระทบต่อเนื่องในการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนไม่ว่าจะเป็นปลาเศรษฐกิจหรือลูกปลาสวยงามก็ตาม ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงไรแดงโดยไม่ต้องพึ่งพาแสงแดดและใช้คลอเรลล่าในการเลี้ยงไรแดง โดย รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ (2548 และ 2549) รายงานการเลี้ยงไรแดงด้วยนมผงที่ระดับความเข้มข้น 400-500 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำนมดิบที่ระดับความเข้มข้น 5-10 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยหมักอาหารดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 4-6 วัน หลังจากนั้นปล่อยพ่อแม่พันธุ์ไรแดงประมาณ 0.1-0.15 มิลลิกรัม 10-20 ตัวต่อลิตร ตามภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 ภาพโดยรวมการผลิตไรแดงด้วยนมผงและนมหมักกรด หรือ นมวัววัยอ่อน

2.4 บทบาททางโภชนาการของไรแดงต่อสัตว์น้ำวัยอ่อน

การเลี้ยงไรแดงด้วยอาหารต่างชนิดกัน คือ น้ำเขียว น้ำนมดิบ และแบคทีเรีย ตามลำดับ พบว่าได้ส่งผลต่อคุณค่าทางโภชนาการในไรแดงแตกต่างกัน โดยมีระดับไขมันระหว่าง 53.3-78.7 ระดับไขมัน 9.5-11.4 คาร์โบไฮเดรต 11.6-12.1 และเถ้า 3.2-3.6 เปอร์เซนต์ต์น้ำหนักแห้ง (ปรัชญานี ตรียวง, 2549 ; กวิน หาญบูรณะพงค์, 2548 และ เนติมา คูเจริญ, 2548) ภานุ เทวรัตน์มณีกุล และคณะ (2541) รายงานว่าไรแดงเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีความสำคัญในการอนุบาลสัตว์น้ำและอัตรารอดชีวิตของลูกปลามีสูง เพราะไรแดงมีคุณค่าทางโภชนาการสูงมีโปรตีน 74.09% คาร์โบไฮเดรต 12.50% ไขมัน 10.19% และเถ้า 3.47% ทำให้นิยมใช้ไรแดงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างแพร่หลายทั้งธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจ การทดลองของ Pyka and Kolman (1999) อนุบาลลูกปลา Siberian sturgeon ด้วยอาหารมีชีวิตจำพวกแพลงก์ตอนสัตว์พบว่าลูกปลา Siberian sturgeon มีพฤติกรรมชอบกินแพลงก์ตอนสัตนว์กลุ่ม Cladocera มากที่สุด และพบว่าลูกปลา Siberian sturgeon มีอัตรารอดสูงสุดด้วย นอกจากนี้ไรแดงยังสามารถเป็น Biomarker ในแหล่งน้ำด้วย

เมื่อพิจารณาจากคุณค่าทางโภชนาการของไรแดง พบว่าการเลี้ยงไรแดงด้วยอาหารที่แตกต่างกันส่งผลต่อระดับของไขมันที่ต่างกัน ซึ่งไขมันนับได้ว่าเป็นแหล่งพลังงาน เป็นสื่อวิตามินที่ละลายในไขมัน เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ และยังเป็นแหล่งของกรดไขมันที่จำเป็น (Essential fatty acid : EPA) เพื่อไปทำหน้าที่ต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ และการควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อ (สุพิศ ทองรอด, 2535) โดย Hanaee *et al.* (2005) รายงานว่ากรด PUFA เป็นต้นกำเนิดในการสังเคราะห์กรดไขมัน เช่น กรดอะราคิโดนิค (Arachiodionic acid : 20:4n-6) โดยกรดไขมันชนิดนี้มีผลทำให้การเจริญเติบโตและการพัฒนาของตัวอ่อนรวมทั้งจุดสีในร่างกายปลาทะเลเพิ่มขึ้น ซึ่งณิชนันทน์ ทินปราณี (2549) พบว่าไรแดงที่เลี้ยงด้วยน้ำนมดิบมีปริมาณของไขมันสูงสุด โดยกรดไขมันที่พบในไรแดง เช่น กรดปาลมิติก (C16: 0) กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดลิโนเลอิก (C18:2) ดังนั้นไรแดงจึงมีเป็นอาหารมีชีวิตที่จำเป็นต่อการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน

2.5 เทคนิคทางชีวโมเลกุล (Molecular marker)

เทคนิคการใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล ประกอบด้วย การศึกษาในระดับโปรตีนเป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และระดับดีเอ็นเอเป็นการตรวจสอบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) เทคนิค RFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นิยมศึกษาความแตกต่างทางโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยการ ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ตัดดีเอ็นเอเป้าหมายทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่งเกิดขึ้นในตำแหน่งดีเอ็นเอ จะทำให้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกัน สำหรับ RAPD (Random amplified polymorphic DNA) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ประยุกต์ร่วมกับเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) โดยใช้หลักการของไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวสุ่มเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งพร้อมๆ กัน เนื่องจากไพรเมอร์มีขนาดสั้นทำให้สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (Template) ได้หลายตำแหน่ง และเทคนิคนี้ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลของลำดับเบสในสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา เทคนิค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AFLP (Amplified fragment length polymorphism) กับเทคนิค RFLP ต่างกันที่ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหลังจากที่ตัดได้แล้วนั้นชิ้นส่วนที่ต้องการศึกษาเพิ่มเติมสามารถเพิ่มปริมาณ แล้วนำมาศึกษาต่อ

1. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP): เทคนิค AFLP เป็นการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วเชื่อมด้วย adapter ที่เป็นดีเอ็นเอสายคู่ชิ้นเล็กๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายของโมเลกุลดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ บริเวณที่เชื่อมต่อนี้เป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์จะมีลำดับที่เป็นคู่สมกับส่วนของ Adapter รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ และมีการเพิ่มเบส 2-3 เบสที่ปลาย 3 เพื่อให้เกิดการเลือกจับได้เฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกันเท่านั้น ทำให้มีการเพิ่มของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็นบางส่วน และสามารถกำหนดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้จากจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปแล้วจึงนำมาแยกขนาดด้วยวิธีเจลอิเลคโทรโฟรีซีสโดยพอลิมอฟีซึมจะเกิดจากการเพิ่ม การลด หรือการจัดเรียงตัวใหม่ของเบสที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะทำให้ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป

2. Simple Sequence Repeat (SSR): SSR หรือ Microsatellite เป็นเทคนิคที่ใช้ประโยชน์จากการซ้ำกันของลำดับเบสในจีโนมของยูคาริโอตมีส่วนของดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำๆ ต่อเนื่องกัน SSR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (Single-locus marker) และตรวจในตำแหน่งที่เรียกว่าไมโครแซลเทลไลท์มักเป็นลำดับเบสจำเพาะที่มีเพียงชุดเดียวในจีโนม แต่ต้องทราบลำดับเบสของตำแหน่งที่อยู่ใกล้เคียงตำแหน่งไมโครแซลเทลไลท์ด้วย อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการการศึกษาสูง

3. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP): เทคนิค RFLP เป็นการหาความหลากหลายของดีเอ็นเอด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ซึ่งเอนไซม์ชนิดดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรียและจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของเบสแบบจำเพาะเรียกว่าตำแหน่งจดจำ (Recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลหนึ่ง จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากแหล่งต่างกันและมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันแล้วจะได้ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอไม่เท่าเดิม โดยตรวจสอบผลด้วยวิธีการเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสัตว์น้ำโดยใช้เทคนิค RAPD: เทคนิค RAPD ที่ประยุกต์ใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็น Type หรือ Subtype โดยอาศัยหลักการแยกในระดับดีเอ็นเอ ไพรเมอร์จะเข้าจับกับตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สม (Complementary base) บนสายดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งอาจจะกระจายอยู่ทั่วบนจีโนม เรียกไพรเมอร์ลักษณะนี้ว่า Single arbitrary primer เป็นไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นๆ นิยมใช้ 10 นิวคลีโอไทด์ และมี GC content ค่อนข้างสูงประมาณ 60-70 เปอร์เซนต์ (ต่ำสุด 50 เปอร์เซนต์) ไพรเมอร์เหล่านี้เป็นไพรเมอร์ที่มีการจับกับดีเอ็นเอแบบสุ่ม มีการสุ่มหาลำดับเบสเป้าหมาย ที่กระจายอยู่ใน Genomic DNA ที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ การจับกันระหว่างไพรเมอร์กับลำดับเบสเป้าหมายนี้มี 2 กรณีคือ จับกันได้ 100 เปอร์เซนต์ และจับกันได้บางส่วน เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นรหัสเริ่มต้นมีขนาดสั้น จึงสามารถเข้าคู่กับสารพันธุกรรมได้หลายตำแหน่งโดยการสุ่มเข้าคู่หากเกิดการเข้าคู่ในทิศทางที่เหมาะสมก็จะทำให้เกิดการจำลองตัวของชิ้นดีเอ็นเอ จำนวนและแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอได้หลายบริเวณ ซึ่งสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดก็มีรูปแบบทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันไป (สุรินทร์ ปิยโชคณากุล, 2552)

2.6 เทคนิค Protein Electrophoresis

เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ใช้แยกและวิเคราะห์โปรตีน โดยอาศัยหลักการของสนามไฟฟ้า สารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปยังขั่วที่ตรงข้ามกัน อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นกับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสาร รูปร่างและขนาดของโมเลกุลบนสารนั้น และกระแสไฟฟ้า ดังจะเห็นได้จากการศึกษาความหลากหลายของประชากร *Daphnia* ในบริเวณกึ่งเขตร้อนโดยนำตัวอย่างของประชากร มาทำการวิเคราะห์ Cellulose acetate electrophoresis ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ Phosphoglucomutase (GPM) , Phosphoglucose isomerase (PGl), Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), Peptidase (PEP1,PEP2), hexokinase(HEX), Lactate dehydrogrnase (LDH) และ Fumarate hydratase (FUM) พบว่าเอนไซม์ PGM, PEP2 และ FUM ที่วิเคราะห์ได้มีหลายรูปแบบ (Platt and Spitze, 2000)

2.7 การประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในไรแดง

แนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจต่าง ๆ นั้น การศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพพื้นฐานทางชีวภาพของไรแดงซึ่งเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญยิ่ง โดยเฉพาะข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรแดง นับได้ว่าเป็นความรู้พื้นฐานเพื่อก่อให้เกิดกระทบทางด้านบวกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไปในอนาคต ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) อันเป็นรากฐานสำคัญของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดเพราะเอื้ออำนวยให้สิ่งมีชีวิตสามารถดำรงอยู่ให้สอดคล้องกับสภาพการเปลี่ยนแปลงของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิ่งแวดล้อมรอบๆตัวได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งการหลีกเลี่ยงศัตรูหรือการสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อการดำรงชีวิต (Korovchinsky, 1996; Meester, 1997)

การศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมเนื่องมาจากในธรรมชาติประชากรไรแดงมีความหลากหลายทางสายพันธุ์อยู่เป็นจำนวนมาก การเปลี่ยนแปลงทางสายพันธุ์จะเกิดอย่างค่อยเป็นค่อยไปซึ่งมีผลสืบเนื่องมาจากการคัดเลือกพันธุ์โดยธรรมชาติและการผสมข้ามสายพันธุ์ของประชากรไรแดงด้วยตนเอง ตัวแปรที่สำคัญในการกำหนดความหลากหลายทางพันธุกรรม คือ การคัดเลือกโดยธรรมชาติและขนาดของประชากร ซึ่งขนาดของประชากรเป็นตัวกำหนดการผสมข้ามสายพันธุ์ซึ่งเป็นการคัดเลือกแบบสุ่ม (Platt and Spitze, 2000) การศึกษาความหลากหลายของประชากรไรแดงเพื่อให้สามารถจำแนกชนิดและจัดกลุ่มของประชากรไรแดงที่มีในธรรมชาติได้และยังใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ของไรแดง ในปัจจุบันการใช้ DNA เทคนิค เช่น RFLP, SSCP, VNTR, RAPD, RFLP และ AFLP เป็นต้น (Cristescu *et al.*, 2006) โดยการศึกษาดังกล่าวสามารถทำได้หลากหลายวิธี ตัวอย่างการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน เช่น Eimanifar *et al.*, (2006) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในอาร์ทีเมีย *Artemia urmiana* ที่ทะเลสาบ Urmia ด้วยวิธี RFLP นอกจากนี้ Marková *et al.*, (2007) ได้ศึกษาความหลากหลายใน *Daphnia pulicaria* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือแม้กระทั่งการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโปรตีนใน Dapnia sp. (Benzie, 1988 ; Platt and Spitze, 2000) โครงการวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรน้ำในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ด้วยเทคนิค PCR-RAPD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

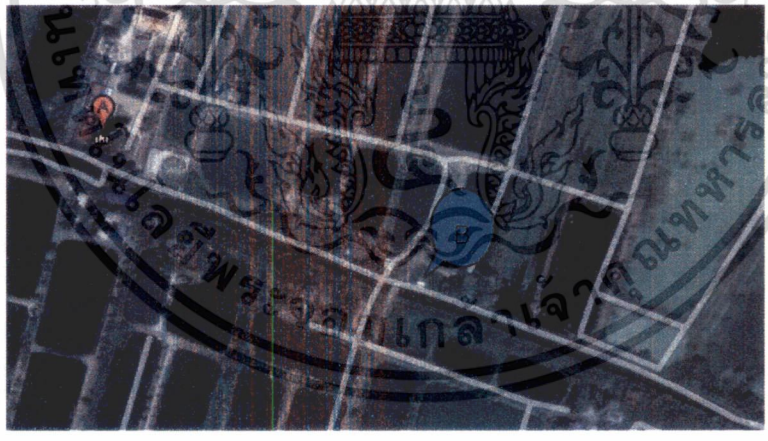
(1) สุ่มเก็บตัวอย่างไรแดงจากบ่อเลี้ยงปลา (ภาพที่ 3.1-3.3) เดือนตุลาคม 2553 แล้วนำมาพักไว้อย่างน้อย 1 วันที่ห้องปฏิบัติการของหลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง ล้างไรแดงให้สะอาด แล้วพักไรแดงในน้ำที่สะอาด ปราศจากคลอรีน หลังจากนั้นจะเปลี่ยนถ่ายน้ำเพื่อเป็นการทำความสะอาดไรแดงทุก 2-3ชั่วโมง อย่างน้อย จำนวน 3 ครั้ง

(2) หลังจากนั้นนำไรแดงจาก (1) มาล้างเพื่อทำความสะอาดอีกครั้งในในตู้ปลอดเชื้อด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วสลับกับแอลกอฮอล์ 70 % ทำความสะอาดอย่างน้อย 3 ครั้ง โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 กรองไรแดง

(3) สุ่มไรแดงจาก (2) จำนวนประมาณ 10 ตัว ใส่หลอดที่มีน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นนำมาทำความสะอาดอีกครั้งด้วยเครื่อง sonicate ประมาณ 2 นาที ล้างซ้ำจำนวน 5 ครั้ง

(4) นำไรแดงที่ผ่านขั้นตอนในข้อ (3) ทั้งหมด มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว จะได้ตัวอย่างที่คล้ายผงแป้ง

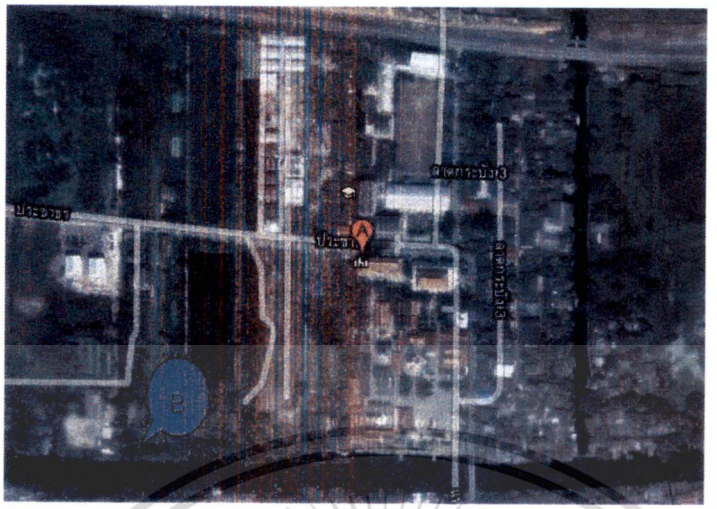
(5) เก็บตัวอย่างใส่ในข้อ 4 ใส่หลอดเก็บตัวอย่าง เก็บที่ -20 องศา



ภาพที่ 3.1 ตำแหน่งแรกเก็บที่บ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณที่วัดอุทัยธรรมารามธรรมาราม (ลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร) ตำแหน่ง A วัดอุทัยธรรมาราม ตำแหน่งเก็บไรแดง B

(Cursor : Lat 13.74602 Lon 100.82117)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.2 ตำแหน่งที่ 2 ทำการเก็บที่บ่อเลี้ยงปลาชะโดใกล้กับวัดสังฆราชา (ลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร) A บ่อที่ทำการเก็บไรแดง B (Cursor : Lat 13.72539 Lon 100.73595)

ภาพที่ 3.3 ตำแหน่งที่ 3 ทำการเก็บในเขตอำเภอบางเสาธง เข้าทางวัดศรีวารีน้อย (Cursor : Lat 13.668965 Lon 100.801554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์สกัดดีเอ็นเอ

(1) น้ำยา lysis Buffer

(2) Heat block

(3) ไมโครปิเปต

(4) เครื่อง centrifuge

(5) Nucleose – free water

(6) Master mix

(7) เครื่อง PCR

3.3 การสกัดดีเอ็นเอ

(1) ตักตัวอย่างไรแดงที่ผ่านการบดด้วยไนโตรเจนเหลวใส่หลอด microcentrifug ประมาณ 20 มิลลิกรัม เติม digestion solution Master Mix 275 µl (ตารางที่ 3.1)

(2) บ่มที่อุณหภูมิ 55°C ใน heat block ทิ้งไว้ตลอดคืน (10-12 ชั่วโมง) จากนั้นเติม Wizard ® SV lysis Buffer 250 µl ทำการ Vortex จากนั้นย้ายตัวอย่างที่ lysate ไปที่หลอด SV minicolumn Assembly และทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000X g 3 นาที

(3) ย้ายหลอด minicolumn จาก Assembly และทิ้งของเหลวในหลอด collection tube และสวมหลอด collection tube กลับเข้าไปใหม่

(4) เติมสาร Wizard ® SV Wash Solution (ที่ผสม 95% ethanol แล้ว) ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 x g 1 นาที ทิ้งน้ำที่อยู่ใน collection ทำซ้ำ 4 รอบ

(5) ทิ้งส่วนน้ำใน collection tube แล้ว ปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าที่ 13,000 x g 2 นาที จากนั้นย้าย minicolume ไปที่หลอดใหม่ (1.5 ml.) แล้วเติม nuclease – free water และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

(6) ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 x g 1 นาที ย้าย minicolume และเก็บที่ -20 หรือ - 70°C

(7) ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำการเตรียมเจลอะกาโรส 0.8% ใช้กระแสไฟฟ้า 30 โวลล์ ประมาณ 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบชุดสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (Wizard®SV Genomic DNA Purification System)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Nuclei lysis solution	200
0.5 EDTA (pH 8.0)	50
Proteinase K (20 mg/ml)	20
Rnase A solution (4 mg/ml)	5
ปริมาตรสุทธิ	275

3.4 ตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ยีน 16s rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction)

จีโนมมิคดีเอ็นเอที่สกัดทุกครั้งได้นำมาตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ของยีน16s rDNA ด้วย 2x PCR Enzyme Master Mix solution (Intron biotechnology (i-taq), Korea) จับคู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน 16s rDNA (ตารางที่ 3.2) ด้วยเครื่อง DNA thermal cycler (Multi Gene II, Labnet)

โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย gDNA 1.5 ไมโครกรัม 2x PCR Enzyme Master Mix 10ไมโครลิตร และไพรเมอร์ Forward (16s 27 bac) และ Reverse (16s 1,472 bac) อย่างละ 10 พิโคโมล โดยตั้งสภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 3 ขั้นตอน ดังนี้ (1) Initial denaturation 94 °C เวลา 5 นาที (2) Denaturation 94 °C เวลา 45 วินาที Annealing 50 °C เวลา 60 วินาที Extension 72 °C เวลา 1.30 นาที จำนวน35 รอบ และ (3) Final extension 72 °C เวลา 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสที่มีความเข้มข้น อะกาโรส 1.5 เปอร์เซนต์ต์ ที่ย้อมด้วย Gelstar nucleic acid gel stain (Biowhittaker molecular applications, USA) หรือ Ethidium bromide แล้วนำไปถ่ายภาพใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต ถ้ามีการปนเปื้อนจะเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส ต้องทำการเก็บตัวอย่างเพื่อสกัดจีโนมมิกดีเอ็นเอใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2x PCR Enzyme Master Mix	10
จีโนมิคดีเอ็นเอ	2
ไพรเมอร์ forward (5 มิลลิโมลาร์)	2
ไพรเมอร์ reverse (5 มิลลิโมลาร์)	2
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	4
ปริมาตรสุทธิ	20

3.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD (Random Amplifild Polymorphism DNA) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR 25 ไมโครลิตร (ตารางที่ 3.3) โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และน้ำ Nuclease – free water ใช้ไพรเมอร์ตามตารางที่ 3.4 โดยตั้งสภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 3 ขั้นตอน ดังนี้ (1) Initial denaturation 94 °C เวลา 4 นาที (2) Denaturation 94 °C เวลา 1 นาที Annealing 36 °C เวลา 1 นาที Extension 72 °C เวลา 2 นาที จำนวน 40 รอบ(ดัดแปลงจาก El. Alfy *et al.* 2009) และ (3) final extension 72 °C เวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสที่มีความเข้มข้น อะกาโรส 1.5 เปอร์เซนต์ต์ ที่ย้อมด้วย Gelstar nucleic acid gel stain (Biowhittaker molecular applications, USA) หรือ Ethidium bromide แล้วนำไปถ่ายภาพใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณจีโนมมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยา PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2x PCR Enzyme Master Mix	12.5
จีโนมิคดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1
ไพรเมอร์ (5 μM)	1
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	10.5
ปริมาตรสุทธิ	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 รหัสและลำดับเบสของ RAPD ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

รหัส	ลำดับเบส
OPA 03	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA 04	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA 05	5'-GAAACGGGTG-3'
OPA 07	5'-GAAACGGGTG-3'
OPA 08	5'-GTGACGTAGG-3'
OPA 09	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA 10	5'-GTGATCGCAG-3'
OPA 13	5'-CAGCACCCAC-3'
OPA 17	5'-GACCGCTTGT-3'
OPA 19	5'-CAAACGTCGG-3'

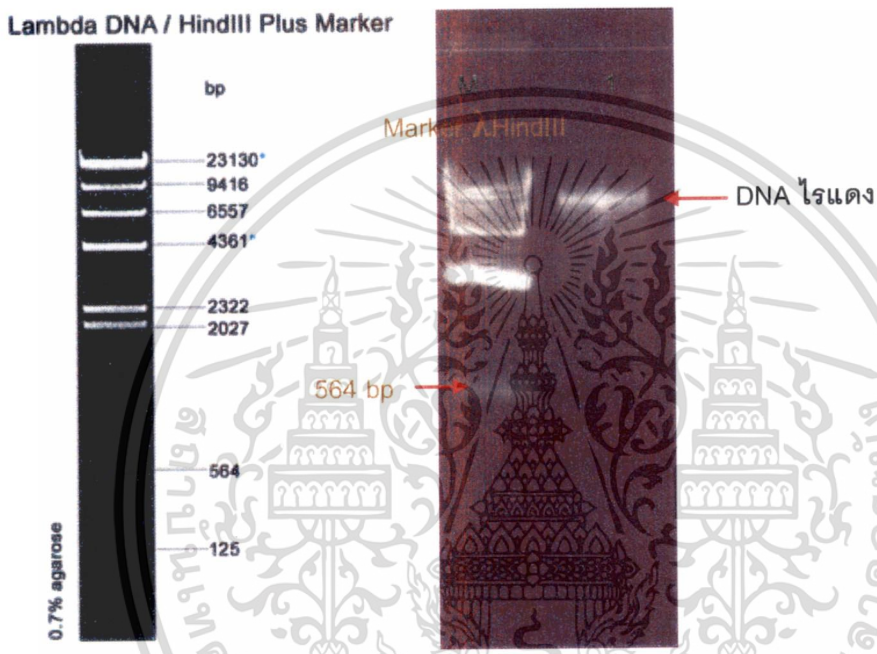
3.6 การตรวจวิเคราะห์ผลการทดลอง

ตรวจสอบผลผลิต PCR-RAPD ด้วยวิธีการเจลอิเล็กโตโฟรีซิส แถบดีเอ็นเอที่นำมาทำเป็นเมทริกซ์ (Matrix) โดยทำการเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างเป็นคะแนน นิยมใช้ระบบเลข 1 และ 0 โดยตัวเลข 1 แสดงการมีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ส่วน 0 แสดงการไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกัน จากนั้นใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.01e คำนวณหาค่า Similarity (S_{xy}) ภายในประชากรและสร้าง Phylogenetic tree เพื่อหาความสัมพันธ์ของไรแดงทั้ง 3 แหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการสกัดดีเอ็นเอไรแดงจากบ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณวัดอุทัยธรรมาราม (ภาพที่ 4.1) ซึ่งดีเอ็นเอดังกล่าวได้นำมาศึกษาด้วยเทคนิค PCR-RAPD ต่อไป



ภาพที่ 4.1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (A) และแถบจีโนมมิคดีเอ็นเอของไรแดงที่สกัดได้ (B)

M แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน λ HindIII

1 แถบดีเอ็นเอไรแดง

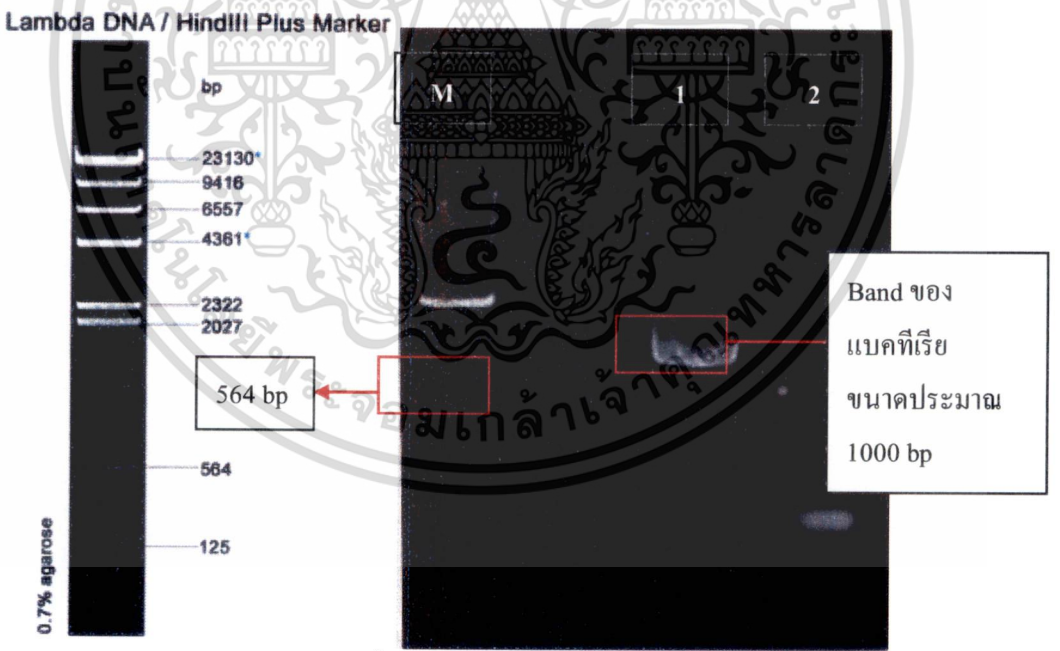
เมื่อนำจีโนมิคดีเอ็นเอของไรแดงที่ได้จากการสกัด นำมาทำ PCR (16S) ก่อนเพื่อดูว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียหรือไม่ โดยการนำไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียในตำแหน่ง 16S มาใช้ในการตรวจสอบก่อนที่จะใช้เทคนิค PCR-RAPD ในการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรแดงต่อไปพบว่าตัวอย่างไร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

131048

แดงที่เก็บจากบ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณที่วัดอุทัยธรรมาราม (ภาพที่ 4.2) ซึ่งมีปัญหาในระหว่างการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากเกิดการบลูมของโคพีพอดบลูมแทนทีไรแดงทำให้ปริมาณไรแดงที่ต้องการมีจำนวนน้อยเกินไป ในขณะเดียวกันเมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการล้างทำความสะอาดและเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส มาตรวจสอบด้วย PCR (16S) ปรากฏว่าพบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย (ภาพที่ 4.3) ดังนั้นจึงทำให้ได้วิธีทำความสะอาดไรแดงเพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียตามวิธีการทดลอง

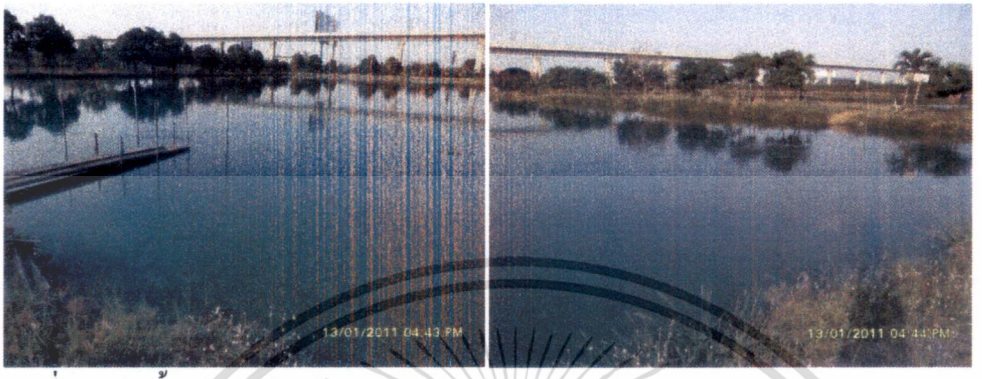
ภาพที่ 4.2 บ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณวัดอุทัยธรรมาราม



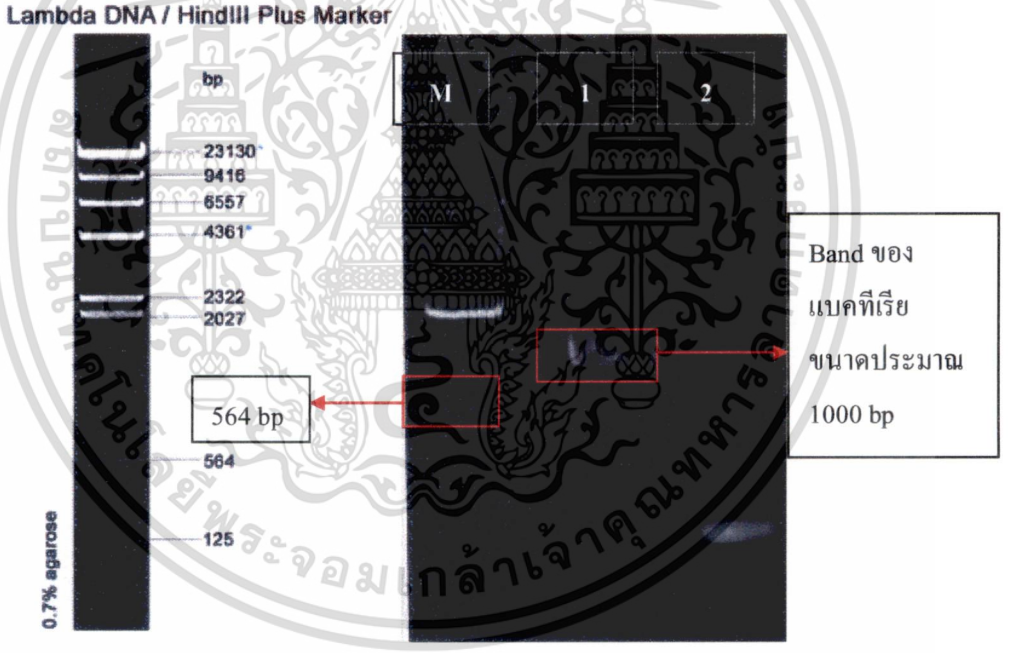
ภาพที่ 4.3 ผลจากการทำ PCR (16S) พบการปนเปื้อนของจีโนมิคแบคทีเรียในตัวอย่างดีเอ็นเอไรแดง วัดอุทัยธรรมาราม (M: Marker , 1 คือ band ของแบคทีเรียที่เกิดจากการทำ PCR (16S), 2 คือ negative)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขณะเดียวกันที่บริเวณบ่อเลี้ยงปลาชะโดใกล้วัดสังฆราชานั้น (ภาพที่ 4.4) ตัวอย่างไรแดงมีการปนเปื้อนทั้งของไรหินเปลือกแข็ง และโคพีพอต และสามารถเก็บได้ในปริมาณน้อย เมื่อนำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาในขั้นตอน PCR (16S) พบการปนเปื้อนจากจีโนมิคดีเอ็นเอของแบคทีเรีย (ภาพที่ 4.5) เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 4.4 บ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณวัดสังฆราชา



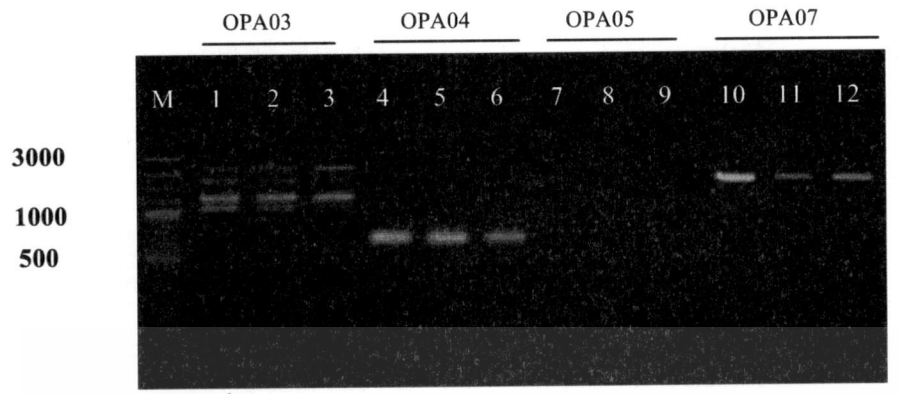
ภาพที่ 4.5 ผล PCR (16S) พบการปนเปื้อนของจีโนมิคแบคทีเรียในตัวอย่างดีเอ็นเอไรแดงวัดสังฆราชา (M: Marker , 1 คือ band ของแบคทีเรียที่เกิดจากการทำ PCR (16S), 2 คือ negative)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD –PCR โดยทดลองสุ่มเพิ่มปริมาณผลผลิตดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่มีขนาด 10-12 นิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 8 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณและใช้ได้มี 5 ชนิด ได้แก่ OPA03 OPA04 OPA07 OPA09 และ OPA13 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 5 ชนิด มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 3,000 – 500 bp พบว่ามีแถบดีเอ็นเอมากสุด 6 แถบดีเอ็นเอ และน้อยสุด 1 แถบดีเอ็นเอ

เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPA03 ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรแดง 3 กลุ่ม พบว่าไรแดงวัดอุทัยธรรมารามและวัดสังฆราชาแสดง RAPD marker จำนวน 4 เครื่องหมาย คือเครื่องหมายขนาด 2,500, 1,700, 1,200 และ 1,000 bp ตามลำดับ ส่วนไรแดงวัดศรีวารีน้อยมี RAPD marker จำนวน 3 เครื่องหมาย คือ เครื่องหมายขนาด 2,500, 1,700, และ 1,200 bp โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPA04 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 800 bp ของไรแดงทั้ง 3 กลุ่ม ไพรเมอร์ OPA07 พบว่า RAPD marker ของไรแดงวัดอุทัยธรรมารามจำนวน 3 เครื่องหมาย มีขนาดเท่ากับ 3,000, 2,000 และ 600 bp ตามลำดับ ในขณะที่ไรแดงจากวัดสังฆราชาและวัดศรีวารีน้อยมี RAPD marker จำนวน 1 เครื่องหมาย มีขนาดเท่ากับ 2,000 bp ไพรเมอร์ OPA09 เมื่อนำมาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอไรแดงทั้ง 3 แหล่ง พบว่ามี RAPD marker จำนวน 2 เครื่องหมาย มีขนาดเท่ากับ 1,500 และ 1,000 bp ไพรเมอร์ OPA13 ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอไรแดงทั้ง 3 แหล่ง พบว่าเกิด RAPD marker จำนวน 5 เครื่องหมาย ในไรแดงวัดอุทัยธรรมารามพบว่ามีเครื่องหมายขนาด 2,500, 1,700, 1,500, 1,200 และ 700 bp ส่วนไรแดงวัดสังฆราชา และวัดศรีวารีน้อยมีเครื่องหมายขนาด 2,500, 1,700, 1,500, 1,200 และ 1,000 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA03 OPA04 OPA05 OPA07 ของบ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณวัดอุทัยธรรมาราม บ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณวัดสังฆราชา และบ่อเลี้ยงปลาบริเวณวัดศรีวารีน้อย

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder

1 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงวัดอุทัยธรรมาราม (OPA03)

2 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงวัดสังฆราชา (OPA03)

3 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงวัดศรีวารีน้อย (OPA03)

4 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงวัดอุทัยธรรมาราม (OPA04)

5 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงวัดสังฆราชา (OPA04)

6 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงวัดศรีวารีน้อย (OPA04)

7 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงอุทัย (OPA05)

8 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงสังฆราชา (OPA05)

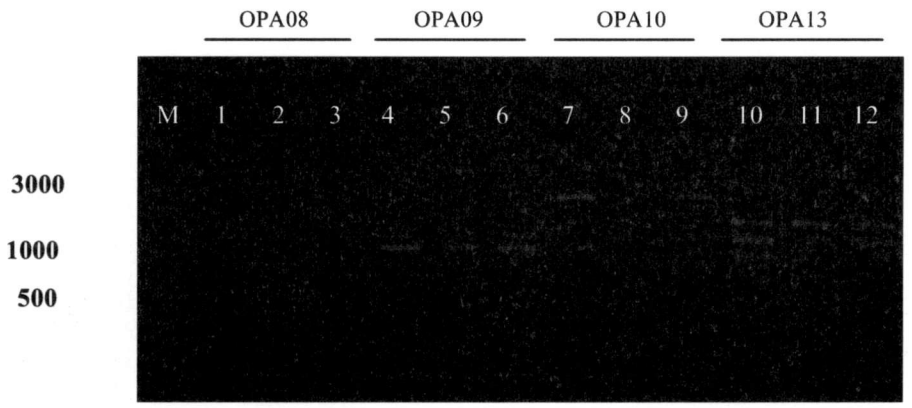
9 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงศรีวารีน้อย (OPA05)

10 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงอุทัย (OPA07)

11 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงสังฆราชา (OPA07)

12 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงศรีวารีน้อย (OPA07)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA08 OPA09 OPA10 OPA13 ของบ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณวัดอุทัยธรรมาราม บ่อเลี้ยงปลาชะโดบริเวณวัดสังฆราชา และบ่อเลี้ยงปลาบริเวณวัดศรีวารีน้อย

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder

1 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงวัดอุทัยธรรมาราม (OPA08)

2 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงวัดสังฆราชา (OPA08)

3 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงวัดศรีวารีน้อย (OPA08)

4 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงวัดอุทัยธรรมาราม (OPA09)

5 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงวัดสังฆราชา (OPA09)

6 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงวัดศรีวารีน้อย (OPA09)

7 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงอุทัย (OPA10)

8 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงสังฆราชา (OPA10)

9 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงศรีวารีน้อย (OPA10)

10 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงอุทัย (OPA13)

11 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงสังฆราชา (OPA13)

12 ลายพิมพ์ DNA ของไรแดงศรีวารีน้อย (OPA13)

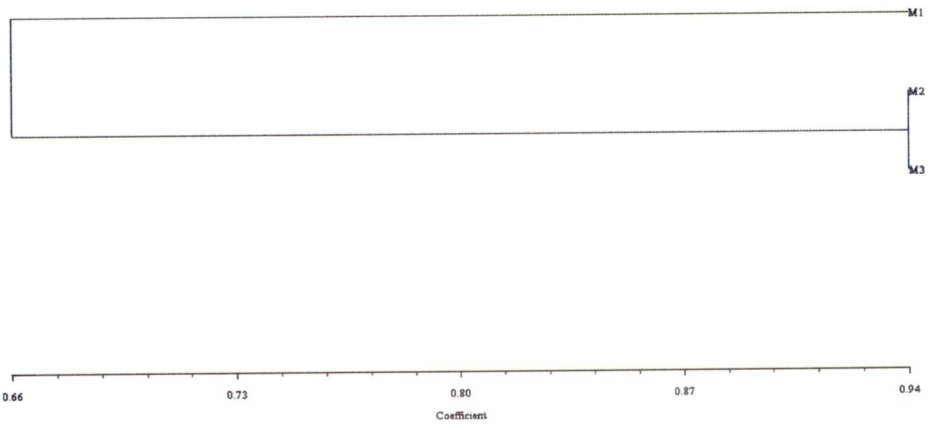
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 5 ชนิด พบค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกัน (similarity coefficient) ระหว่าง 0.625 ถึง 0.938 (ตารางที่ 4.1) โดยไรแดงวัดสังฆราชาและไรแดงวัดศรีวารีน้อยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกันใกล้กันที่สุดเท่ากับ 0.938 และสอดคล้องกับผลของ phylogenetic tree พบว่าระยะห่างของค่าพันธุกรรม (Genetic distance) ไรแดงวัดศรีวารีน้อยกับวัดสังฆราชามีความใกล้ชิดกันของพันธุกรรมมากที่สุด ส่วนไรแดงวัดอุทัยธรรมารามมีความแตกต่างของพันธุกรรมมากกว่าไรแดงทั้ง 2 แหล่ง (ภาพที่ 4.8) อย่างไรก็ตามไรแดงแม่พันธุ์แต่ละตัวสามารถให้ลูกได้ตั้งแต่ 4-22 ตัวภายในเวลา 1.5-2 วัน (Rosa, 2013) ของพฤติกรรมการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ดังนั้นจึงทำให้ไรแดงมีจำนวนมากมายในช่วงของสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ในขณะที่ถ้าหากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมไรแดงจะมีพฤติกรรมสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (ภาพที่ 4.9) ดังนั้นโอกาสของระยะห่างทางพันธุกรรมของไรแดงแต่ละกลุ่มจึงน่าจะมีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.10) โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณลักษณะของการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ กรณีที่เกิดความใกล้เคียงทางพันธุกรรมอาจเนื่องจากการเคลื่อนย้ายไข่พักไรแดงตามกระแสน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีน้ำท่วมใหญ่ของกรุงเทพฯ ในปี 2554 ที่ผ่านมา อาจส่งผลทำให้เกิดการผสมกันระหว่างแต่ละกลุ่มประชากรของไรแดงได้

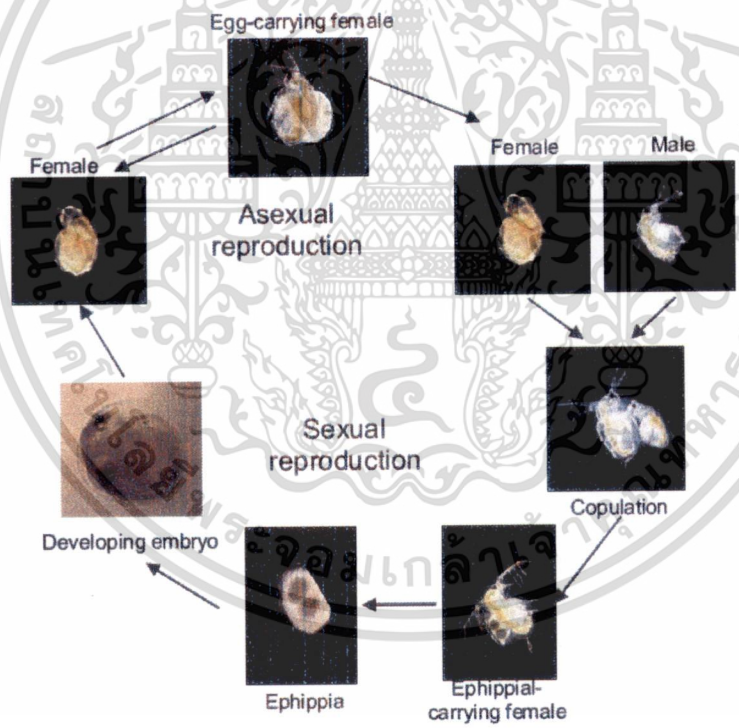
ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกัน (similarity coefficients) ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากผลผลิต RAPD-PCR ของไพรเมอร์ทั้ง 8 ชนิด ของไรแดงทั้ง 3 แหล่ง

	M1	M2	M3
M1	1		
M2	0.688	1	
M3	0.625	0.938	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



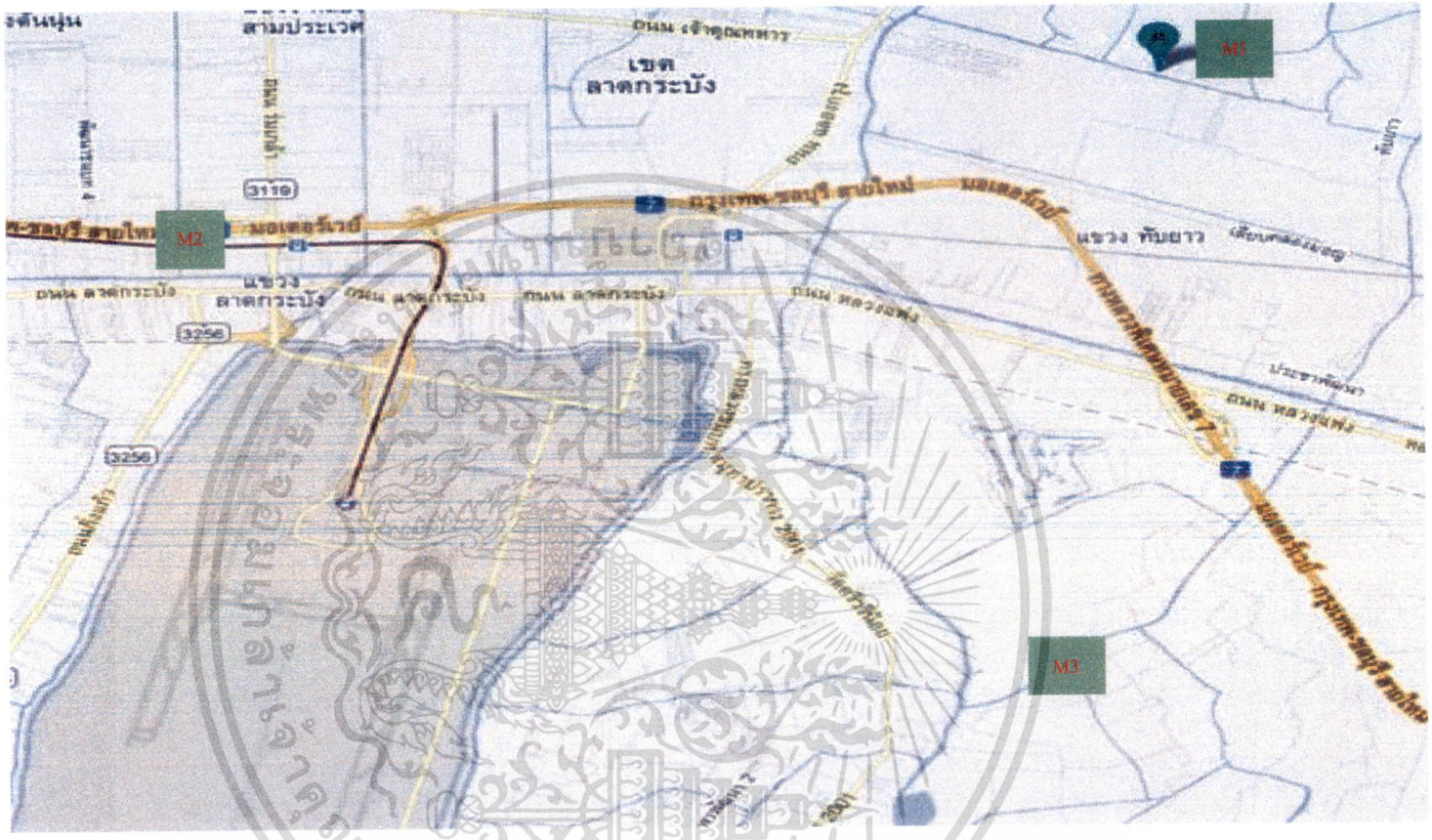
ภาพที่ 4.8 Phylogenetic tree ของไรแดงทั้ง 3 แหล่ง ไรแดงวัดอุทัยธรรมาราม (M1), ไรแดงวัดสังฆราชา (M2) และไรแดงวัดศรีวารีน้อย (M3)



ภาพที่ 4.9 ระบบการสืบพันธุ์ของไรแดง

(ที่มา: Leung, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 แผนที่แสดงการเชื่อมกันของคลองบริเวณที่ทำการเก็บไรแดงในตำแหน่งต่างๆ ได้แก่ วัดอุทัยธรรมาราม (M1) วัดสังฆราชา (M2) และวัดศรีวารีน้อย (M3)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. เพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในตัวอย่างไรแดง ควรมีการพักไรแดงอย่างน้อย 1 วัน และมีการทำความสะอาดไรแดงก่อนสกัดดีเอ็นเอตามวิธีทดลองข้างต้น

2. ลักษณะทางพันธุกรรมของไรแดงวัดสังฆราชา และไรแดงวัดศรีวารีน้อย มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม แต่แตกต่างจากไรแดงวัดอุทัยธรรมาราม ดังนั้นแนวโน้มของไรแดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรน้ำจากทั้ง 3 แหล่ง อาจแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ไรน้ำจากบริเวณวัดสังฆราชากับวัดศรีวารีน้อย และไรน้ำจากบริเวณวัดอุทัยธรรมาราม

ในการศึกษาครั้งต่อไปควรจะสร้างสายพันธุ์ไรแดงโดยใช้แม่พันธุ์ให้น้อยที่สุดและควรเก็บรวบรวมจากหลายๆ แหล่ง เพื่อผลิตกลุ่มไรแดง หลังจากนั้นอาจจะเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมอีกครั้ง รวมทั้งศึกษาคุณค่าทางโภชนาการเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิดกันต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กมลศิริ พันธนียะ. 2545. **ชีววิทยาแลการเลี้ยงไรแดงในบ่อดิน**. [Online]. http://www.nicaonline.com/articles9/site/view_article.asp?idarticle=121

กวิน หาญบูรณะพงศ์. 2548. คุณค่าทางโภชนาการของไรแดงที่เลี้ยงด้วยนมดิบ. ปัญหาพิเศษ, ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ฉิชนันทน์ ทินปราณี. 2548. ชนิดของกรดไขมันในไรแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิดกัน. ปัญหาพิเศษ, ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ทวี วิพุทธานุมาศ และเรวดี ศรีประเสริฐ. 2538. การเพาะไรแดงโดยใช้รำละเอียดหมัก. เอกสารวิชาการฉบับที่ 19/2538. กองประมงน้ำจืด กรมประมง กรุงเทพฯ. 39 น.

ทวี วิพุทธานุมาศ อดิศร อำนวยสิทธิ์ วิชัย เกียรติจินดารัตน์ และกฤษณี กลัดสวัสดิ์. 2529. การใช้คลอเรลล่าควบคุมไรแดงในการอนุบาลลูกปลาบู่. รายงานประจำปี 2529. สถานีพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลาจังหวัดปทุมธานี. กองประมงน้ำจืด. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ธนวัฒน์ ชัชวาลธาตรี เชิดศักดิ์ วงษ์กมลชุณห์ และนวรัตน์ จิตร์ภิรมย์ศรี. 2535. การทดลองหาอัตราการปล่อยลูกปลาตะเพียนขาววัยอ่อนที่เหมาะสมในบ่อซีเมนต์ (ก่อนอนุบาลในบ่อดิน) โดยให้อาหารธรรมชาติ รายงานประจำปี 2535. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดยโสธร. ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืด จังหวัดอุบลราชธานี. กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เนติมา คูเจริญ. 2548. คุณค่าทางโภชนาการของไรแดงที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรียที่พบในน้ำนมดิบ. ปัญหาพิเศษ, ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บรรจง จำนงศิตธรรม บุญช่วย ชาวปากน้ำ และจิญาภร หุ้นเอียด. 2535. การอนุบาลลูกปลาหมอช้างเหยียบ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 3/3535. ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดกาญจนบุรี. กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ประจวบ ดลสุจิต. 2541. การใช้ไรแดง (*Moina* sp.) เป็นอาหารกุ้งกุลาดำ (*Penease monodon*) ในระยะ P-4 ถึง P-17 แทนไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*). โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรัชญารี ตรียวง. 2548. คุณค่าทางโภชนาการของไรแดงที่เลี้ยงด้วยน้ำเขียว. ปัญหาพิเศษ, ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พูนสิน พานิชสุข. 2539. ความเป็นไปได้ในการใช้โรติเฟอร์กับไรแดงอนุบาลลูกปลากระพงขาววัยอ่อนแทนการใช้อาร์ทีเมีย. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 12/2539 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล ทวี วิพุทธานุมาศ และทัศนีย์ สุขสวัสดิ์. 2532. การเพิ่มผลผลิตไรแดงด้วยวิตามิน. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 11/2532 . สถาบันประมงน้ำจืดจังหวัดปทุมธานี. กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล ทวี วิพุทธานุมาศ อนุสสรณ์ มีวรรณ และเกศา โภคทรัพย์.2531. การศึกษาความหนาแน่นที่เหมาะสมของไรแดงในการอนุบาลปลาบึก. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 6/2531 . สถาบันประมงน้ำจืดจังหวัดปทุมธานี. กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ภานุ เทวรัตน์มณีกุล, สำรวย เสร็จกิจ, ทัศนีย์ วัชรกรโยธิน. 2541. **การเพาะเลี้ยงไรแดง**. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.[Online]. http://web.ku.ac.th/agri/rai_red/index.html

ภานุ เทวรัตน์มณีกุล, สำรวย เสร็จกิจ, ทัศนีย์ วัชรกรโยธิน. 2541. **การเพาะเลี้ยงไรแดง**. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.[Online]. http://web.ku.ac.th/agri/rai_red/index.html

มารศรี นวนราเศรษฐ์. 2528. การนำน้ำโสโครกจากแหล่งชุมชนมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงไรแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์. 2548. การศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงไรแดงด้วยนมผงสำเร็จรูป.วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 23 : 1 (24-35)

รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์. 2549. การศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงไรแดงด้วยนมดิบ. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 24 : 3 (58-67)

ลัดดา วงรัตน์ ประวิทย์ สุรนีรนารท และประจิตร วงศ์รัตน์. 2524. การเพาะไรแดงเพื่อการค้า. รายงานวิจัย ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 64 น.

วันเพ็ญ มีนกาญจน์ และศุภรัตน์ ฉัตรจริยเวศน์. 2542. สภาวะการเพาะเลี้ยงปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) ในจังหวัดราชบุรี. วารสารการประมง 52 (1) มกราคม-กุมภาพันธ์ 19-29.

วิรัตดา สีตะสิทธิ์ .2544. วิเคราะห์และประมวลผลการศึกษาวิจัย เรื่องไรแดงในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 207 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิรัตดา สีตะสิทธิ์ และวิมล จันทรโรทัย. 2526. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการผลิตไรแดงในบ่อซีเมนต์. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 26/2526 สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วีระ วัชรกรโยธิน ทวี วิพุทธานุมาศ ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล และเกษา โภคทรัพย์. 2531. การศึกษาความหนาแน่นของไรแดงที่เหมาะสมในการอนุบาลลูกปลาดุกอุย ลูกปลาดุกเทศ และลูกปลาดุกผสม. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 7/2531 สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดปทุมธานี. กองประมงน้ำจืด . กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ศราวุธ เจะโส๊ะ และอนุศักดิ์ อังศุภานิช. 2531. การอนุบาลลูกปลาสลิดวัยอ่อนในบ่อซีเมนต์ด้วยอาหารต่างชนิด. วารสารการประมง . 48(5) : 399-410.

สันทนา ดวงสวัสดิ์ ไมตรี ดวงสวัสดิ์ และสมเพชร ไชยทอง. 2524. การศึกษาชีวประวัติและการเพาะเลี้ยงไรแดงเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์วัยอ่อน. เอกสารงานนิเวศวิทยา ฉบับที่ 1/2524. ฝ่ายวิจัยสิ่งแวดล้อมสัตว์น้ำ, สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 14 น.

สำรวจ เสร็จกิจ และประเสริฐ สีตะสิทธิ์. 2533. ปริมาณไรแดงในการอนุบาลลูกปลาดุกอุย. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 109 สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สำรวจ เสร็จกิจ. 2531. การเพิ่มผลผลิตไรแดงในบ่อซีเมนต์. เอกสารวิชาการฉบับที่ 72 สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง กรุงเทพฯ. 21 น.

สุทัศน์ เผือกจีน. 2540. การอนุบาลลูกปลาแรดวัยอ่อนด้วยอาหารสำเร็จรูปที่เคลือบและไม่เคลือบผิวด้วยไข่เปรียบเทียบกับไรแดงและรำข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุนันท์ ทวยเจริญ. 2520. การศึกษาอนุกรมวิธานและชีววิทยาบางประการของไรน้ำ กลุ่ม Cladocerans ในเขตกรุงเทพมหานคร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุปราณี บำรุงสุข. 2513. การเลี้ยงลูกปลาสลิดด้วยไรแดง. รายงานประจำปี 2513. แผนกทดลองและเพาะเลี้ยง. กองบำรุงพันธุ์สัตว์น้ำ. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สุพิศ ทองรอด. 2535. ความสำคัญของไขมันในอาหารสัตว์น้ำ. วารสารประมง

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อโณทัย คมเศวต. 2521. การทดลองเลี้ยงไรแดง *Moina* spp. สัตว์เศรษฐกิจ. วารสารแม่โจ้. 3(1):19-21.

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล และสุดารัตน์ บวรศุภกิจกุล. 2544. ศักยภาพการผลิตปลากัดเพื่อการส่งออกในจังหวัดนครปฐม. วารสารการประมง 54(5) กันยายน-ตุลาคม. 423-432

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Benzie, J., A., H. 1988. The systematics of Australian *Daphnia* (Cladocera: Daphniidae) Electrophoretic analyses of the *Daphnia carinata* complex. Hydrobiologia 166:183-197.

Cristescu E.A.M., Colbourne K.J., Radivojac J. and Lynch M. 2006. "**A microsatellite-based genetic linkage map of the waterflea, *Daphnia pulex* : On the prospect of crustacean genomics**". Genomics 88 : 415-430.

Eimanifar, A., Rezvani, S., and Carapetian, J. 2006. Genetic differentiation of *Artemia urmiana* from various ecological populations of Urmia Lake assessed by PCR amplified RFLP analysis. J. of Experimatal Marine Biology and Ecology 33 ; 275-285.

Hanaee, J.N., Agh. M., Delazer, A. and S.D. Sarker. 2005. Studies on the enrichment of *Artemia urmiana* cyst for improving food value. Animal feed science and technology. 120:107-112.

Korovchinsky N.M. 1996. " **How many species of Cladocera are there?"**. Hydrobiologia 321: 191-204.

Leung, Y.F.J. (2009) Reproduction of the zooplankton, Daphnia carinata and Moina australiensis: Implications as live food for aquaculture and utilization of nutrient loads in effluent. A thesis submitted to The University of Adelaide for the degree of Doctor of Philosophy, School of Agriculture, Food and Wine, The University of Adelaide (www. ebooks.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/2440_62460/1/02whole access: 4Jul13)

Marková, S., Dufesne, F., Rees, D.J. Ćerný, M. and Kotlík, P. 2007. Cryptic intercontinental colonization in water fleas *Daphnia pulicaria* inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. Molecular Phylogenetics and Evolution 44 : 42-52.

Meester D.L. 1997. "**Neutral markers, ecologically relevant traits, and the structure of genetic variation in *Daphnia***". Aquatic Ecology 31: 79-87.

Platt T. and Spitze K. 2000. **" Genetic variation in a subtropical population of Daphnia"**. Hydrobiologia 435: 191-196.

Rosa, J.D.L. 2013. Water flea: The ideal live food for freshwater fry. http://www.bar.gov.ph/digest-home/digest-archives/91-2003-2nd-quarter/3250-apr-june03-water-fleas (online, eccess 4 July 2013)

Stuart, C.A. and Banta, A.M. 1931. Available Bacteria and the sex ratio in *Moina*. Physiol. Zool. 4(1) : 72-100.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้