

การพัฒนาเทคนิค Environmental DNA เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของปลาหู
ในธรรมชาติ

DEVELOPMENT OF ENVIRONMENTAL DNA TECHNIQUE TO
DETECT MACKEREL (*RASTRELLIGER SPP.*) IN NATURE



นิลบล ไพรินทร์

NILUBOL PAIRIN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2567

KMITL-2024-AG-M-081-420

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DEVELOPMENT OF ENVIRONMENTAL DNA TECHNIQUE TO
DETECT MACKEREL (*RASTRELLIGER SPP.*) IN NATURE



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN FISHERIES SCIENCE
SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2024

KMITL-2024-AG-M-081-420

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2024

SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเทคนิค Environmental DNA เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในธรรมชาติบริเวณอ่าวไทย
นักศึกษา	นางสาวนิลุบล ไพรินทร์
รหัสประจำตัว	61604062
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การประมง
พ.ศ.	2567
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. วลัยลดา กลางนุรักษ์

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบ Environmental DNA (eDNA) ที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุ (*Rastrelliger spp.*) ในธรรมชาติ ซึ่งมีการศึกษา 3 ขั้นตอน โดยเริ่มจากการทดลองหาวิธีมาตรฐาน การทดสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุในระดับห้องปฏิบัติการ และการทดสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุในระดับภาคสนาม ผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้ไพรเมอร์คู่ใหม่ที่มีความจำเพาะกับกลุ่มปลาทุ คือ Rb_COI_F และ Rb_COI_R ซึ่งสามารถใช้จำลองดีเอ็นเอบริเวณยีน Cytochrome c oxidase subunit 1 mitochondrial gene (COI) ที่มีความยาว 548 คู่เบส อีกทั้งยังมีความไวในการจับกับดีเอ็นเอที่ปริมาณตั้งแต่ 0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และกระดาษกรองที่เหมาะสมคือประเภท Membrane Filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ใช้เวลาในการกรองน้ำน้อย และสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของกลุ่มปลาทุในห้องปฏิบัติการได้จากตัวอย่างน้ำทะเลตั้งแต่ที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และพบว่าการตรวจสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุในแหล่งน้ำธรรมชาติที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณปากแม่น้ำแม่กลอง จังหวัดสมุทรสงคราม ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน ปี 2564 ถึง เดือนเมษายน ปี 2565 นั้นสามารถตรวจสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุได้ในเดือนพฤศจิกายน จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการพัฒนาเทคนิค eDNA นั้นเป็นเครื่องมืออีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจหาและติดตามกลุ่มปลาทุบริเวณอ่าวไทยได้

Thesis	Development of Environmental DNA Techniques to Detect Mackerel (<i>Rastrelliger</i> spp.) in Nature
Student	Miss Nilubol Pairin
Student ID.	61604062
Degree	Master of Science
Programe	Fisheries science
Year	2024
Thesis Advisor	Asst. prof. Wanlada Klangnuruk, Ph.D

ABSTRACT

This study aims to develop standardized methods for detecting Environmental DNA (eDNA) that can be used to assess the presence of wild mackerel (*Rastrelliger* spp.) in their natural habitat. This research involves three main steps: first, the development of standardized methods; second, laboratory-based assessments to determine the presence of wild mackerel; and third, field-based investigations to confirm their presence in natural habitat. The result of this study presents a new pair of primers specific to the mackerel group, namely Rb_COI_F and Rb_COI_R. These primers amplify a total length of 548 base pairs of Cytochrome c oxidase subunit 1 mitochondrial gene (*COI*) and exhibited notable sensitivity, enabling them to bind to environmental DNA (eDNA) even at concentrations as low as 0.02 µg/ml. The most effective filtration method is the utilization of a membrane filter with a 0.45-µm pore size, facilitating efficient water filtration while minimizing time requirements. Furthermore, the study has successfully detected wild mackerel eDNA in seawater samples with volumes at 100 ml in laboratory. The examination of the presence of mackerel in natural habitat of Samut Songkhram province, from November 2021 to April 2022, revealed that wild mackerel were detected in November using eDNA techniques. This study confirms the significance of eDNA techniques as an alternative tool for monitoring and tracking wild mackerel in the Gulf of Thailand.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. วลัยลดา กลางนุรักษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ รศ.ดร. มณฑล แก่นมณี และ ผศ.ดร. อนุญญา เจริญพรนิพัทธ์ กรรมการสอบหัวข้อ โครงร่างวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะ รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ที่ให้คำแนะนำด้านการใช้ เครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ จนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ รวมทั้ง นักศึกษาปริญญาโทใน Molecular Ecology Lab คณะเทคโนโลยีการเกษตร สาขาวิทยาศาสตร์การ ประมง ที่ให้ความช่วยเหลือในการกรองตัวอย่างน้ำจนเป็นผลสำเร็จ

ขอขอบคุณ น.ส. ปิยฉัตร ป้อมเจริญสุข และครอบครัวที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างน้ำ ทะเลตลอด 6 เดือน จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

สุดท้ายต้องขอขอบคุณบิดา พี่ชาย พี่สาว และน้องสาว ซึ่งเป็นที่รักที่คอยสนับสนุน เป็นกำลังใจ ที่ดีตลอดมา

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้บิดามารดา ซึ่งเป็น ที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอด ประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

นิลุบล ไพรินทร์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของปัญหา	2
1.3 สมมุติฐานของการศึกษา	2
1.4 ทฤษฎีหรือแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย	2
1.5 ขอบเขตการวิจัย	3
1.6 ขั้นตอนการศึกษา	4
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 ปลาทุ <i>Rastrelliger</i> spp.	6
2.1.1 เส้นทางการอพยพของกลุ่มปลาทุในอ่าวไทย (<i>Rastrelliger</i> spp.)	8
2.1.2 ปริมาณการทำประมงปลาทุ – ลังในประเทศไทย	15
2.2 เทคนิค eDNA คืออะไร	21
2.2.1 ดีเอ็นเอคืออะไร	21
2.2.2 ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (Mitochondria)	21
2.2.3 ดีเอ็นเอ บาร์โค้ด (DNA Barcode)	23
2.2.4 การสกัดดีเอ็นเอ	24
2.2.5 เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction (PCR))	25
2.2.6 อิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis)	27
2.2.7 การตรวจหาสิ่งมีชีวิตจากการตรวจสอบร่องรอยดีเอ็นเอในสิ่งแวดล้อม (Environmental DNA หรือ eDNA)	28
2.2.8 ข้อดีและประโยชน์ของการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด	41
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และส่งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1 วิธีการกรองตัวอย่างน้ำ	43
3.2 การออกแบบไพรมอร์และการทดสอบไพรมอร์	44
3.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับห้องปฏิบัติการ	47
3.4 การตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับภาคสนาม	48
บทที่ 4 ผลการทดลอง	51
4.1 การออกแบบวิธีการกรองตัวอย่างน้ำ	51
4.2 วิธีการออกแบบไพรมอร์และการทดสอบไพรมอร์	53
4.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับห้องปฏิบัติการ	65
4.4 การตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับภาคสนาม	66
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	68
5.1 การออกแบบวิธีการกรองตัวอย่างน้ำ	68
5.2 วิธีการออกแบบไพรมอร์และการทดสอบไพรมอร์	69
5.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับห้องปฏิบัติการ	70
5.4 การตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับภาคสนาม	71
บทที่ 6 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	73
6.1 สรุปผลการวิจัย	73
6.2 ข้อเสนอแนะ	73
บรรณานุกรม	74
ประวัติผู้เขียน	86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และแจ้งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	สรุปปริมาตร วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำ และประเภทกระดาษกรองที่ใช้ในการตรวจหา eDNA ในแหล่ง 35 - 37
2	ประสิทธิภาพของการตรวจสอบทางชีวภาพด้วยเทคนิค eDNA และการสำรวจแบบ วิธีการดั้งเดิม 42
3	การเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการกรองตัวอย่างน้ำกับปริมาตรตัวอย่างน้ำและ ประเภทกระดาษกรอง 52
4	ข้อมูลของไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบขึ้นมาใหม่จากยีน <i>COI</i> เพื่อใช้ในการตรวจสอบ การมีอยู่ของกลุ่มปลาจากร่องรอยดีเอ็นเอในสิ่งแวดล้อม 54
5	ข้อมูลของไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบขึ้นมาใหม่จากยีน <i>cytb</i> เพื่อใช้ในการตรวจสอบ การมีอยู่ของกลุ่มปลาจากร่องรอยดีเอ็นเอในสิ่งแวดล้อม 55
6	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ กับลำดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตในฐานข้อมูล NCBI 58
7	รายละเอียดของไพรเมอร์ยีน <i>COI</i> และ <i>cytb</i> ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ พร้อมทั้งอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน Annealing และ ขนาดเป้าหมายของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 60
8	ผลการวิเคราะห์พีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอของกลุ่มปลา (+ คือ ตรวจสอบพบดีเอ็นเอ และ - คือ ไม่สามารถตรวจสอบพบดีเอ็นเอ) ที่จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดที่ 1 2 และ 3 ณ บริเวณปากแม่น้ำแม่กลอง ตำบลแม่กลอง อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม 67

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1	แผนผังขั้นตอนการศึกษาการพัฒนาเทคนิค Environmental DNA เพื่อตรวจสอบ การมีอยู่ของกลุ่มปลาในธรรมชาติบริเวณอ่าวไทย 5
2.2	ลักษณะภายนอกของปลาในสกุล <i>Rastrelliger</i> spp. 7
2.3	เส้นทางการเคลื่อนที่ของปลาในพื้นที่ย่านอ่าวไทย ช่วงต้นฤดูฝนถึงกลางฤดูฝน (มิถุนายน ถึง กรกฎาคม) 11
2.4	เส้นทางการเคลื่อนที่ของปลาในพื้นที่ย่านอ่าวไทย ในช่วงกลางฤดูหนาว (ธันวาคม ถึง มกราคม) 12
2.5	พื้นที่ที่มีมาตรการจัดการทรัพยากรปลาของประเทศไทย 14
2.6	ปริมาณการจับปลาทุประมงพาณิชย์ รวมเครื่องมือประมงทั่วประเทศ (ฝั่งอันดามัน และฝั่งอ่าวไทย) ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 15
2.7	ปริมาณการจับปลาทุประมงพื้นบ้าน รวมเครื่องมือประมงทั่วประเทศ (ฝั่งอันดามัน และฝั่งอ่าวไทย) ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 16
2.8	ปริมาณการจับปลาทุประมงพาณิชย์ แหล่งประมงที่ 2 ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 17
2.9	ปริมาณการจับปลาทุประมงพื้นบ้าน แหล่งประมงที่ 2 ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 17
2.10	ปริมาณการจับปลาทุประมงพาณิชย์ แหล่งประมงที่ 2 จำแนกตามเครื่องมือประมง ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 18
2.11	ปริมาณการจับปลาทุประมงพื้นบ้าน แหล่งประมงที่ 2 จำแนกตามเครื่องมือประมง ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 19
2.12	ปริมาณการจับปลาทุประมงพาณิชย์ จำแนกตามรายเดือน ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 20
2.13	ปริมาณการจับปลาทุประมงพื้นบ้าน จำแนกตามรายเดือน ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 20
2.14	โครงสร้างโมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ 22
2.15	จำนวนบทความรวมถึงคำค้นหาต่าง ๆ บน webofknowledge.com ระหว่างปี 2001 ถึง 2020 30
2.16	แหล่งสู่มตัวอย่างน้ำ 18 แห่งในทะเลสาบอิชนิก ประเทศตุรกี 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และขโมยอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.17 แผนการปฏิบัติการทดสอบกระดาศกรองและปริมาตรตัวอย่างน้ำ เพื่อการพัฒนาวิธีการมาตรฐานสำหรับการเก็บตัวอย่างน้ำ	44
3.18 ลักษณะทางกายภาพของปลาซาบะ (<i>S. japonicus</i>) ปลาสีกุน (<i>S. leptolepis</i>) ปลาหางแข็ง (<i>M. cordyla</i>) ปลากะตัก (<i>S. indicus</i>) ปลาทรายแดง (<i>N. hexodon</i>) และปลาม้าลาย (<i>D. rerio</i>)	45
3.19 แผนการปฏิบัติการการออกแบบไพรเมอร์และทดสอบไพรเมอร์ เพื่อการพัฒนาวิธีการมาตรฐาน	47
3.20 แผนการปฏิบัติการตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อการพัฒนาวิธีการมาตรฐาน	48
3.21 จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณปากแม่น้ำแม่กลอง ตำบลแม่กลอง อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม	49
3.22 แผนการปฏิบัติการตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อการพัฒนาวิธีการมาตรฐาน	50
4.23 การเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการกรองตัวอย่างน้ำที่มีปริมาตรน้ำ และประเภทกระดาศกรองแตกต่างกัน	52
4.24 ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม Primer3 ที่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>COI</i> ในปลากลุ่มปลาทุทั้ง 3 ชนิดพันธุ์	56
4.25 ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม Primer3 ที่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>cytb</i> ในปลากลุ่มปลาทุทั้ง 3 ชนิดพันธุ์	57
4.26 การทำ gradient temperature เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของ ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่จากยีน <i>COI</i> และยีน <i>cytb</i> ทั้ง 4 คู่	59
4.27 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลากลุ่มปลาทุเทียบกับปลาชนิดอื่นๆ ที่นำมาตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่ จากยีน <i>COI</i> ด้วยวิธี Maximum likelihood	62
4.28 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลากลุ่มปลาทุเทียบกับปลาชนิดอื่นๆ ที่นำมาตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่ จากยีน <i>cytb</i> ด้วยวิธี Maximum likelihood	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ/หรืออ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.29 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่ 4 คู่	64
4.30 การทดสอบความไว (Sensitivity) ของไพรเมอร์จำเพาะกับกลุ่มปลาทุ	64
4.31 ผลการตรวจสอบพบ eDNA ของกลุ่มปลาทุ	65
4.32 ผลการตรวจพบ eDNA ของกลุ่มปลาทุ จากบริเวณปากแม่น้ำแม่กลอง จังหวัดสมุทรสงคราม ที่จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดที่ 1 2 และ 3 ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2564 ถึง เดือนเมษายน พ.ศ.2565.....	66



อักษรย่อและสัญลักษณ์

<i>COI</i>	Cytochrome c oxidase subunit 1 mitochondrial gene
<i>cytb</i>	Mitochondrial cytochrome b gene
DNA	Deoxyribonucleic acid
eDNA	Environmental DNA
ISSR	Inter simple sequence repeat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ppt	Part Per thousand
μg	Micrograms
μM	micrometer



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และเผยแพร่อย่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลาหู จัดเป็นอาหารยอดนิยมของคนไทยมาช้านาน เนื่องจากเป็นปลาทะเลที่สามารถจับได้มากในประเทศไทย คนทั่วไปสามารถหาซื้อรับประทานได้ง่าย และเป็นปลาที่มีรสชาติอร่อย มีคุณค่าทางโภชนาการสูง นอกจากนี้ปลาทูยังเป็นปลาเศรษฐกิจสำคัญของชุมชนชาวประมงที่กระจายอยู่ในเขตชายฝั่งของน่านน้ำทั้งฝั่งตะวันออก ตะวันตก และทางตอนใต้ของอ่าวไทย ที่มีการจับเพื่อจำหน่ายในประเทศและต่างประเทศ ทั้งในรูปแบบปลาทูสด ปลาทูหนึ่ง ปลาทูเค็ม และบรรจุกระป๋อง เป็นต้น ซึ่งสร้างรายได้อย่างมหาศาลในแต่ละปีให้กับประเทศไทย ในปัจจุบันพบว่าจำนวนปลาทูในน่านน้ำไทยได้ลดจำนวนลงอย่างมาก จากสถิติปริมาณการจับปลาทูจากธรรมชาติพบว่าในช่วง 10 ปี จะเห็นได้ว่าในระหว่างปี พ.ศ. 2556 – 2559 ประเทศไทยจับปลาทูได้ 71,318 – 146,476 ตัน (กรมประมง, 2558; กรมประมง, 2559; กรมประมง, 2560ก; กรมประมง, 2561ก) ส่วนปริมาณการจับปลาทูในปี พ.ศ. 2560 - 2565 มีแนวโน้มลดลงโดยมีปริมาณการจับปลาทูอยู่ที่ระหว่าง 17,654.90 – 48,828.279 ตัน (กรมประมง, 2562ก; กรมประมง, 2563ก; กรมประมง, 2564ก; กรมประมง, 2565ก; กรมประมง, 2565ข; กรมประมง, 2566ก) แสดงให้เห็นว่าในปัจจุบันประเทศไทยประสบวิกฤตการณ์ลดลงของจำนวนปลาทู ทำให้มีการนำเข้าปลาทูจากต่างประเทศ และส่งผลให้ปลาทูมีราคาสูงขึ้น

จากอดีตจนถึงปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาการแพร่กระจาย ความชุกชุมของกลุ่มปลาทูอย่างหลากหลายและต่อเนื่อง ทั้งการศึกษาเส้นทางการเดินทางของกลุ่มปลาทู ชีววิทยาของปลาทู ขนาดแรกสืบพันธุ์ ถูควางไข่และแหล่งวางไข่ เนื่องจากการแพร่กระจายของกลุ่มปลาทูมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาตามลักษณะภูมิศาสตร์ กระแสน้ำ แหล่งอาหารที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละปี ซึ่งงานวิจัยในด้านนี้ที่ผ่านมานั้นจำเป็นที่จะต้องอาศัยวิธีการตรวจสอบหาสิ่งมีชีวิตที่สนใจแบบดั้งเดิม คือการสังเกต และการดักจับสิ่งมีชีวิตเป้าหมายเพื่อทำการศึกษาในด้านต่าง ๆ แต่ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ช่วยศึกษาการแพร่กระจาย ความชุกชุมของสิ่งมีชีวิตทั้งชนิดพันธุ์ประจำถิ่น ชนิดพันธุ์รุกราน ชนิดพันธุ์หายาก หรือแม้แต่ชนิดพันธุ์ใกล้สูญพันธุ์ โดยอาศัยเทคนิค Environmental DNA (eDNA) ในการตรวจสอบหาเนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้เพียงตัวอย่างดีเอ็นเอ (เมือก มูล เกล็ด เป็นต้น) ของสิ่งมีชีวิตที่ทิ้งร่องรอยไว้ในแหล่งน้ำ และนำตัวอย่างน้ำนั้นมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอนุพันธุศาสตร์ ซึ่ง eDNA นั้นมีข้อได้เปรียบหลายประการเหนือวิธีการตรวจสอบหาสิ่งมีชีวิตแบบดั้งเดิมที่อาจเป็นเรื่องยาก ต้องใช้แรงงานมาก และใช้เวลาในการตรวจสอบหาสิ่งมีชีวิต ในขณะที่การตรวจสอบหาชนิดพันธุ์สิ่งมีชีวิตโดยใช้ eDNA มีความรวดเร็วมากกว่าวิธีดั้งเดิม และใช้กำลังคนในการศึกษาน้อย ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบที่สำคัญในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจหาสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่เป็นชนิดพันธุ์รุกราน และการเฝ้าติดตามสิ่งมีชีวิตใกล้สูญพันธุ์

ดังนั้น eDNA จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการมีอยู่และการอพยพของปลาไทยได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือในการดักจับปลา สามารถตรวจหาปลาได้แม้ในช่วงฤดูปิดอ่าว ไม่ต้องใช้แรงงานจำนวนมากในการสำรวจ และข้อมูลที่ได้มีความน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ยังเป็นเครื่องมือหรือวิธีทางเลือกในการสำรวจสมัยใหม่ ที่สามารถใช้เพื่อหาข้อมูลสำหรับเป็นแนวทางในการจัดการทรัพยากรปลาในประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

การศึกษาคั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบ Environmental DNA (eDNA) เพื่อหาวิธีมาตรฐานในการใช้เทคนิคการตรวจสอบ eDNA สำหรับการสำรวจกลุ่มปลาในธรรมชาติ เนื่องจากมีงานวิจัยหลากหลายงานที่นำเทคนิค eDNA มาใช้ในการตรวจสอบติดตามการมีอยู่ของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำที่เป็นทั้งชนิดพันธุ์หายาก ชนิดพันธุ์ใกล้สูญพันธุ์ ชนิดพันธุ์รุกราน และชนิดพันธุ์ประจำถิ่น ดังนั้นเพื่อนำเทคนิค eDNA มาใช้ตรวจหาปลาในธรรมชาติของประเทศไทยจึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการพัฒนาเทคนิคดังกล่าวให้มีความเหมาะสมเพื่อนำเทคนิค eDNA ไปใช้ในการตรวจสอบติดตามการมีอยู่ของปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

1.3 สมมติฐานของการศึกษา

ในการศึกษาคั้งนี้มีการตั้งสมมติฐานในขั้นตอนการพัฒนาเทคนิค Environmental DNA ไว้ดังนี้

- 1 กระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุนระดับกลาง (Membrane Filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร) สามารถกรองน้ำด้วยเวลาที่น้อยที่สุดที่ยังได้ประมาณดีเอ็นเอเพียงพอต่อการนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป
- 2 ปริมาณน้ำที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา Environmental DNA ของปลาในระดับห้องปฏิบัติการคือ 1 ลิตร
- 3 ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาใหม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของตัวอย่างเนื้อเยื่อปลาได้เท่ากัน

1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

ปัจจุบันเทคนิค Environmental DNA เป็นที่นิยมนำมาใช้ศึกษาทำงานวิจัยเกี่ยวกับการแพร่กระจาย ความชุกชุม ติดตามสำรวจตรวจหาสิ่งมีชีวิตที่เป็นทั้งชนิดพันธุ์หายาก ชนิดพันธุ์ใกล้สูญ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หาย ชนิดพันธุ์ประจำถิ่น และชนิดพันธุ์รุกรานอย่างหลากหลาย เนื่องจาก eDNA นั้นเป็นเทคนิคที่ใช้เพียงดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ทิ้งร่องรอยไว้ในสิ่งแวดล้อม (แหล่งน้ำจืด, น้ำกร่อย, น้ำทะเล, พื้นดิน และอากาศ) ซึ่งเป็นการนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เก็บได้นั้นมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ เทคนิค eDNA นั้นมีข้อได้เปรียบหลายประการเหนือวิธีการตรวจหาสิ่งมีชีวิตแบบดั้งเดิม (การสังเกต และการดักจับสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย) ที่เป็นเรื่องยาก ใช้เวลานาน และต้องใช้แรงงานมาก การตรวจจับ eDNA ใช้กำลังคนในการดำเนินการน้อย และมีความรวดเร็วมากกว่าวิธีดั้งเดิม (Takahara *et al.*, 2013) โดยการใช้เทคนิค eDNA เป็นการศึกษาที่ต้องทำการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อมาทำการกรองผ่านกระดาษกรองตัวอย่างน้ำ ซึ่งในขั้นตอนการกรองตัวอย่างน้ำในแต่ละงานวิจัยมีการใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำ ประเภท และชนิดของกระดาษกรองที่แตกต่างกันตามความเหมาะสมของงานวิจัยนั้น ๆ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จำเป็นต้องมีการทดสอบในเรื่องของปริมาณน้ำ ประเภทและชนิดของกระดาษกรองเป็นอันดับแรกเพื่อให้ได้วิธีมาตรฐานก่อนนำไปใช้ในภาคสนามเป็นลำดับต่อไป เนื่องจากปริมาณตัวอย่างน้ำ และประเภท ชนิดของกระดาษกรองเป็นปัจจัยที่สำคัญในการดักจับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ปล่อยสู่แหล่งน้ำ

1.5 ขอบเขตการวิจัย

1 การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาการพัฒนาเทคนิค eDNA เพื่อเป็นเครื่องมือในการตรวจหากลุ่มปลาในธรรมชาติบริเวณอ่าวไทย ซึ่งได้ทำการศึกษาหาวิธีมาตรฐาน โดยการทดสอบหาประเภทและขนาดรูพรุนของกระดาษกรอง ระยะเวลาที่ใช้ในการกรองตัวอย่าง ปริมาณตัวอย่างน้ำที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำที่เหมาะสม และการออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับกลุ่มปลาเท่านั้น

2 การศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นการนำวิธีมาตรฐานการตรวจวัด eDNA มาใช้ทดลองตรวจสอบการมีอยู่ของปลา เพื่อยืนยันว่าวิธีมาตรฐานสามารถตรวจสอบการมีอยู่ของปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติได้จริง โดยทำการใส่กลุ่มปลาลงในถังเลี้ยงที่มีน้ำทะเล 30 ลิตร 3 ถัง ถังละ 3 ตัว และทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากถังน้ำจำนวน 100 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร 1 ลิตร 2 ลิตร และ 5 ลิตรที่เวลา 10 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ หลังจากใส่ปลาลงในถังน้ำทะเล และนำตัวอย่างน้ำทะเลที่ได้มายังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการกรองน้ำและศึกษาโดยอาศัยขั้นตอนที่ได้จากวิธีมาตรฐาน

3 ขอบเขตพื้นที่การศึกษาคือการตรวจหากลุ่มปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติภาคสนามคือชายฝั่งบริเวณปากแม่น้ำแม่กลอง จังหวัดสมุทรสงคราม ซึ่งเป็นแหล่งอาศัยหลักของปลาในประเทศไทย โดยมีระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างน้ำตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2564 ถึงเดือนเมษายน 2565 เก็บตัวอย่างน้ำเดือน 2 ครั้ง ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างด้วยกัน 3 จุด จุดละ 3 ชั่วโมง และนำมายังห้องปฏิบัติการ

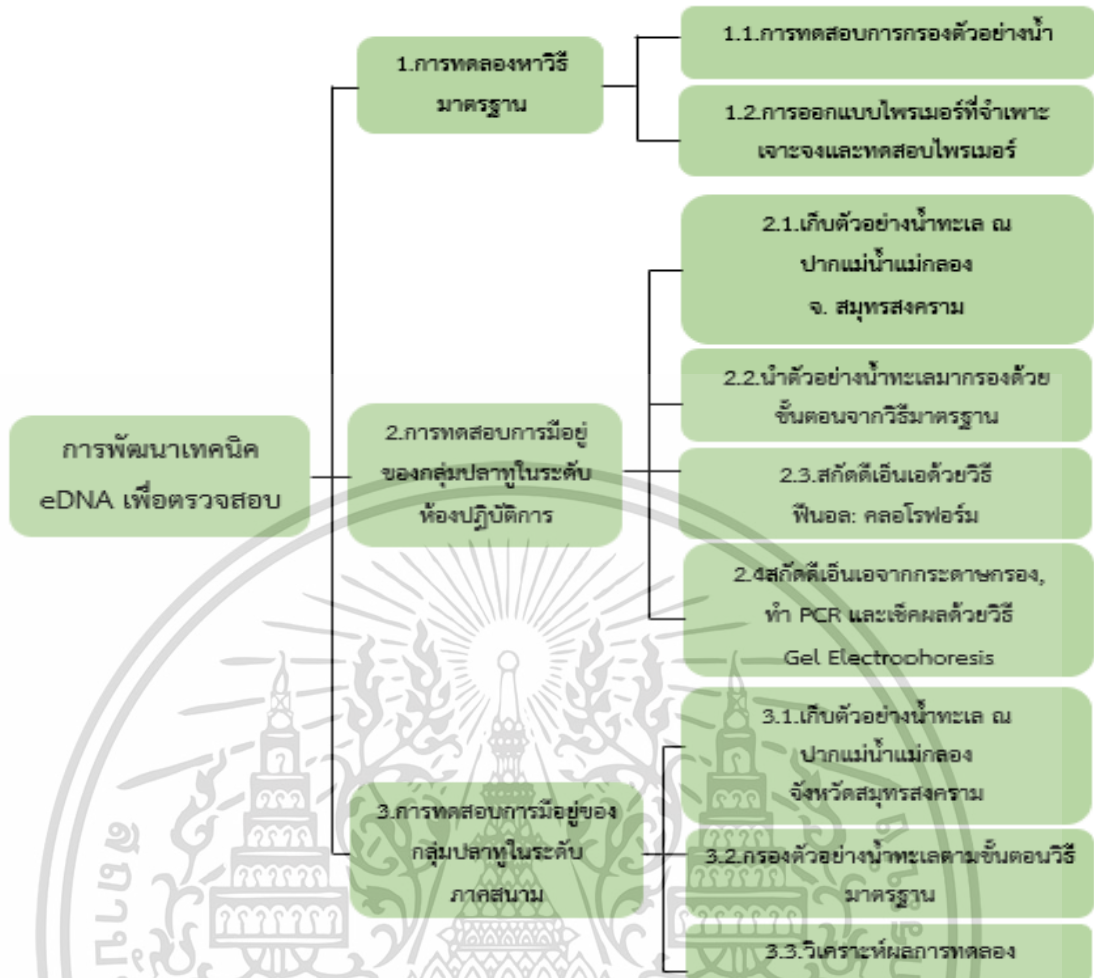
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อการกรองตัวอย่างน้ำและปฏิบัติขั้นตอนต่าง ๆ ตามวิธีมาตรฐานและการทดสอบจากห้องปฏิบัติการต่อไป

1.6 ขั้นตอนของการศึกษา

การศึกษาการพัฒนาเทคนิค Environmental DNA เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุในธรรมชาติบริเวณอ่าวไทยได้แบ่งทำการทดสอบออกเป็น 3 ขั้นตอนคือการทดลองหาวิธีการมาตรฐานนำวิธีการที่ได้ทดสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุในระดับห้องปฏิบัติการ และการทดสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุในระดับภาคสนาม ดังรูปที่ 1.1 โดยในขั้นตอนที่ 1 นั้นได้ทำการศึกษาประเภทกระดากกรองและขนาดรูพรุนของกระดากกรองเพื่อให้ได้กระดากกรองที่มีประสิทธิภาพ และใช้เวลาในการกรองที่น้อยที่สุดเพื่อลดเวลาในการทำงานในขั้นตอนการกรองตัวอย่างน้ำ โดยนำกระดาก 3 ประเภทมาทดสอบการกรองตัวอย่างน้ำที่ปริมาตรต่างกันและทำการจับเวลาเพื่อทดสอบหากระดากกรองที่มีประสิทธิภาพที่เหมาะสมกับการศึกษาในครั้งนี้ นอกจากนี้ยังได้ทำการออกแบบไพรมอร์และทดสอบไพรมอร์เพื่อให้ได้ไพรมอร์ที่มีความจำเพาะกับกลุ่มปลาทุเพียงกลุ่มเดียวเท่านั้น เมื่อได้ไพรมอร์ที่มีความจำเพาะ และขั้นตอนการกรองตัวอย่างน้ำแล้ว ขั้นตอนที่ 2 ได้ทดลองนำวิธีการที่ได้นั้นมาตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับห้องปฏิบัติการ ที่สามารถยืนยันได้ว่ามีปลาทุอยู่ในแหล่งน้ำจริงเพื่อยืนยันวิธีมาตรฐานที่สามารถนำมาใช้ศึกษา ตรวจสอบ และสำรวจการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุในธรรมชาติต่อไป โดยจับปลาทุที่มีชีวิตจากการตกเบ็ดในแหล่งน้ำธรรมชาติใต้อ่าวน้ำทะเล จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำทะเลในถังไปตรวจสอบ เมื่อได้วิธีมาตรฐานที่สามารถนำมาทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการแล้วนั้น ต่อในขั้นตอนที่ 3 การทดสอบภาคสนามเป็นการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจากแหล่งธรรมชาติบริเวณปากแม่น้ำแม่กลอง จังหวัดสมุทรสงคราม ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเล 3 จุด จุดละ 3 ชั่วโมง ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลเป็นเวลา 6 เดือน (เดือนพฤศจิกายน 2564 ถึง เดือนเมษายน 2565) เดือนละ 2 ครั้ง หลังจากเก็บตัวอย่างน้ำทะเลแล้วนั้นทำการปฏิบัติตามขั้นตอนวิธีมาตรฐานข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.1 แผนผังขั้นตอนการศึกษาการพัฒนาเทคนิค Environmental DNA เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาในธรรมชาติบริเวณอ่าวไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปลา *Rastrelliger spp.*

ปลา เป็นสัตว์น้ำที่จัดอยู่ในไฟลัม Chordata โดยจัดอยู่ในกลุ่มที่มีกระดูกสันหลัง (Vertebrate) ในกลุ่มครอบครัว Scombridae จัดอยู่ในสกุล *Rastrelliger* ซึ่งในสกุลนี้ในประเทศไทยพบมากอยู่ 3 ชนิด (รูปที่ 2) คือ ปลาทูสั้น (*Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851)) ปลาลัง (*R. kanagurta* (Cuvier 1817)) และปลาทูปากจิ้งจก (*R. Faughnii* (Matsui, 1967)) โดยจากรายงานเรื่อง โครงการบูรณาการฐานข้อมูลและองค์ความรู้ปัจจุบันด้านสถานการณ์และปัญหาของทรัพยากรปลาในอ่าวไทยเพื่อการบริหารจัดการประมงอย่างยั่งยืน (คณะประมงมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2563) ปลาที่พบมากทางอ่าวไทย คือ ปลาทูสั้น และปลาลัง

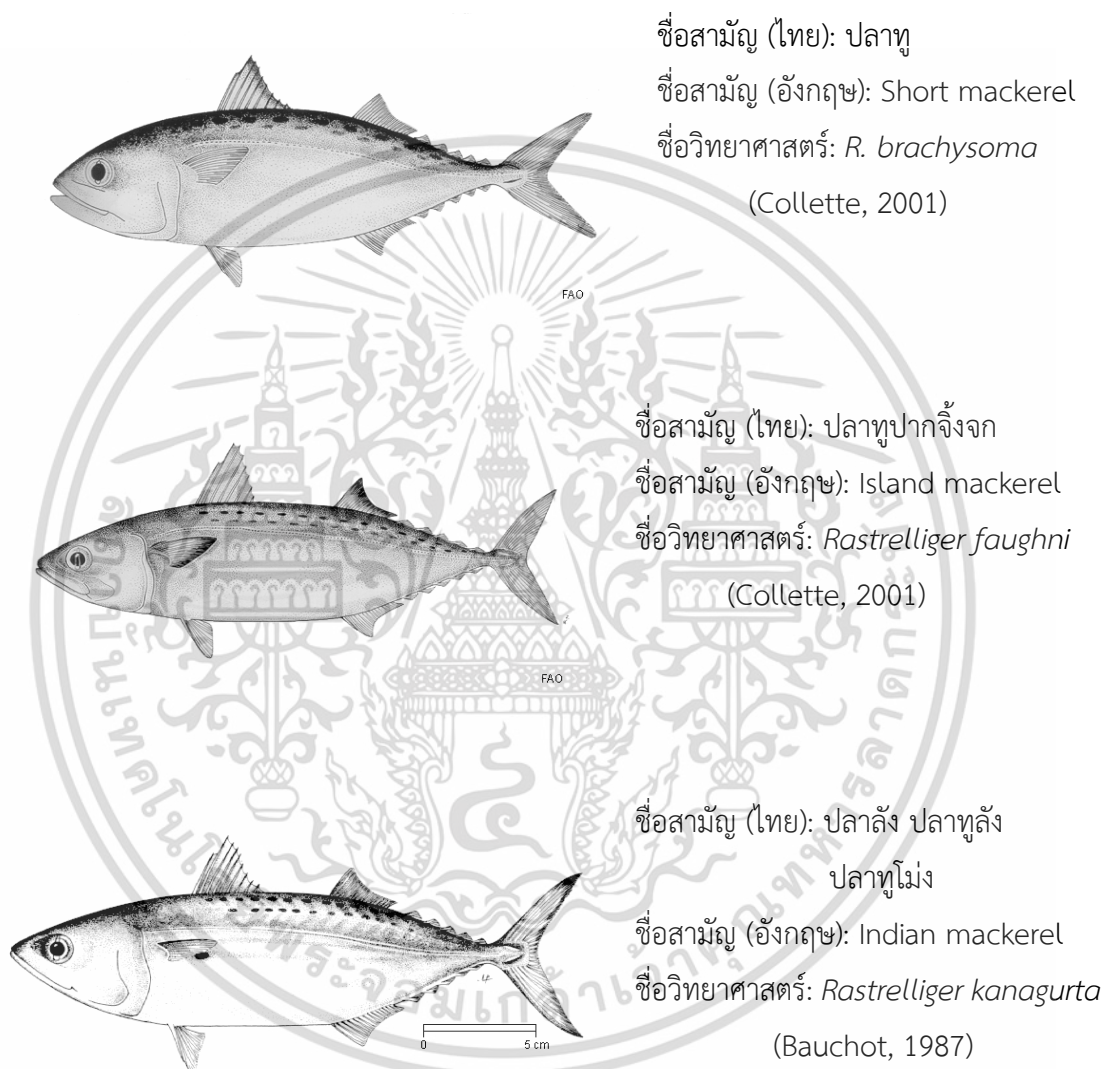
ปลาทู (Mackerel) เป็นปลาผิวน้ำ อยู่รวมกันเป็นฝูงบริเวณใกล้ฝั่งที่ความลึกไม่เกิน 30 เมตร พบเฉพาะบริเวณอุณหภูมิผิวน้ำไม่ต่ำกว่า 17 องศาเซลเซียส ความเค็มของน้ำไม่เกิน 32.5 ppt และสามารถอยู่ได้ในความเค็มที่ 20.4 ppt จึงพบปลาทูในบริเวณน้ำกร่อยได้ ปลาทูมีการวางไข่แบบไข่ลอยน้ำ ปลาทูกินแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหารหลัก (สุนีย์ สุทธิพันธ์ และอำพัน เหลือสินทรัพย์, 2508) สามารถพบปลาทูได้ในทะเลเขตร้อนโดยเฉพาะแถบน่านน้ำอินโดแปซิฟิก ได้แก่ น่านน้ำประเทศพม่า มาเลเซีย อินโดนีเซีย กัมพูชา ฟิลิปปินส์ และไทย ซึ่งในน่านน้ำไทยสามารถพบปลาทูได้ทั้งบริเวณฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามัน

ปลาทูสั้น (*R. brachysoma* (Bleeker, 1851)) มีรูปร่างป้อมแบน หัวโต หน้าแหลม ม่านตาเป็นเยื่อไขมัน ปากกว้างและเฉียงขึ้นเล็กน้อยขากรรไกรล่างยาวและมีปลายงุ้มมน เก็ดเล็กและหลุดง่าย ครีบหลังมี 2 ครีบ ครีบฝอย 5 ครีบ ครีบอกมีฐานกว้าง ครีบท้องและครีบกันมีขนาดเล็กอย่างละ 1 ครีบ ครีบหางเป็นแฉกเล็ก ซี่เหงือก (gill filament) แผ่ออกคล้ายพู่ขนนก แขนเหงือก (gill raker) ยาวเห็นได้ชัดเมื่อปากเปิด มีจำนวน 30 - 48 อัน บนกระดูกเหงือก (gill arch) อันแรก ลำตัวมีสีน้ำเงินแกมเขียว มีจุดสีดำเรียงเป็นแถวตามสันหลัง ท้องเป็นสีขาวเงินและหางมีสีเหลืองยาวถึงส่วนหยักเล็กของหาง (fork length) โดยทั่วไปปลาทูที่อยู่ในช่วงโตเต็มวัยมีขนาดระหว่าง 15 - 20 เซนติเมตร ขนาดแรกสืบพันธุ์ 16 เซนติเมตร (Carpenter and Niem, 2001)

ปลาลัง (*R. kanagurta* (Cuvier, 1817)) ลำตัวมีความลึกปานกลาง และมีความยาวมากกว่าปลาทู มีสีเทาเข้ม พบแถบน้ำตาลหรือสีเหลืองตามแนวยาวของลำตัว ส่วนหัวมีความยาวมากกว่าความลึกของลำตัว มีปลายงุ้มแหลม ส่วนปลายของครีบหาง ครีบอก และครีบหลังมีสีเหลือง ครีบอื่น ๆ จะมีสีเทา (ปวันรัตน์ บัวโรย และคณะ, 2557) เมื่อโตเต็มวัยมีขนาดยาวประมาณ 20 - 25 เซนติเมตร ซึ่งมีขนาดตัวใหญ่กว่าปลาทูสั้น และมีขนาดใหญ่ที่สุดในกลุ่มปลาทูทั้ง 3 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลาหูปากจิ้งจก (*R. faughnii* (Matsui, 1967)) มีรูปร่างทั่วไปคล้ายกับปลาลัง (*R. kanagurta*) แต่มีความยาวของตัวเต็มวัยใกล้เคียงกับปลาหูสั้น (*R. brachysoma*) คือ มีความยาวประมาณ 15 – 20 เซนติเมตร มีรูปร่างผอมบางกว่าปลาหูสั้น และปลาลังมีปากแหลม ส่วนหัวยาวกว่าความกว้างลำตัว มีจุดสีดำหลังฐานครีบอก บริเวณท้องมีสีเงินอมเหลือง มีจุดขนาดใหญ่ 2 – 6 จุด อยู่ที่ฐานครีบอกหลังและมีแถบสีจาง ๆ อยู่ที่ระดับเส้นข้างลำตัว (Collette, 1983) (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 ลักษณะภายนอกของปลาในสกุล *Rastrelliger* spp.

ที่มา: Carpenter and Niem (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 เส้นทางการอพยพของปลาทูในอ่าวไทย (*Rastrelliger spp.*)

ปลาทูเป็นปลาที่มีการอพยพย้ายถิ่นเพื่อหาอาหารและแพร่พันธุ์ และในน่านน้ำไทยก็พบปลาทูอยู่หลายกลุ่มจากการศึกษาหลายด้านไม่ว่าจะเป็นการติดเครื่องหมายเพื่อดูเส้นทางการอพยพ การใช้ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ประชากร และการสำรวจช่วงอายุของสัตว์น้ำในแต่ละพื้นที่ของอ่าวไทยตลอดทั้งปี ทำให้ทราบว่าประชากรของปลาทูสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มอ่าวไทยฝั่งตะวันตก กลุ่มอ่าวไทยฝั่งตะวันออก กลุ่มอ่าวไทยตอนใต้ และกลุ่มฝั่งทะเลอันดามัน

การศึกษากลุ่มประชากรปลาทูของ ดำริห์ สมใจวงศ์ (2523) ที่ทดลองติดเครื่องหมายปลาทูปล่อยลงทะเลในอ่าวไทย พบว่าปลาทูสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มประชากรใหญ่ คือ กลุ่มที่มีการอพยพไปมาระหว่างชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยกับน่านน้ำประเทศกัมพูชา และกลุ่มที่มีการอพยพระหว่างอ่าวไทยตอนบนและอ่าวไทยตอนล่าง แต่ยังไม่มียืนยันการจับกลุ่มประชากรทางพันธุกรรมที่ชัดเจน จนกระทั่งมีการศึกษาของ อธิระรัตน์ ศรีนวลกราย และคณะ (2552) ที่จัดกลุ่มประชากรปลาทูโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Inter simple sequence repeat (ISSR) พบว่าปลาทูในน่านน้ำไทยมีอย่างน้อย 3 กลุ่มประชากรที่แยกออกจากกันอย่างชัดเจน ได้แก่ ประชากรกลุ่มอ่าวไทยตอนบน กลุ่มอ่าวไทยตอนล่าง และกลุ่มฝั่งทะเลอันดามัน และพบความสัมพันธ์ระหว่างทางความห่างทางพันธุกรรมกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ของแต่ละประชากร แต่เนื่องจากการศึกษานี้เลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการแสดงออกแบบ dominant และไม่จำเพาะกับตำแหน่งใด ๆ บนจีโนม ดังนั้นข้อมูลที่ได้ทางพันธุกรรมจึงมีรายละเอียดค่อนข้างน้อย ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรนิยมใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงออกแบบ co-dominant เช่นเดียวกับงานวิจัยของ สิริธร กิ่งเส็ง และคณะ (2559) ที่ทำการศึกษาโครงสร้างประชากรธรรมชาติของปลาทูที่ถูกทำการประมงในพื้นที่อ่าวไทยตอนบน จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทิร์นไลท์ พบว่าปลาจากพื้นที่ดังกล่าวมีการแบ่งกลุ่มทางพันธุกรรมออกเป็น 2 กลุ่มประชากร และยังพบว่าปลาทูกลุ่มประชากรที่หนึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าปลาทูกลุ่มประชากรที่สอง ข้อมูลนี้ทำให้เชื่อได้ว่าปลาทูกลุ่มประชากรที่หนึ่งน่าจะมีขนาดประชากรเล็กกว่าปลาทูกลุ่มประชากรที่สอง ซึ่งตรงกันข้ามกับผลการแยกกลุ่มพันธุกรรมของปลาทู ซึ่งชี้ให้เห็นว่าผลผลิตการทำประมงในบริเวณอ่าวไทยตอนบนมาจากกลุ่มประชากรที่หนึ่งมากกว่าประชากรที่สอง อีกทั้งปลาทูทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกันในระดับปานกลาง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปลาทูที่ถูกทำการประมงในบริเวณอ่าวไทยตอนบนมีการถ่ายเทยีนระหว่างกลุ่มประชากรในระดับที่ค่อนข้างต่ำ เป็นไปได้ว่าปลาทูแต่ละกลุ่มประชากรมีแหล่งผสมพันธุ์แยกจากกัน และเป็นไปได้มากกว่าภายในแต่ละกลุ่มประชากรมีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อย นอกจากนี้จำนวนปลาทูที่จับได้จากสองกลุ่มประชากรมีความแตกต่างกันในแต่ละเดือนที่ทำการศึกษา โดยในเดือนมกราคม ถึงเดือนมิถุนายน และเดือนสิงหาคม ปลาทูที่ได้จากการทำประมงเกือบทั้งหมดในอ่าวไทยตอนบนมาจากประชากรที่หนึ่ง ส่วนในเดือนกรกฎาคม และเดือนกันยายน ปลาทูเกือบทั้งหมดมาจากปลาทูกลุ่มประชากรที่สอง จากการที่สัดส่วนประชากรปลาทู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันไปในแต่ละเดือน แสดงให้เห็นว่าปลาทุทั้งสองกลุ่มประชากรมีการอพยพที่แตกต่างกันในพื้นที่อ่าวไทยตอนบน ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยเมื่อพิจารณาแต่ละจุดเก็บตัวอย่างในแต่ละเดือนพบว่า ปลาทุในระยะตัวเต็มวัยของกลุ่มประชากรแรกใช้พื้นที่กระจายทั่วทั้งอ่าวไทยตอนบนเป็นแหล่งอาศัยเกือบตลอดปี ในขณะที่ปลาทุตัวเต็มวัยจากกลุ่มประชากรที่สองมีการอพยพเข้ามาในพื้นที่ดังกล่าวเพียงระยะเวลาสั้น ๆ ในครึ่งปีหลัง โดยใช้พื้นที่กระจายทั่วทั้งอ่าวไทยตอนบนเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลก่อนหน้านี้ที่เชื่อว่าปลาทุในอ่าวไทยแบ่งสองกลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีการอพยพไปมาระหว่างชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย กับน่านน้ำประเทศกัมพูชา และกลุ่มที่มีการอพยพระหว่างอ่าวไทยตอนบนและอ่าวไทยตอนล่าง (ดาร์ธี สมใจวงศ์, 2523) จากนั้น Kongseng *et al.* (2020a) ได้วิเคราะห์สต็อก ของปลาทุในอ่าวไทยตอนในและตะวันออก (mixed-stock analysis) รวมถึงศึกษาพฤติกรรมการอพยพข้ามแหล่งประมง โดยอ้างอิงจากตำแหน่งไมโครแซทเทิร์นไลท์ โดยมีการใช้พื้นที่วางไข่ 5 แห่ง (จังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดตราด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี และจังหวัดปัตตานี) พบว่าปลาทุทั้งหมดมีค่าสัมประสิทธิ์การผสมพันธุ์ที่สูงมาก บ่งชี้ถึงการผสมพันธุ์ภายในประชากรในระดับปานกลาง อย่างไรก็ตาม ยังพบว่ามีเฮเทอโรไซโกซิตีสูงมากเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประชากรปลาทุมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ซึ่งเป็นไปได้ว่าแหล่งวางไข่แต่ละแห่งสามารถเป็นที่อยู่อาศัยของปลาทุประชากรย่อยจำนวนหนึ่งสำหรับผสมพันธุ์ เนื่องจากสามารถพบตัวอ่อนและปลาทุที่มีไข่ในบริเวณที่วางไข่ได้เกือบตลอดทั้งปี และเมื่อพิจารณาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรพบว่าประชากรปลาทุที่ทำการศึกษาทั้งหมดมีความแตกต่างทางพันธุกรรม และพบการถ่ายเทยีนในระดับสูงของประชากรปลาทุตามพฤติกรรมการย้ายถิ่นทำให้เกิดโครงสร้างประชากรปลาทุในอ่าวไทย ระหว่างประชากรกลุ่มสมุทรสงครามกับประชากรตราด และระหว่างประชากรกลุ่มสุราษฎร์ธานีกับประชากรกลุ่มปัตตานี อีกทั้งยังมีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับต่ำ ในประชากรประจวบคีรีขันธ์พบมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรอื่น ๆ ในระดับที่สูงและมีการถ่ายเทยีนในระดับต่ำ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kongseng *et al.* (2021b) ที่ช่วยยืนยันได้ว่าประชากรปลาทุกลุ่มประจวบคีรีขันธ์มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำที่สุด และอาจมีขนาดประชากรเล็กกว่าประชากรกลุ่มอื่น ๆ ในบริเวณอ่าวไทย อีกทั้งในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษากลุ่มประชากรจากกัมพูชา เวียดนาม และกลุ่มมาเลเซียที่อยู่บริเวณอ่าวไทย เพื่อให้การศึกษานี้ครอบคลุมยิ่งขึ้น ซึ่งได้ชี้ให้เห็นว่าประชากรกลุ่มปัตตานี กลุ่มกัมพูชา กลุ่มเวียดนาม และกลุ่มมาเลเซียมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันอย่างมาก และยังมีมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับประชากรกลุ่มสุราษฎร์ธานี กลุ่มตราด และกลุ่มสมุทรสงคราม นอกจากนี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ในระดับต่ำถึงระดับปานกลางระหว่างประชากรกลุ่มสุราษฎร์ธานี กลุ่มปัตตานี กลุ่มกัมพูชา กลุ่มเวียดนาม และกลุ่มมาเลเซีย ดังนั้นจึงคาดว่าน่าจะมีการถ่ายเทยีนในระดับปานกลางถึงระดับสูงและอาจมีการย้ายถิ่นข้ามพรมแดนระหว่างประชากรปลาทุสั้น จากข้อมูลการอพยพของปลาทุดังที่กล่าวสามารถนำมาใช้ในการจัดการทรัพยากรปลาทุ เช่นการปิดอ่าวในฤดูวางไข่ เพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรปลาทุอย่างยั่งยืนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสำรวจเรื่องการอพยพของปลาหูในอ่าวไทยล่าสุด จากรายงานเรื่องบูรณาการฐานข้อมูลและองค์ความรู้ปัจจุบันด้านสถานการณ์และปัญหาของทรัพยากรปลาหูในอ่าวไทยเพื่อการบริหารจัดการประมงอย่างยั่งยืน (คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2563) พบว่า เส้นทางปลาหูในช่วงฤดูฝนของอ่าวไทย (ลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้) ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนกรกฎาคม ลมและมวลน้ำมีการเปลี่ยนทิศอย่างชัดเจน มวลน้ำหลักในแนวอ่าวไทยฝั่งตะวันตก จะไหลในทิศทางขึ้นเหนือ ทำให้ปลาหูขนาดเล็กที่เจริญพันธุ์มาจากบริเวณอ่าวไทยตอนบน รวมทั้งประชากรปลาบางส่วนที่อาจมาจากอ่าวไทยฝั่งตะวันออก จะว่ายน้ำสวนทางกระแสน้ำลงมาทางทิศใต้ในแนวกลางอ่าว (รูปที่ 2.3ก) เมื่อฝูงปลาหูเหล่านั้นเคลื่อนที่มาถึงแนวกลางของเขตจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดชุมพร เส้นทางเคลื่อนที่ของฝูงสามารถแยกออกได้เป็น 2 เส้นทาง ตามลักษณะของกระแสน้ำที่เปลี่ยนแปลงไป โดยกลุ่มแรกเคลื่อนที่เข้าไปทางเขตใกล้ชายฝั่งตะวันตกของพื้นที่อ่าวไทย แนวทะเลของเขตจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดชุมพร (รูปที่ 2.3ข) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะอากาศ และอุณหภูมิในพื้นน้ำที่ใกล้ฝั่งที่ต้องไม่สูงเกินไป ในระหว่างการเดินทางเคลื่อนที่ปลาหูจะมีการเจริญเติบโตขึ้นจากขนาดเล็กกลายเป็นปลาสาวรุ่น ซึ่งพบว่ากลุ่มปลาหูที่เข้าฝั่งแนวจังหวัดชุมพรมักเป็นปลาสาวรุ่นที่มีขนาด 14 – 15 เซนติเมตร สามารถพบได้ประมาณช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมีนาคม) กลุ่มปลาหูสาวอีกกลุ่มที่เคลื่อนที่เรื่อยลงไปถึงทางตอนเหนือของหมู่เกาะอ่างทองนั้น (รูปที่ 2.3ค) จะเคลื่อนที่ต่อไปทางทิศตะวันตกเฉียงใต้ของหมู่เกาะโดยว่ายโอบไปทางเหนือของอ่าวบ้านดอน แล้วเลาะเข้าอ่าวไทยฝั่งตะวันตก ในพื้นที่เขตจังหวัดชุมพร (รูปที่ 2.3ง) จากนั้นจะว่ายขึ้นไปทางทิศเหนือเลาะฝั่งขึ้นไปเรื่อย ๆ กลุ่มประชากรปลาหูสาวที่เดินทางลงไปทางตอนเหนือของหมู่เกาะพะงัน สามารถเจริญพันธุ์ถึงระยะไข่แก่ และมีการปล่อยไข่ได้ในบริเวณเหนือแนวหมู่เกาะ เนื่องจากเป็นเขตทะเลที่มีลักษณะการเคลื่อนตัวของกระแสน้ำที่จำเพาะ โดยมวลน้ำมีการเคลื่อนที่หมุนวนคล้ายเป็นวงขนาดใหญ่ มีการกระจายของตะกอนอินทรีย์ในน้ำที่อุดมสมบูรณ์กว่าพื้นที่ตอนนอก จึงสามารถเป็นแหล่งหากินที่ดี และเป็นแหล่งกำเนิดของลูกปลาหูขนาดเล็กต่อไปได้ ฝูงลูกปลาหูขนาดเล็กที่สามารถว่ายน้ำทวนน้ำได้เองแล้วจะสามารถเคลื่อนฝูงว่ายน้ำทวนน้ำเข้าไปแนวใกล้ฝั่งตะวันตกของอ่าวไทย โดยลัดเลาะขึ้นไปบริเวณพื้นที่ตอนล่างของชุมพร โดยเฉพาะตั้งแต่ทะเลเขตอำเภอละแม (รูปที่ 2.3ง) และว่ายน้ำเลาะฝั่งขึ้นไปทางทิศเหนือได้เรื่อย ๆ และสามารถเจริญเติบโตในพื้นที่ใกล้ฝั่งได้ดี อีกทั้งไม่พบการรวมของฝูงปลาหูที่ชัดเจนในช่วงเดือนสิงหาคมและเดือนกันยายน



รูปที่ 2.3 เส้นทางการเคลื่อนที่ของปลาทุในพื้นทีอ่าวไทย ช่วงต้นฤดูฝนถึงกลางฤดูฝน (มิถุนายน ถึง กรกฎาคม)

ที่มา: ดัดแปลงจาก คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2563)

เส้นทางปลาทุในช่วงฤดูหนาวของอ่าวไทย (ลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ) ในช่วงประมาณเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมกราคม ฝูงปลาทุในพื้นที่อ่าวไทยฝั่งตะวันตกจะมีทิศทางชัดเจนขึ้น โดยว่ายน้ำขึ้นมาทางทิศเหนือ (รูปที่ 2.4ก) ผ่านทางจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดเพชรบุรี มุ่งหน้าขึ้นไปสู่พื้นที่อ่าวไทยตอนใน (รูปที่ 2.4ข) ในช่วงลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ ในเวลาดังกล่าว มีกระแสน้ำทางตอนนอกที่ไหลวนมาจากทางทิศเหนือของอ่าวไทยตอนกลาง ไหลทวนเข็มนาฬิกาเข้ามาทางฝั่งตะวันตกของอ่าวไทย ทำให้ประชากรปลาทุส่วนหนึ่งอาจเคลื่อนฝูงว่ายน้ำทวนน้ำไปทางทิศตะวันออก (รูปที่ 2.4ค) ก่อนจะเข้าพื้นที่อ่าวไทยตอนในได้ นอกจากนี้ประชากรปลาทุในกลุ่มแรก ที่เจอกับมวลน้ำเสียที่ไหลลงมาจากอ่าวไทย ตอนในช่วงนี้ ก็มักจะไม่ว่ายเข้าสู่อ่าวไทยตอนใน และเคลื่อนประชากรออกไปสู่ทะเลตอนนอกมากขึ้น ซึ่งประชากรในภาพรวมจะเคลื่อนไปสู่บริเวณอ่าวไทยตอนกลาง และเจริญเติบโตในพื้นที่นั้นต่อไปได้ ปลาทุสาวที่เข้าใกล้ฝั่งจากแนวจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ แล้วว่ายขึ้นทางทิศเหนือไปสู่อ่าวไทยตอนในจะใช้เวลาประมาณ 2 – 3 เดือน ซึ่งจะทำให้ปลาทุสาวมีการเจริญพันธุ์จากขนาดประมาณ 14 – 15 เซนติเมตร ไปเป็นขนาด 17 – 20 เซนติเมตร (รูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข) ซึ่งนับเป็นระยะแรกสืบพันธุ์ของปลาหู ในช่วงดังกล่าว ไข่ของปลาหูที่พัฒนาในท้องปลานั้น สามารถพัฒนาจากระยะที่ 2 ไปสู่ระยะที่ไข่สมบูรณ์ขึ้นในระยะที่ 3 - 4 ที่พร้อมจะปล่อยไข่ในพื้นที่ อ่าวไทยตอนในได้ หากในพื้นที่นั้นมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม



รูปที่ 2.4 เส้นทางเคลื่อนที่ของปลาหูในพื้นที่อ่าวไทย ในช่วงกลางฤดูหนาว (ธันวาคม ถึง มกราคม)

ที่มา: ดัดแปลงจาก คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2563)

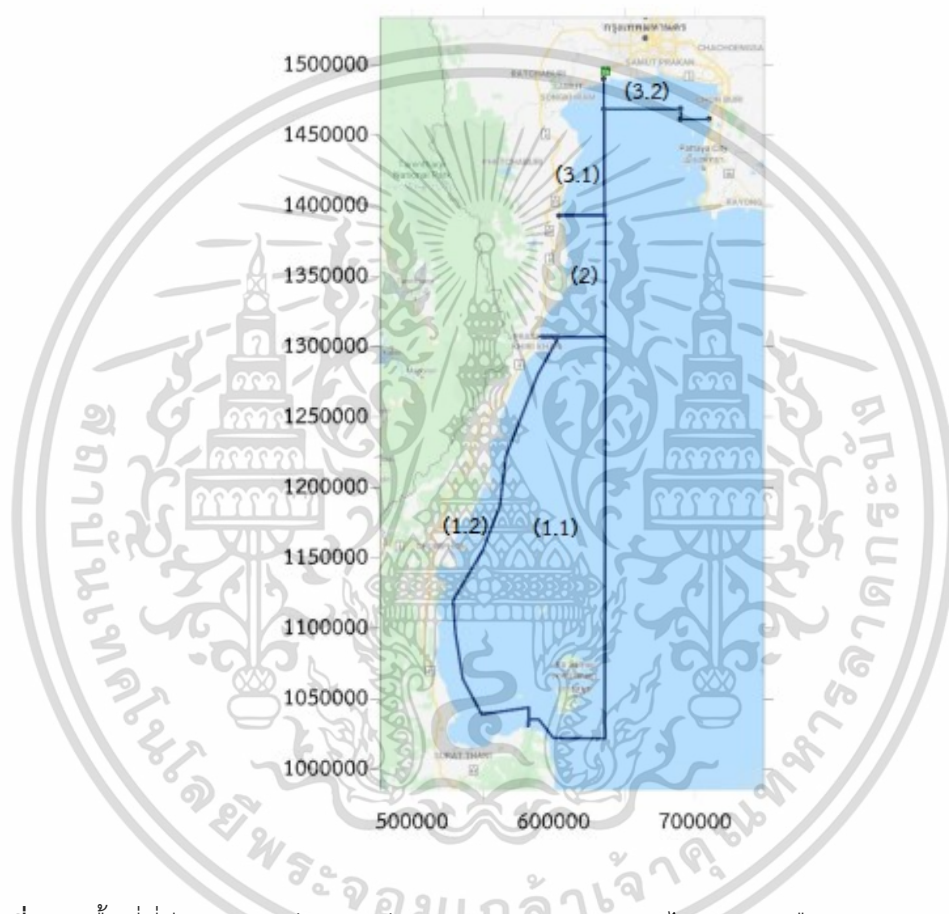
สำหรับพื้นที่และช่วงเวลาที่ปลาหูพร้อมที่จะปล่อยไข่นั้น ปลาหูขนาดใหญ่ ที่มีความสมบูรณ์เพศที่พร้อมจะปล่อยไข่ (ไข่ระยะที่ 3 - 4) โดยเฉพาะปลาหูตัวเมียที่มีขนาดใหญ่กว่า 18 เซนติเมตร สามารถพบได้ในแหล่งทำประมงบริเวณตอนกลางของอ่าวไทยตอนใน ช่วงเดือนธันวาคม ถึงเดือนมกราคม นอกจากนี้ ยังสามารถพบปลาหูขนาดใหญ่ที่มีไข่แก่ได้ในเขตทะเลทางใต้ บริเวณแนวเหนือหมู่เกาะอ่างทองในช่วงกลางฤดูฝน (เดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤษภาคม) ลักษณะการพบปลาหูขนาดใหญ่ที่มีความสมบูรณ์เพศพร้อมจะปล่อยไข่ดังกล่าว สะท้อนให้เห็นถึงช่วงฤดูของการปล่อยไข่ของประชากรปลาหูใน 2 บริเวณ ที่สามารถทำให้เกิดลูกปลาหูได้อย่างน้อย 2 ช่วง ในรอบปี โดยทั้งนี้ ปัจจัยกระตุ้นทางนิเวศวิทยาที่สำคัญ และมีบทบาทต่อประชากรปลาหูในพื้นที่อ่าวไทยตอนใน และในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณแนวเหนือหมู่เกาะอ่างทอง น่าจะเป็นปัจจัยด้านอุณหภูมิของน้ำ ซึ่งพบข้อมูลว่าในช่วงฤดูดังกล่าว ในพื้นที่อ่าวไทยตอนในเป็นช่วงฤดูหนาวซึ่งเกิดการลดลงของอุณหภูมิ น้ำ ขณะที่ในบริเวณแนวเหนือหมู่เกาะอ่างทองเป็นช่วงฤดูฝนซึ่งเกิดการลดลงของอุณหภูมิ น้ำเช่นกัน ทั้งสองพื้นที่นี้นับเป็นบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์ของแพลงก์ตอน และอินทรีย์สารแขวนลอยต่าง ๆ ในมวลน้ำที่ค่อนข้างสูงกว่าพื้นที่โดยรอบ ซึ่งนับว่ามีความเหมาะสมต่อการเจริญพันธุ์ของสัตว์น้ำระยะวัยอ่อนได้เป็นอย่างดี

ปัจจุบันประเทศไทยมีกฎระเบียบและมาตรการในการจัดการทรัพยากรปลาทู ที่มี การคำนึงถึงด้านพื้นที่ ด้านช่วงเวลา และช่วงวัยต่าง ๆ ของทรัพยากรปลาทู ซึ่งมาตรการที่มีอยู่สามารถแบ่งออกเป็น 3 มาตรการ (คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2563) มีวัตถุประสงค์ในการอนุรักษ์สัตว์น้ำโดยเฉพาะปลาทูในช่วงเวลาที่ไข่ วางไข่ และเลี้ยงตัวอ่อนในพื้นที่ โดยมาตรการที่ 1 นั้นมีการกำหนดพื้นที่และระยะเวลาสัตว์น้ำมีไข่ วางไข่ เลี้ยงตัวอ่อน ในที่จับสัตว์น้ำบางส่วนของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี พ. ศ. 2561 เป็นมาตรการที่มีใช้กันมาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งแบ่งช่วงเวลาของการบังคับใช้มาตรการออกเป็น 2 ช่วงเวลา ดังนี้ ช่วงที่ 1 ระหว่างวันที่ 15 กุมภาพันธ์ ถึงวันที่ 15 พฤษภาคม ของทุกปี (90 วัน) ครอบคลุมพื้นที่บางส่วนของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี ตั้งแต่ปลายแหลมเขาตาม่องไล่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ถึงอำเภอดอนสัก จังหวัดสุราษฎร์ธานี คิดเป็นพื้นที่ 26,400 ตารางกิโลเมตร โดยการกำหนดมาตรการในช่วงแรกนี้เพื่ออนุรักษ์พ่อแม่พันธุ์ปลาทูที่เข้ามาแพร่พันธุ์ วางไข่ และเพื่อปกป้องลูกปลาทูในพื้นที่ ช่วงที่ 2 ระหว่างช่วงวันที่ 16 พฤษภาคม ถึงวันที่ 14 มิถุนายน ของทุกปี (30 วัน) ครอบคลุมพื้นที่บางส่วนของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี (ระยะห่าง 7 ไมล์ทะเลจากฝั่ง) (รูปที่ 2.5) มาตรการที่ 2 กำหนดพื้นที่และระยะเวลาฤดูสัตว์น้ำมีไข่ วางไข่ เลี้ยงตัวอ่อน ในที่จับสัตว์น้ำบางส่วนของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พ. ศ. 2561 เป็นมาตรการที่มีวัตถุประสงค์เพื่อการติดตามปกป้องประชากรปลาทูขนาดเล็กที่ยังไม่ได้ขนาดแรกสืบพันธุ์ที่มีการเคลื่อนย้ายจากพื้นที่แพร่พันธุ์ วางไข่ (พื้นที่บางส่วนของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี) ไปสู่พื้นที่ตอนบน หรือเพื่อให้มีโอกาสเคลื่อนที่เข้าสู่อ่าวไทยตอนใน ในช่วงเวลาตั้งแต่วันที่ 16 พฤษภาคม ถึงวันที่ 14 มิถุนายน ของทุกปี ครอบคลุมพื้นที่ตั้งแต่ปลายแหลมเขาตาม่องไล่ถึงอำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (รูปที่ 2.5) และมาตรการที่ 3 กำหนดพื้นที่และระยะเวลาฤดูสัตว์น้ำมีไข่ วางไข่ เลี้ยงตัวอ่อน ในที่จับสัตว์น้ำบางส่วนของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร กรุงเทพมหานคร สมุทรปราการ ฉะเชิงเทรา และชลบุรี พ.ศ. 2561 (มาตรการปิดอ่าวไทยรูปตัว ก) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่ออนุรักษ์ทรัพยากรประมงที่อยู่ในบริเวณนี้เป็นการเฉพาะ ซึ่งเป็นมาตรการอนุรักษ์ทรัพยากรเพื่อวางไข่ เลี้ยงตัวอ่อน เนื่องจากบริเวณอ่าวไทยรูปตัว ก เป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง จึงเป็นแหล่งที่เลี้ยงตัวของปลาผิวน้ำหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง “ปลาทู” โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาตรการดังกล่าวกำหนดมาเพื่อให้สอดคล้องกับมาตรการที่เกิดขึ้นในบริเวณอ่าวไทยตอนกลาง โดยแบ่งช่วงเวลาของการบังคับใช้มาตรการออกเป็น 2 ช่วงเวลา ดังนี้ ช่วงที่ 1 ระหว่างวันที่ 15 มิถุนายน ถึงวันที่ 15 สิงหาคม ของทุกปี (62 วัน) ครอบคลุมพื้นที่อ่าวไทยตอนในฝั่งตะวันตก พื้นที่บางส่วนของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี สมุทรสงคราม และสมุทรสาคร และช่วงที่ 2 ระหว่างวันที่ 1 สิงหาคม ถึงวันที่ 30 กันยายน ของทุกปี (61 วัน) ครอบคลุมพื้นที่อ่าวไทยตอนในด้านเหนือ พื้นที่บางส่วนของจังหวัดสมุทรสาคร กรุงเทพมหานคร สมุทรปราการ ฉะเชิงเทรา และชลบุรี (รูปที่ 2.5)

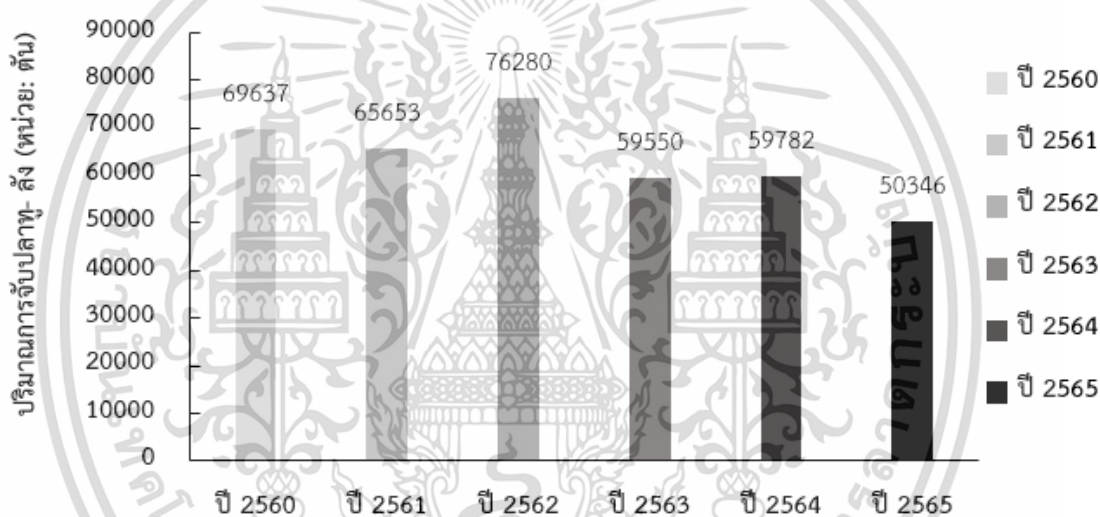


รูปที่ 2.5 พื้นที่ที่มีมาตรการจัดการทรัพยากรปลาของประเทศไทย (1.1) คือ มาตรการปิดอ่าวจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี ช่วงที่ 1 ตั้งแต่วันที่ 15 กุมภาพันธ์ ถึงวันที่ 15 พฤษภาคม ของทุกปี (1.2) คือ มาตรการปิดอ่าวจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี ช่วงที่ 2 วันที่ 16 พฤษภาคม ถึงวันที่ 14 มิถุนายน ของทุกปี (2) คือ มาตรการปิดอ่าวจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ตั้งแต่วันที่ 16 พฤษภาคม ถึงวันที่ 14 มิถุนายน ของทุกปี (3.1) มาตรการปิดอ่าวไทยรูปตัว ก ช่วงที่ 1 ระหว่างวันที่ 15 มิถุนายน ถึงวันที่ 15 สิงหาคม ของทุกปี และ (3.2) คือ มาตรการปิดอ่าวไทยรูปตัว ก ช่วงที่ 2 ระหว่างวันที่ 1 สิงหาคม ถึงวันที่ 30 กันยายน ของทุกปี

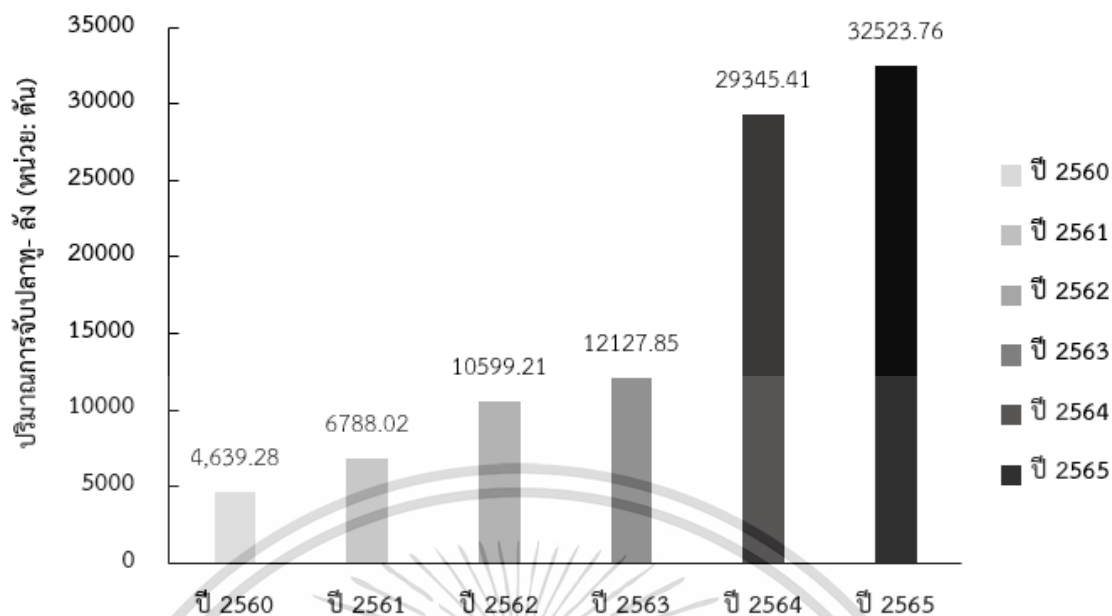
ที่มา: ดัดแปลงจาก คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2563)
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ปริมาณการทำประมงปลาทุ – ลังในประเทศไทย

ปลาทุเป็นสัตว์น้ำที่จับได้ทั้งจากการทำประมงพาณิชย์และประมงพื้นบ้าน ผลผลิตปลาทุทางฝั่งอ่าวไทยส่วนใหญ่มาจากการทำประมงพาณิชย์ และผลผลิตการทำประมงปลาทุจากทั่วประเทศ (ฝั่งอันดามัน และฝั่งอ่าวไทย) ในช่วงปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 (กรมประมง, 2561ข; กรมประมง, 2562ข; กรมประมง, 2563ข; กรมประมง, 2564ข; กรมประมง, 2565ค; กรมประมง, 2566ข) มีปริมาณการจับระหว่าง 50346 – 76280 ตัน (รูปที่ 2.6) ซึ่งปริมาณการจับปลาทุมีแนวโน้มลดลง ขณะที่ปลาทุที่ได้จากการทำประมงพื้นบ้านในช่วงปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 (กรมประมง, 2561ค; กรมประมง, 2562ค; กรมประมง, 2563ค; กรมประมง, 2564ค; กรมประมง, 2565ค; กรมประมง, 2566ค) มีปริมาณตั้งแต่ 4639.28 – 32523.76 ตัน (รูปที่ 2.7) มีปริมาณการจับปลาทุเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

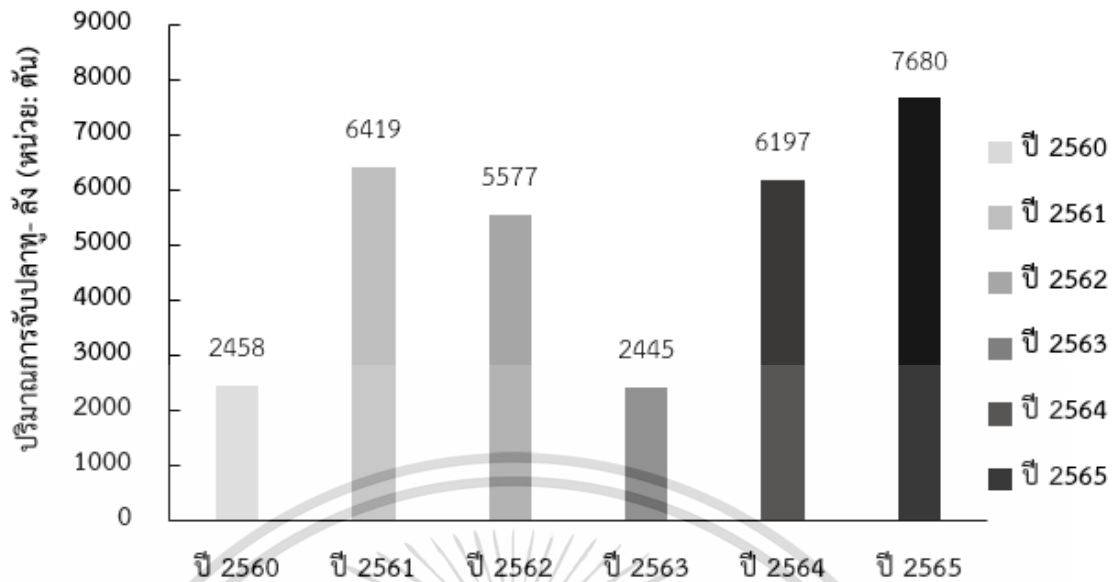


รูปที่ 2.6 ปริมาณการจับปลาทุประมงพาณิชย์ รวมเครื่องมือประมงทั้งประเทศ (ฝั่งอันดามัน และฝั่งอ่าวไทย) ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565

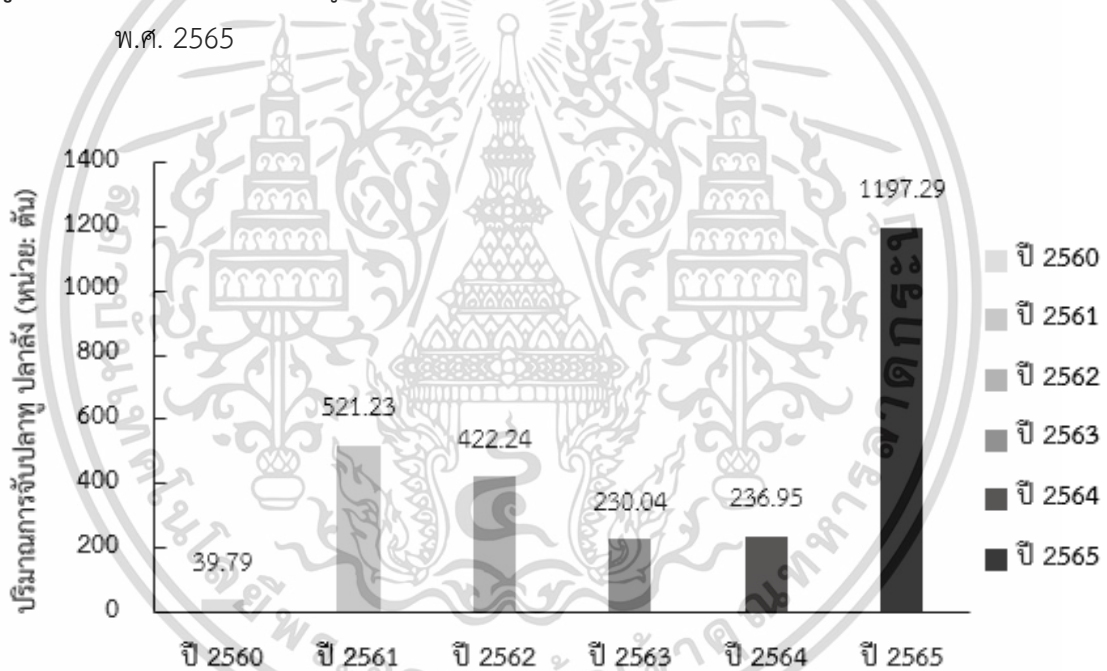


รูปที่ 2.7 ปริมาณการจับปลาทุประมงพื้นบ้าน รวมเครื่องมือประมงทั้งประเทศ (ฝั่งอันดามัน และฝั่งอ่าวไทย) ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565

สำหรับพื้นที่ทำประมงปลาของทางฝั่งอ่าวไทย จากข้อมูลสถิติการประมงของกรมประมง ในปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 (กรมประมง, 2561ข; กรมประมง, 2562ข; กรมประมง, 2563ข; กรมประมง, 2564ข; กรมประมง, 2565ค; กรมประมง, 2566ข; กรมประมง, 2561ค; กรมประมง, 2562ค; กรมประมง, 2563ค; กรมประมง, 2564ค; กรมประมง, 2565ง; กรมประมง, 2566ค) พบว่า ผลผลิตจากแหล่งประมงที่ 2 พื้นที่อ่าวไทยตอนในครอบคลุมพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร กรุงเทพมหานคร สมุทรปราการ ฉะเชิงเทรา และชลบุรี ซึ่งเป็นแหล่งทำประมงปลาที่สำคัญของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 ผลผลิตที่ได้จากการทำประมงพาณิชย์จากแหล่งประมงที่ 2 มีปริมาณการจับปลาในอ่าวไทยระหว่าง 2445 – 7680 ตัน (รูปที่ 2.8) ในขณะเดียวกัน ผลผลิตที่ได้จากการทำประมงพื้นบ้านจากแหล่งประมงที่ 2 มีปริมาณการจับปลาอยู่ที่ระหว่าง 39.79 – 1197.29 ตัน (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.8 ปริมาณการจับปลาทุประมงพาณิชย์ แหล่งประมงที่ 2 ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565

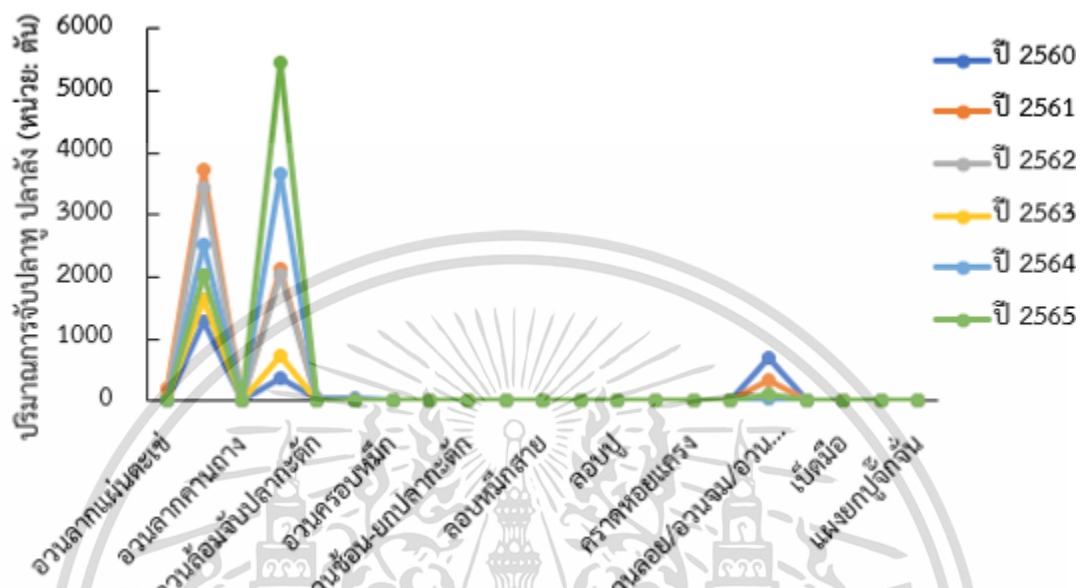


รูปที่ 2.9 ปริมาณการจับปลาทุประมงพื้นบ้าน แหล่งประมงที่ 2 ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565

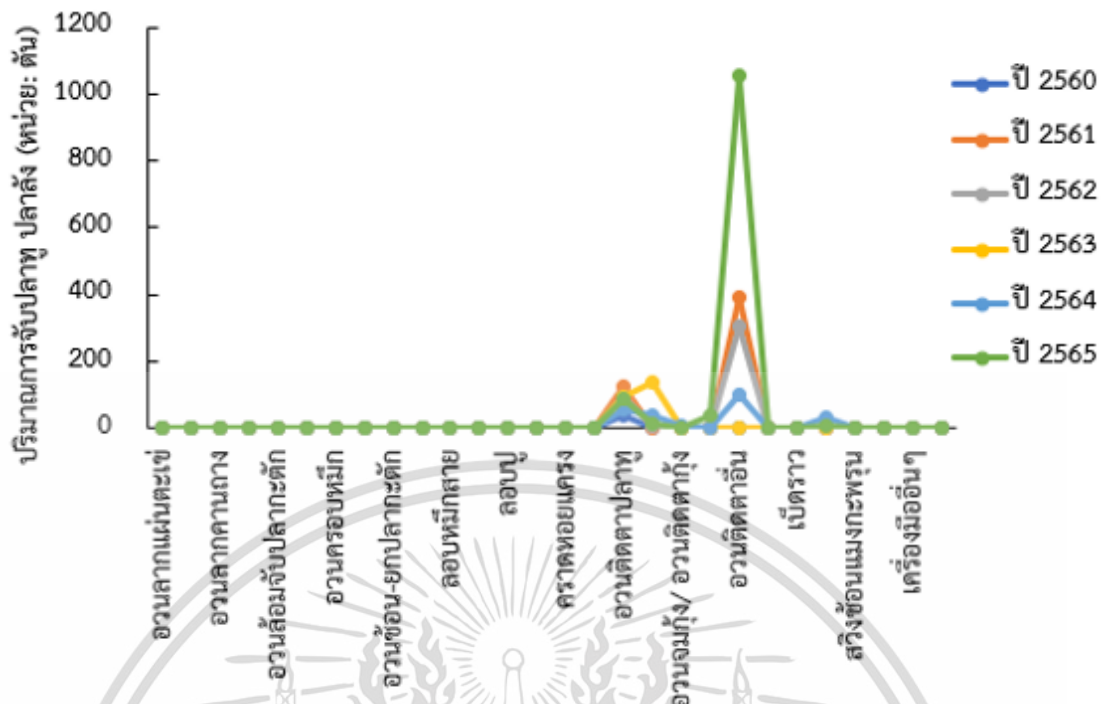
หากพิจารณาการจับปลาจากแหล่งประมงที่ 2 จำแนกตามประเภทเครื่องมือในช่วงปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 (กรมประมง, 2561ข; กรมประมง, 2562ข; กรมประมง, 2563ข; กรมประมง, 2564ข; กรมประมง, 2565ค; กรมประมง, 2566ข; กรมประมง, 2561ค; กรมประมง, 2562ค; กรมประมง, 2563ค; กรมประมง, 2564ค; กรมประมง, 2565ง; กรมประมง, 2566ค) พบว่าอวนลากคู่และอวนล้อมจับเป็นเครื่องพาณิชย์ที่มีการจับปลาได้มาก ขณะที่เครื่องมือกลุ่มอวนลอย อวนจม อวนตีดตา จับปลาได้จำนวนรองลงมาตามลำดับ คือ 14614, 14347 และ 1271 ตัน (รูปที่ 2.10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนเครื่องมือประมงพื้นบ้านที่จับปลาในปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 เครื่องมือประมงพื้นบ้านที่จับปลาได้มากที่สุด ได้แก่ อวนติดตาอื่น ๆ อวนติดตาปลา และอวนลอยปลาหลังเขียว จับปลาได้ดังนี้ 1852, 494.67 และ 195.12 ตัน ตามลำดับ (รูปที่ 2.11)



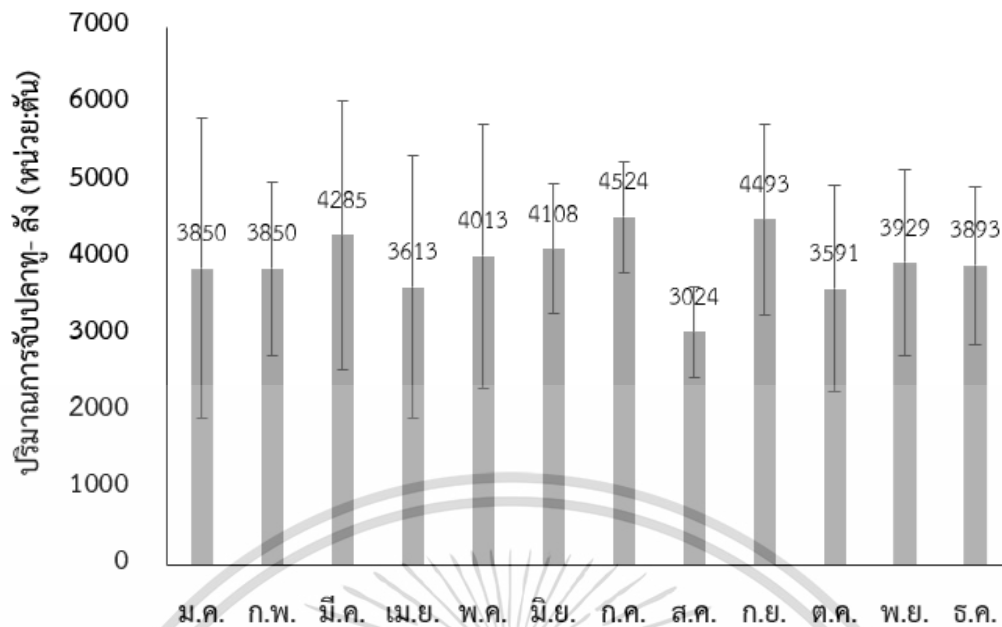
รูปที่ 2.10 ปริมาณการจับปลาประมงพาณิชย์ แหล่งประมงที่ 2 จำแนกตามเครื่องมือประมง ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565



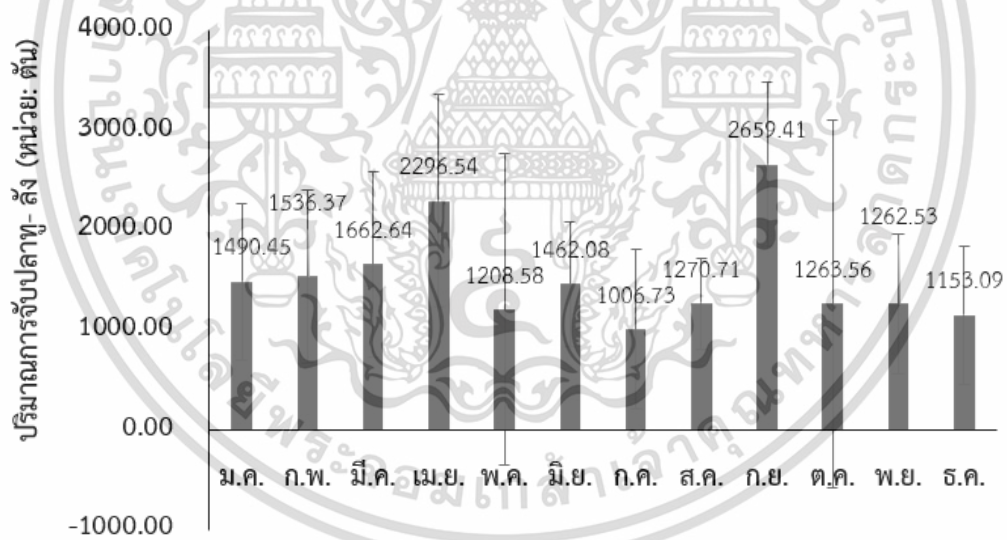
รูปที่ 2.11 ปริมาณการจับปลาทุประมงพื้นบ้าน แหล่งประมงที่ 2 จำแนกตามเครื่องมือประมง ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565

ในส่วนการทำประมงพาณิชย์ที่จำแนกปริมาณการจับปลาทุตามรายเดือน (การทำประมงทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน) ในช่วงปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 (กรมประมง, 2561ข; กรมประมง, 2562ข; กรมประมง, 2563ข; กรมประมง, 2564ข; กรมประมง, 2565ค; กรมประมง, 2566ข) พบว่าการทำประมงพาณิชย์มีปริมาณการจับปลาทุน้อยสุดในช่วงเดือนสิงหาคม มีปริมาณการจับปลาทุ คือ 3024 ตัน (รูปที่ 2.12) ในช่วงปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 (กรมประมง, 2561ค; กรมประมง, 2562ค; กรมประมง, 2563ค; กรมประมง, 2564ค; กรมประมง, 2565ง; กรมประมง, 2566ค) การทำประมงพื้นบ้านมีแนวโน้มปริมาณการจับปลาทุน้อยสุดในเดือนกรกฎาคม มีปริมาณการจับปลาทุ คือ 1006.73 ตัน (รูปที่ 2.13) และยังพบว่าการทำประมงปลาทุทั้งประมงพาณิชย์และประมงพื้นบ้านนั้นหากจำแนกตามฤดูกาล ซึ่งฤดูกาลจำแนกออกเป็น 3 ฤดูกาล คือ ฤดูร้อนเริ่มตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม ฤดูฝนเริ่มตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน ฤดูหนาวเริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ พบว่าปลาทุถูกจับมาใช้ประโยชน์ในช่วงฤดูหนาวมากกว่าช่วงฤดูกาลอื่น ๆ จากสถิติการจับจากทั้งประมงพาณิชย์และประมงพื้นบ้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 ปริมาณการจับปลาตู้ประมงพาณิชย์ จำแนกตามรายเดือน ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565



รูปที่ 2.13 ปริมาณการจับปลาตู้ประมงพื้นบ้าน จำแนกตามรายเดือน ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เทคโนโลยีการตรวจหาร่องรอยทางดีเอ็นเอของปลาในสิ่งแวดล้อม

2.2.1 ดีเอ็นเอคืออะไร

ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid หรือ DNA) เป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทำหน้าที่เก็บข้อมูลรหัสทางพันธุกรรม ที่สามารถถ่ายทอดยังรุ่นสู่รุ่นได้ โครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) มีลักษณะคล้ายบันไดเวียน (Double Helix) โดยมีพอลินิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide) 2 สาย เรียงตัวในแนวที่ตรงกันข้ามกัน พอลินิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide) สายหนึ่งเรียงตัวในทิศทางจาก 3' ไป 5' ส่วนอีกสายเรียงตัวในทิศทาง 5' ไป 3' โดยทั้ง 2 สายนี้ เอาส่วนที่เป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose Sugar) ไว้ด้านนอก หันส่วนที่เป็นเบสเข้าหากัน โดยเบสที่อยู่ตรงข้ามกันต้องเป็นเบสที่เข้าคู่กันได้ (Complementary) ทำให้ดีเอ็นเอมีลักษณะคล้ายบันไดที่บิดตัวทางขวา ราวของบันไดแต่ละข้างก็คือการเรียงตัวของ นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose Sugar), หมู่ฟอสเฟต (Phosphate Group) (ซึ่งประกอบด้วยฟอสฟอรัสและออกซิเจน) และไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous Base) โดยเบสในนิวคลีโอไทด์มีอยู่ 4 ชนิด คือ - อะดีนีน (Adenine, A) , กัวนีน (Guanine, G) ซึ่งเป็นสารประกอบพวกพิวรีน (Purine) ส่วนอีกพวกเป็นสารประกอบพวกไพริมิดีน (Pyrimidine) คือ ไซโตซีน (Cytosine, C), ไทมีน (Thymine, T) และราวของบันไดสองข้างถูกเชื่อมด้วยเบส โดยที่ A จะเชื่อมกับ T ด้วยพันธะไฮโดรเจนแบบพันธะคู่ (Double bonds) และ C จะเชื่อมกับ G ด้วยพันธะไฮโดรเจนแบบสามพันธะ (Triple Bonds) ซึ่งการเรียงกันของเบสแต่ละชนิด จะส่งผลต่อการเกิดความหลากหลาย และสร้างความต่างในลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ ที่จะมีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และแหล่งที่พบดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตจะพบ 2 แหล่ง คือ ดีเอ็นเอในนิวเคลียส (Nuclear DNA) และดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอก นิวเคลียสซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่พบในไซโตพลาสซึม โดยสัตว์มีดีเอ็นเออยู่ในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล , 2545)

2.2.2 ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA หรือ mtDNA)

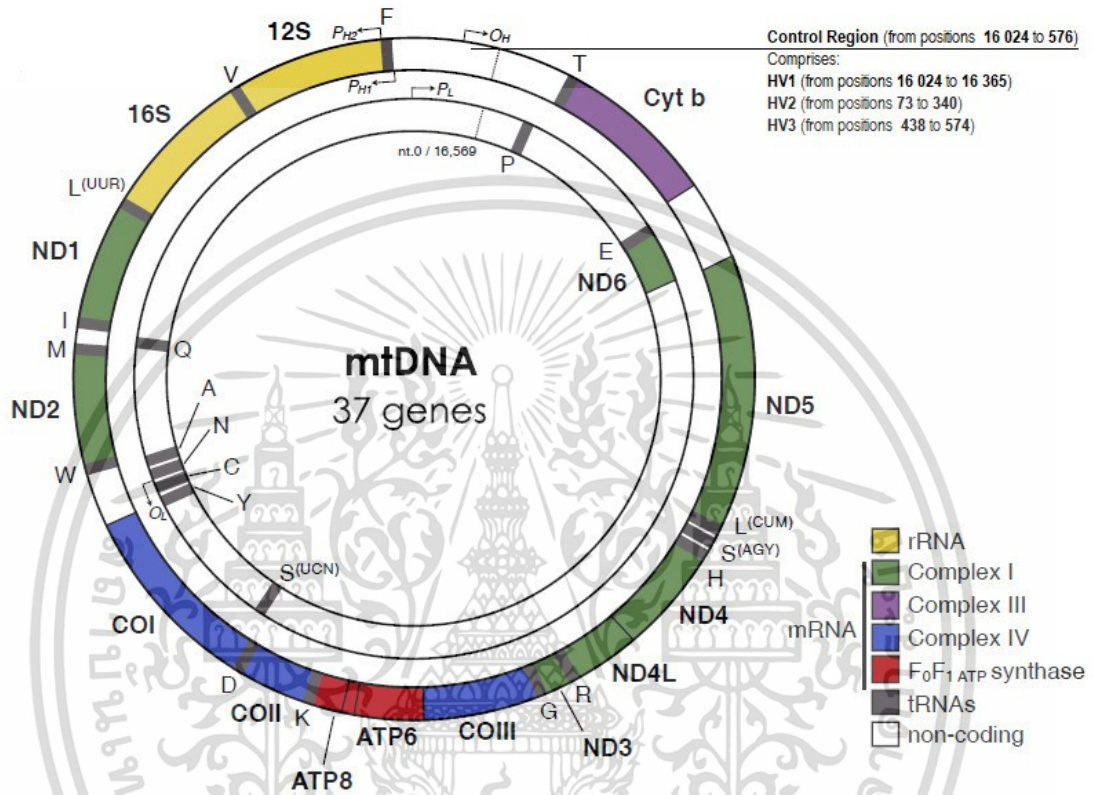
เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย พบในเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ เป็นออร์แกเนลล์ที่มีหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานให้กับเซลล์ ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีโครงสร้างเป็นวงกลมปลายปิดสายคู่ ในไมโทคอนเดรีย 1 วง จะมีทั้งบริเวณที่ทำหน้าที่ในการถอดรหัสพันธุกรรม และส่วนที่ไม่มีการถอดรหัสที่เรียกว่า Control region หรือ D loop (รูปที่ 2.14) (สุทัศน์ ดวงจิตร์, 2554) ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ เป็นที่นิยมเพื่อจำแนกชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เนื่องจาก มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่รวดเร็ว และดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีสายที่สั้น ขนาดประมาณ 16,569 คู่เบส และอยู่ในช่วงที่ใช้เทคนิคทางพีซีอาร์ได้เหมาะสม ถ้าเทียบกับดีเอ็นเอในนิวเคลียสที่มียาวมากกว่ามีขนาดประมาณ 3.2 ล้านคู่เบส และมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในแต่ละส่วนไม่เท่ากัน นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีความแปรผันสูงกว่านิวเคลียสดีเอ็นเอ ทำให้พบความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอสูงระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดพันธุ์กัน แต่ความแปรผันน้อยมากในระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิดพันธุ์เดียวกัน จาก

กลไกธรรมชาติในการควบคุมความแปรผันในลำดับเบสนี้เพื่อรักษาสภาพและองค์ประกอบของโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษา

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้คงที่ และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตชนิดพันธุ์นั้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้ถือว่ามีความสำคัญในการนำมาใช้ระบุหรือจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดพันธุ์ที่ต่างกันออกจากกันได้ ซึ่งยีนในไมโทคอนเดรียจะมียีนที่ทำหน้าที่ในการถอดรหัส ทั้งหมด 37 ยีน ซึ่งใน 37 ยีนนี้ มี 13 ยีนที่สามารถแปลงรหัสไปเป็นโปรตีนได้ เช่น Cytochrome b, Cytochrome oxidase และ ATP synthase



รูปที่ 2.14 โครงสร้างไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Picard *et al.* (2016)

ในปัจจุบันมีการนำความรู้ด้านอนุชีววิทยามาใช้ร่วมในการจัดจำแนกชนิดพันธุ์ เป็นที่ใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน โดยทั่วไปการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตสามารถทำได้โดยใช้ลักษณะจากภายนอก (Morphology) แต่การจำแนกชนิดพันธุ์จากลักษณะภายนอกยังมีข้อจำกัดอยู่ ได้แก่ ผลของการเปลี่ยนแปลงรูปร่างภายนอกไปตามสิ่งแวดล้อม (Phenotypic plasticity) และความแปรผันทางพันธุกรรม (Genetic variabilities) ของลักษณะที่ใช้ในการจำแนก ซึ่งสัตว์น้ำนั้นลักษณะภายนอกจะมีความคล้ายคลึงกันมากอาจนำไปสู่การจำแนกชนิดพันธุ์ที่ผิดพลาด ซึ่งการจัดจำแนกจากลักษณะภายนอกจะต้องอาศัยผู้ชำนาญและต้องมีประสบการณ์ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) คือดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายที่ระบุความเฉพาะของชนิดพันธุ์นั้น จะเป็นเครื่องมืออีกอย่างที่ยืนยันการจำแนกได้ ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอมีได้หลากหลาย เช่น การใช้ Cytochrome b (*cytb*) เป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก และพบในสัตว์ทุกชนิด แต่มีการสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะกับสัตว์แต่ละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดพันธุ์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cytb* เป็นยีนอนุรักษ์ (Conserved gene) ซึ่งจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงเป็นยีนที่นิยมในการตรวจสอบเพื่อระบุชนิดพันธุ์ในสัตว์ มีการรายงานในการระบุชนิดพันธุ์ของสัตว์น้ำมากมายเช่น ระบุปลา (Bartlett and Davidson, 1991; Čekovská *et al.*, 2023; Panprommin *et al.*, 2023) คลัสเตเซียน (Bucklin *et al.*, 2007; Mondal and Mandal, 2020) เช่นเดียวกันกับ การใช้ Cytochrome c oxidase I (*COI*) ที่เป็นที่นิยมใช้ในการระบุชนิดพันธุ์สัตว์ ซึ่งเทคนิคทางอณูชีววิทยาเป็นจึงเครื่องมือที่ช่วยในการระบุชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต และเป็นสิ่งจำเป็นที่นักอนุกรมวิธานสามารถนำไปใช้เพื่อสร้างระบบอ้างอิงที่ถูกต้อง (Frézal and Leblois, 2008) ปัจจุบันมีการนำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาใช้ระบุและจำแนกสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถช่วยระบุชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชนิดได้ ทำให้พบสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กที่มีความซับซ้อนที่ยากต่อการระบุชนิดพันธุ์โดยลักษณะสัณฐานวิทยา เพื่อลดความผิดพลาดในการระบุชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ รวมทั้งสามารถใช้ประยุกต์ในงานต่าง ๆ ได้เช่น ด้านวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต การจัดการทรัพยากร เป็นต้น (Hebert *et al.*, 2003)

2.2.3 ดีเอ็นเอ บาร์โค้ด (DNA Barcode)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ยิยมใช้ในการจำแนกชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตร่วมกับการศึกษาลักษณะภายนอกที่ปรากฏ โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ของบางยีน เช่น ยีน Cytochrome c oxidase I (*COI*) (Hebert *et al.*, 2003) นอกจากนี้ความคล้ายคลึงหรือความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์จากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ นั้น ยังมีความเชื่อมโยงกับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ (พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์, 2554) การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการช่วยระบุสิ่งมีชีวิต มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีนักอนุกรมวิธานในการสร้างระบบอ้างอิงที่ถูกต้องแม่นยำ (พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์, 2554) และสำหรับบริเวณที่ใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้นมีคุณสมบัติ 3 ประการ ดังนี้

- 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนั้น ๆ มีความแตกต่างมากพอที่จะทำให้สามารถแยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ แต่ต้องมีความแตกต่างกันภายในชนิดเดียวกันต่ำมาก
- 2 เป็นดีเอ็นเอที่มีบริเวณอนุรักษ์ที่สามารถให้ไพรเมอร์ที่เป็น Universal primer เข้ามาจับ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณนั้นด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้
- 3 มีขนาดที่เหมาะสมประมาณ 500 – 800 คู่เบส หลักการของดีเอ็นเอบาร์โค้ด เริ่มจากการศึกษาของการเรียงตัวสารพันธุกรรมพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต หรือนิวคลีโอไทด์ โดยการจัดเรียงนิวคลีโอไทด์พื้นฐานหรือยีนที่แตกต่างกันไป ทำให้เกิดความหลากหลายของรหัสพันธุกรรม จึงเป็นที่มาของการทำรหัสบาร์โค้ด โดยช่วงดีเอ็นเอที่จะใช้เป็นบาร์โค้ดต้องเป็นช่วงดีเอ็นเอที่ผ่านการยอมรับ (Standardized genetic loci) ให้เป็นบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิต อาทิเช่น ยีน *COI* ที่ได้รับการยอมรับให้เป็น Universal DNA barcode สำหรับสัตว์ (พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์, 2554) โดยในปัจจุบันดีเอ็นเอ

บาร์โค้ดถือเป็นเครื่องมือที่สำคัญอย่างหนึ่งที่น่ามาประยุกต์ใช้กับงานหรือการศึกษาด้านความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity)

2.2.4 การสกัดดีเอ็นเอ

ปัจจุบันวิทยาการทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้มีการพัฒนาก้าวหน้าอย่างมาก โดยเฉพาะการศึกษาทางชีวโมเลกุล (Molecular biology) และมีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุล (Molecular technique) มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยในด้านต่าง ๆ เช่น การจำแนกชนิดพันธุ์ การปรับปรุงชนิดพันธุ์และการตรวจสอบชนิดพันธุ์ เป็นต้น การใช้เทคนิคนี้ส่วนใหญ่มุ่งเน้นศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอ ที่เป็นสารพันธุกรรม (Genetic material) ในนิวเคลียสของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นขั้นตอนในการสกัดแยกดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตถือเป็นขั้นตอนสำคัญ วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิต มีหลากหลายวิธีด้วยกัน จะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของสิ่งมีชีวิต

การสกัดดีเอ็นเอสามารถทำได้ทั้งวิธีดั้งเดิม (Organic method) และวิธีการใช้น้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป อย่างไรก็ตามวิธีดั้งเดิมต้องอาศัยเครื่องมือและความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน

วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยแบบวิธีดั้งเดิม เช่นวิธี Phenol-Chloroform extraction นั้นมีราคาถูกและให้ปริมาณดีเอ็นเอที่เพียงพอ โดยมีหลักการในการแยกดีเอ็นเอออกจากโปรตีนและสิ่งปนเปื้อน (Impurity) อื่น ๆ ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) นั่นคือ Phenol และ Chloroform และการปั่นเหวี่ยง หลังจากการปั่นเหวี่ยงโปรตีนจะอยู่ในชั้น Phenol ส่วนดีเอ็นเอจะอยู่ในชั้น Aqueous วิธีดังกล่าวนี้เป็นวิธีที่ง่ายและราคาถูก แต่มีข้อเสียเนื่องจาก Phenol และ Chloroform เป็นสารละลายที่เป็นพิษและเป็นสารก่อมะเร็งที่มีอันตราย (กาญจนา, 2564) โดยวิธีการแบบดั้งเดิมมีขั้นตอนหลัก ดังนี้

- 1 การทำให้เซลล์แตก (Cell lysis) โดยการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกออก เพื่อที่จะสามารถปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมา โดยการใช้สารจำพวก Detergent ได้แก่ Sodium dodecyl sulfate (SDS) โดย SDS นั้นจะเข้าไปละลายไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียส รวมทั้งไปจับกับโปรตีนพวก Hydrophobic protein ทำให้เซลล์แตกและปลดปล่อยองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน น้ำตาล เกลือต่าง ๆ อาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ ออกมาในสารละลาย

- 2 การย่อยโปรตีนและอาร์เอ็นเอ (Deproteinization) ออกจากดีเอ็นเอ ขั้นตอนนี้จะใช้ Protease และ RNase จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วย Phenol/ Chloroform ในบางครั้งอาจเติมเกลือ Sodium chloride หรือ Sodium acetate เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตกตะกอนโปรตีน ทำให้ได้ดีเอ็นเอตามต้องการ

- 3 การตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitation) สามารถตกตะกอนของดีเอ็นเอได้โดยใช้ 70% Iso – propanol หรือ Absolute ethanol (แช่เย็น) เนื่องจาก Ethanol นั้นมีความหนาแน่นมากกว่าน้ำ ดังนั้นเมื่อเติม Ethanol ลงไปช่วยให้ดีเอ็นเอจับตัวกันเองแล้วตกตะกอนเป็นสีขาวอยู่กัน

หลอด อาจเติมเกลือ Sodium acetate ด้วย เพื่อช่วยในขั้นตอนการตกตะกอน จากนั้นสามารถละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำหรือ TE buffer และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

ส่วนน้ำยาสำหรับการสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ในปัจจุบันมีให้เลือกหลากหลายและสามารถช่วยลดภาระในการเตรียมน้ำยาสกัดได้ อย่างไรก็ตามหลักการการสกัดดีเอ็นเอของน้ำยาแต่ละยี่ห้อแตกต่างกันไป (กาญจนา สุจิราโชโต และคณะ, 2564) โดยมีงานวิจัยหลายงานที่ใช้น้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Keskin (2014) ที่นำน้ำยาสกัด PowerWater Sterivex DNA Isolation Kit (MoBio, CA) มาสกัดหาดีเอ็นเอของปลาตุ๊กแอฟริกา (*Clarias gariepinus*) ปลาการ์ปรัสเซีย (*Carassius gibelio*) ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลาโมโรโกะหินหรือปลาปากบอน (*Pseudorasbora parva*) น้ำยาสกัดดีเอ็นเอนี้อาศัยหลักการแยกจีโนมิกดีเอ็นเอออกจากกระดาศกรองโดยไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์หรือสารเคมีที่เป็นอันตรายในการทำให้เซลล์แตก ไม่ต้องใช้เวลาบ่มนาน ทำให้ดีเอ็นเอมีคุณภาพสูงและบริสุทธิ์ได้ในเวลาเพียงไม่นาน การสกัดดีเอ็นเอเพื่อดีเอ็นเอของปลาที่เป็นชนิดพันธุ์หายากและชนิดพันธุ์รุกรานของ Keskin *et al.* (2016) ได้ใช้น้ำยาสกัด GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit ที่ออกแบบมาเพื่อการทำให้ดีเอ็นเอทั้งหมดบริสุทธิ์อย่างรวดเร็วจากตัวอย่างทางชีววิทยา (ตัวอย่างเลือดสดหรือแช่แข็ง เส้นผม ปัสสาวะ) น้ำยาสกัดชุดนี้มีประสิทธิภาพในการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากตัวอย่างสดและแห้ง ที่มีอายุหลายปี หรือที่เก็บรักษาไว้ในแอลกอฮอล์หรือฟอร์มาลีน และงานวิจัยที่ทำการศึกษเกี่ยวกับอัตราการปลดปล่อย eDNA จากปลาว่ายอ่อนและปลาโตเต็มวัยของ Maruyama *et al.* (2014) เลือกใช้น้ำยาสกัด DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) ที่มีคุณสมบัติในการสกัดดีเอ็นเอได้อย่างรวดเร็ว โดยมีกระบวนการที่ปราศจาก Phenol และ Chloroform และตัวอย่างถูกย่อยด้วย Proteinase K ซึ่งช่วยลดเวลาในการปฏิบัติงาน อีกทั้งน้ำยาสกัดชุดนี้ได้ออกแบบให้เหมาะกับตัวอย่างทำให้สามารถสกัดดีเอ็นเอคุณภาพสูงได้อย่างสม่ำเสมอ

2.2.5 เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction (PCR))

เทคนิคพีซีอาร์ถูกคิดค้นขึ้นครั้งแรกโดย Mullis ในปี 1985 เป็นเทคนิคพื้นฐานทางอณูชีววิทยา (Molecular biology) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอในหลอดทดลองจากปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เพียงเล็กน้อย จนได้ผลผลิตเป็นพันล้านโมเลกุล ซึ่งเป็นการใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้การติดฉลากดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ลำดับเบส ซึ่งพีซีอาร์สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ครั้งละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (Primer) 1 คู่ ถือเป็นเทคนิคที่ใช้เวลาไม่นาน และดีเอ็นเอต้นแบบไม่ต้องอยู่ในสภาพที่ดี (วิสุทธิ ไบไม้, 2536) องค์ประกอบที่สำคัญของสารในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย

1 ดีเอ็นเอต้นแบบ ไม่จำเป็นต้องบริสุทธิ์ ปริมาณดีเอ็นเอใช้ได้ตั้งแต่ 5 – 500 นาโนกรัม โดยทั่วไปนิยมอยู่ที่ 10 – 50 นาโนกรัม เท่านั้น

2 ไพรเมอร์ เป็นโพลิโนวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันกันดีเอ็นเอต้นแบบ โดยนิยมใช้คือโพลิโนวคลีโอไทด์ขนาด 20 – 24 นิวคลีโอไทด์

3 เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีบางช่วงที่ใช้อุณหภูมิสูง ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้จึงควรทนความร้อนได้ เช่น เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่สกัดจากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus*

4 ดิออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ที่ประกอบด้วย dATP, dGTP, dCTP และ dTTP

5 $MgCl_2$ เป็นองค์ประกอบสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์มีด้วยกัน 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน วัฏจักรของพีซีอาร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1 Denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอต้นแบบสายคู่ออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิสูง 92 – 95 องศาเซลเซียส

2 Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง และจัดไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37 – 60 องศาเซลเซียส

3 Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 72 – 75 องศาเซลเซียส

2.2.5.1 การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Quantification)

เป็นการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงของ Nucleic acid (DNA) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงที่ดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.1 – 1 และสามารถคำนวณเป็นปริมาณได้ดังนี้

$$\text{Formula: } (A_{260} - A_{320}) * (50/0.052)$$

2.2.5.2 การตรวจวัดคุณภาพ (DNA Purity Quantification)

เป็นการตรวจความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอว่า เช่น Phenol, Salt, Humic acid รวมไปถึง Protein ต่าง ๆ ที่หลงเหลือจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอหรือที่ไม่สามารถกำจัดออกไปได้ ซึ่งสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ เหล่านี้อาจจะส่งผลต่อปฏิกิริยาในการทดลองในลำดับต่อไปได้ โดยดูจากอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงของตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่ความยาวคลื่น (นาโนเมตร) A_{260}/A_{280} เนื่องจากโปรตีนสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ A_{280} หากมีการปนเปื้อนของ Protein หรือ Phenol สามารถแปลผลเบื้องต้นได้ดังนี้ (Abdel-Latif and Osman, 2017)

A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.7 – 1.9 ถือว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์

A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 2.1 ขึ้นไป มีการปนเปื้อนของ protein หรือ Phenol สูง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6 อิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) เป็นวิธีที่ใช้กระแสไฟฟ้าแยกสารประกอบต่าง ๆ ออกจากกันโดยอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันของโมเลกุลในการแยก ในการเคลื่อนที่ของสารให้แยก ออกจากกันต้องอาศัยความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าและตัวกลางชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมวิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการแยกวิเคราะห์และทำให้สารบริสุทธิ์ได้ และสามารถตรวจตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารต่าง ๆ ได้ด้วยการย้อมสี ซึ่งการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสนั้นจะมีปัจจัยที่จะส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของสาร (สุกัญญา สุนทรส, 2549; อาภัสสรฯ ชมิดท์, 2537) ได้แก่

1 คุณสมบัติของสารตัวอย่าง คือ ชนิดและปริมาณของประจุที่เป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของสารในสนามไฟฟ้าต่อเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า โดยสารที่มีประจุจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้ามกัน โดยขั้วที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่เข้าหาประจุลบ ส่วนสารที่มีประจุลบก็จะเคลื่อนที่เข้าหาประจุบวก ซึ่งสารที่มีประจุจะถูกแยกออกด้วยความแตกต่างของประจุ ตามขนาดและรูปร่างของโมเลกุล เช่น โมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็ก เป็นต้น

2 สนามไฟฟ้า เป็นอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับกระแสไฟฟ้า ระยะเวลาในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส และความต่างศักย์ไฟฟ้า โดยถ้าใช้กำลังไฟฟ้าที่สูงจะช่วยให้การเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเร็วขึ้น แต่ถ้าใช้กำลังไฟฟ้าที่สูงเกินไปทำให้เกิดความร้อนสูงขึ้น ก็จะทำให้สารนั้นเสื่อมสภาพ แต่ถ้าใช้กำลังไฟฟ้าที่ก็จะต้องใช้เวลานานเกินไป

3 สารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer) จะมีหน้าที่รักษาสภาพความเป็นกรด เบส ของตัวกลางในการค้ำจุน และมีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า ความเป็นกรด เบส จะส่งผลต่อการแตกตัวของหมู่ที่มีประจุของโมเลกุล

4 ตัวกลาง จะมีหน้าที่สำคัญในการแยกสารโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส เนื่องจากเป็นตัวกลางที่ยอมให้สารตัวอย่างผ่าน และสามารถแยกสารเป็นส่วน ๆ ได้ง่ายและชัดเจน ซึ่งตัวกลางจะไม่มีประจุเพราะจะมีผลต่อการวิ่งของสารที่ใช้ในการแยก ตัวกลางที่นิยมใช้ในงานวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส คือ Agarose gel ที่ใช้ในการแยกดีเอ็นเอ ซึ่ง Agarose เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง จะประกอบด้วย D-galactose และ 3,6-Anhydro-L-galactopyranose ที่ไขว้พันกันทำให้เจลมีลักษณะเป็นรูพรุน (สุกัญญา, 2549; อาภัสสรฯ, 2537) ดังนั้น Gel electrophoresis จะเป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารสารพวกโปรตีน พวกรดนิวคลีอิก โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารบนเจลภายใต้สนามไฟฟ้า โดยเจลที่นิยมใช้คือ Agarose หรือเรียกได้อีกชื่อว่า Agarose gel electrophoresis วิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานในการแยกวิเคราะห์ดีเอ็นเอ เมื่อทำการปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลาง ดีเอ็นเอที่มีประจุลบ ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี ความเป็นกรด เบส ที่ค่อนข้างเบสเพียงเล็กน้อยเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่เป็นบวก ส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก ทำให้สามารถแยก

ออกได้ตามขนาด และการตรวจสอบตำแหน่งของดีเอ็นเอนั้น หลังจากที่ทำ Gel electrophoresis เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้ว ทำได้โดยการย้อมสีเจล โดยการย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ซึ่งเมื่อนำเจลไปแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปส่องด้วยแสงยูวี (UV transilluminator) จะเห็นแถบดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ เพราะสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ที่จับกับดีเอ็นเอจะเรืองแสง ทำให้มองเห็นได้ชัดเจน เนื่องจากสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ที่เป็นสารก่อมะเร็ง ในปัจจุบันมีสีย้อมที่ปลอดภัย ที่เป็นสีย้อมชนิดฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถใช้แทนสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ได้ และไม่ เป็นไรก่อนมะเร็ง (Carcinogen) และสามารถดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นบนเจลภายใต้แสงยู และแสงสีฟ้า (Blue light transilluminator) นอกจากนี้มีปัจจัยการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอผ่าน Agarose gel ได้แก่

1 ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่เป็นเส้นตรงผ่าน Agarose gel โดยมีความคล่องตัวซึ่งสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุล \log_{10} โมเลกุลที่ใหญ่กว่าเดินทางได้ช้าลง เนื่องจากการเสียดสีที่มากขึ้นเมื่อเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลนั้นมีประสิทธิภาพน้อยกว่าโมเลกุลที่เล็กกว่า รูปแบบดีเอ็นเอแบบวงกลมจะโยกย้ายใน Agarose ที่แตกต่างจากดีเอ็นเอเชิงเส้นที่มีมวลเท่ากัน

2 ความเข้มข้นของ Agarose gel เจลที่มีส่วนผสมของ Agarose ที่มีความเข้มข้นต่างกัน สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ ได้ ถ้าความเข้มข้นของ Agarose ที่ต่ำ รูพรุนเจลจะมีขนาดรูพรุนขนาดใหญ่ ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็ว เหมาะต่อการแยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่ ในทางตรงกันข้าม ถ้าความเข้มข้นของ Agarose ที่สูง เจลจะมีขนาดรูพรุนขนาดเล็กกว่า การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ จะช้าลง จึงช่วยในการแยกดีเอ็นเอขนาดเล็ก

3 สารละลายบัฟเฟอร์ การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ในสนามไฟฟ้านั้นขึ้นอยู่กับความเป็นกรด เบส ถ้ามีการเตรียมความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ผิด เช่นเตรียมความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่สูงเกินไป ทำให้เกิดการนำกระแสไฟฟ้าที่ดี แต่จะเกิดความร้อนเพิ่มขึ้นมากจนทำให้เจลละลายและดีเอ็นเออาจเสื่อมสภาพ แต่ถ้าเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่เจือจางเกินไป ก็จะทำให้ไฟฟ้าไม่ดีและ ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้า ซึ่งสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ pH ของไอออนสองขั้วเท่ากัน เพราะเมื่อมีการทำ Gel electrophoresis ไปแล้ว ขั้วบวกจะมี pH สูงขึ้นแล้วขั้วลบจะมี pH ต่ำ ลง ซึ่งสารละลายบัฟเฟอร์ไม่เพียงแค่สร้างค่า pH เท่านั้น แต่ยังให้ไอออนที่ช่วยปรับปรุงการนำไฟฟ้าอีกด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ได้แก่ TAE (Tris-acetate-EDTA) และ TBE (Tris-borate-EDTA) เป็นต้น (สุกัญญา สุนทรส, 2549)

2.2.7 การตรวจหาสิ่งมีชีวิตจากการตรวจสอบร่องรอยดีเอ็นเอในสิ่งแวดล้อม (Environmental DNA หรือ eDNA)

eDNA เกิดจากการรวมตัวกันของดีเอ็นเอจากการขับถ่าย การผลัดเซลล์ผิวหนังหรือการสลายตัวของสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้ว ซึ่งดีเอ็นเอสามารถอยู่ภายในเซลล์ (ยังคงมีอยู่ภายในเซลล์ซึ่งประกอบด้วย eDNA ที่สามารถตรวจพบได้) หรือปล่อยออกมานอกเซลล์ การที่ดีเอ็นเอถูกย่อยสลายขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม โดย eDNA นั้นล่องลอยไปในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่เป็นแหล่งน้ำที่สามารถพัดพา eDNA ไหลได้เร็ว จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับร่องรอยของ eDNA ที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลงเหลือในแหล่งน้ำหรือทะเลสาบ ว่ามีมากน้อยเพียงใด ซึ่งการวิจัยเบื้องต้นชี้ให้เห็นว่า eDNA สามารถเคลื่อนตัวไปมาได้ระหว่างระยะทางสั้น ๆ หรือระยะทางหลายกิโลเมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมบางประการ (Littlefair *et al.*, 2021) ไม่ว่าจะเกิดจากผลกระทบจากจุลินทรีย์ UV ความร้อน ความเป็นกรด และเอนไซม์ (Klymus *et al.*, 2015; Lance *et al.*, 2017; Sansom and Sassoubre, 2017; Sassoubre *et al.*, 2016; Strickler *et al.*, 2015) ทุกอย่างล้วนเป็นการเร่งการย่อยสลายของ eDNA

2.2.7.1 วิธีการวิเคราะห์ eDNA

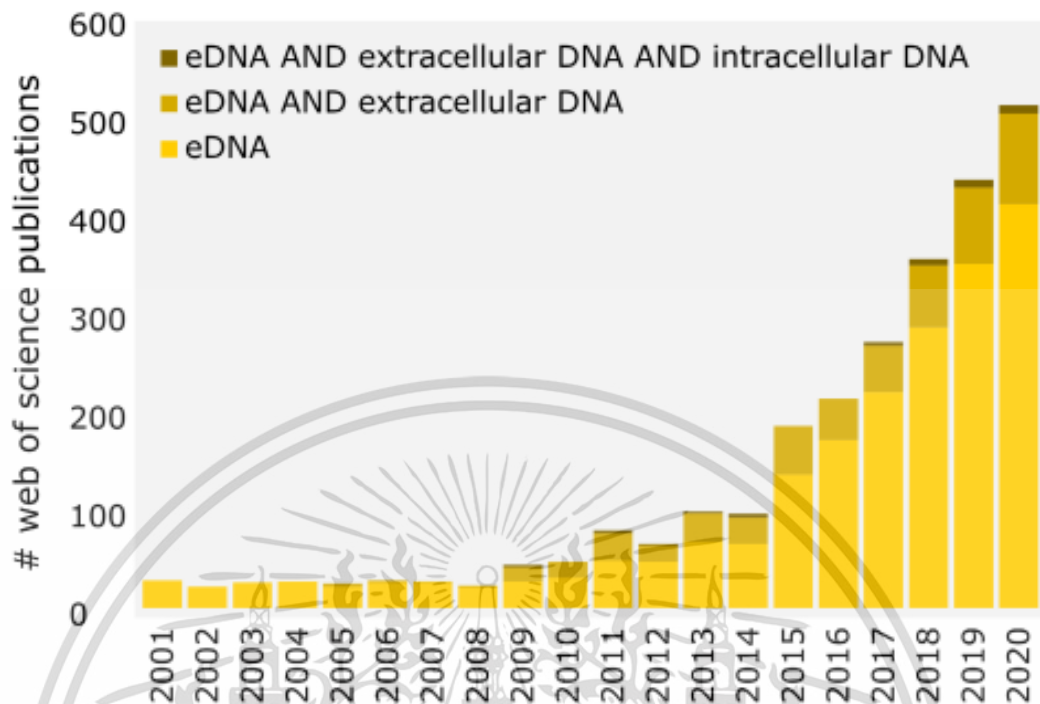
eDNA คือ ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อม เมื่อสิ่งมีชีวิตมีปฏิสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อม ดีเอ็นเอจะถูกขับออกมาและมีการสะสมในสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างแหล่งของ eDNA นั้นจะรวมถึงอุจจาระ เมือก ผิวหนัง ขน และแกมิต เป็นต้น ซึ่ง eDNA นั้นสามารถเก็บรวบรวมจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น ดิน น้ำจืด น้ำทะเล หิมะ หรือแม้แต่อากาศ (Ficetola *et al.*, 2008) แทนการสุ่มตัวอย่างโดยตรงจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ในปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคการตรวจสอบ eDNA มาช่วยในการตรวจสอบหาสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมอย่างแพร่หลายมากขึ้น สามารถตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิตทั้งในชนิดพันธุ์ที่พบเจอได้ทั่วไป ชนิดพันธุ์รุกราน ชนิดพันธุ์หายากหรือชนิดพันธุ์ที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ โดยไม่ต้องมีการเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่สนใจ ยังสามารถระบุได้ว่าประชากรของสิ่งมีชีวิตใกล้สูญพันธุ์กำลังลดลงหรือไม่ และสามารถตรวจสอบได้ว่าประชากรชนิดพันธุ์รุกรานกำลังเพิ่มขึ้นหรือลดน้อยลง โดยก่อนที่จะมีการนำ eDNA มาใช้ มีวิธีหลักในการศึกษาความหลากหลายของแหล่งน้ำด้วยการใช้วิธีการจับปลาและการดักจับซึ่งต้องใช้งบประมาณ และแรงงานที่มีทักษะในการเก็บตัวอย่าง และการจัดจำแนกชนิดพันธุ์จำนวนมาก ในขณะที่ eDNA ต้องการเพียงตัวอย่างน้ำเท่านั้น (Tsuji *et al.*, 2017) จึงมีความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตที่เป็นชนิดพันธุ์หายากหรือชนิดพันธุ์ที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ อีกทั้งยังมีความแม่นยำในการตรวจสอบสูง (Bergman *et al.*, 2016)

เทคนิค eDNA ถือเป็นเครื่องมือทางอนุชีววิทยาที่กำลังเป็นที่นิยมอย่างมากในทั่วโลก เนื่องด้วยมีประสิทธิภาพในการตรวจหา ตรวจจับ หรือตรวจสอบการมีอยู่ของสิ่งมีชีวิตทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ในสิ่งแวดล้อมได้ดี โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษาและสิ่งมีชีวิตที่ไม่ได้ศึกษาที่อาศัยอยู่บริเวณสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ อีกทั้งยังพบว่าตั้งแต่ปี 2009 ถึง 2019 มีการค้นหางานวิจัยที่ใช้ eDNA จากทั่วโลกกว่า 50 ประเทศ ที่มีความสนใจนำเทคนิค eDNA มาใช้ในการพัฒนางานวิจัย (Garlapati *et al.*, 2019) การวิเคราะห์ eDNA ช่วยให้สามารถประเมินความหลากหลายทางชีวภาพในวงกว้างเพื่อระบุและติดตามสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด รวมถึงจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ (Barnes and Turner, 2016; Deiner *et al.*, 2017; Goldberg *et al.*, 2016; Sepulveda *et al.*, 2020) ด้วยเหตุนี้ วิธีการดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้ในการวิจัยจำนวนมาก ซึ่งสะท้อนได้จากจำนวนสิ่งพิมพ์ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมา แต่โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงปี 2015 ถึง

2020 ที่ผ่านมา (Rodríguez-Ezpeleta *et al.*, 2021) ดังรูปที่ 2.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.15 จำนวนบทความรวมถึงคำค้นหาต่าง ๆ บน webofknowledge.com ระหว่างปี 2001 ถึง 2020

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Nagler *et al.*, 2022)

2.2.7.2 วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำ

โดยในแต่ละงานวิจัยนั้นมีขั้นตอนการเก็บตัวอย่างน้ำที่ปริมาณแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสถานที่เก็บตัวอย่างน้ำ กระแสน้ำ ชนิดของน้ำ หรือลักษณะของสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษา ซึ่ง ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ใช้ในแต่ละงานวิจัยมีตั้งแต่ 15 มิลลิลิตร ถึง 10 ลิตร หรือที่สูงที่สุดอยู่ที่ 3800 ลิตร แต่ที่เป็นปริมาตรมาตรฐานที่นิยมใช้เก็บตัวอย่างน้ำนั้นอยู่ที่ 1-2 ลิตร

จากงานวิจัยในปัจจุบันสามารถแบ่งกลุ่มปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการศึกษา ออกเป็นกลุ่มได้ดังนี้ กลุ่มที่หนึ่ง คือกลุ่มงานวิจัยที่เก็บตัวอย่างน้ำในปริมาณน้อยกว่า 1 ลิตร คือ ตั้งแต่ 15 มิลลิลิตร ถึง 750 มิลลิลิตร ดังเช่นในงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ eDNA ของ Robinson *et al.* (2019) ที่ทำการศึกษาปลาหินโมโรโกะหรือปลาปากบน (*Pseudorasbora parva*) ที่แพร่พันธุ์อย่างรวดเร็วที่ประเทศอังกฤษด้วย วิธี eDNA โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำ 3 แห่ง แห่งละ 15 มิลลิลิตร และที่ปริมาตร 750 มิลลิลิตร จากบ่อบำบัด และสามารถตรวจหาปลาหินโมโรโกะหินหรือ ปลาปากบน ได้จากตัวอย่างน้ำทั้งสองปริมาตร เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ทำการตรวจหาปลาบู (*Gobiidae* spp.) 5 ชนิด จากแหล่งน้ำจืดของ (Irene and Patricia, 2016) ได้เก็บตัวอย่างน้ำ

ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในประเทศสวีเดนแลนด์ ซึ่งในการศึกษานี้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำที่บริเวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหน้าดินจึงมีการใช้อุปกรณ์ที่จำเพาะเพื่อรวบรวมดีเอ็นเอของปลาบู่ 5 ชนิด จากตัวอย่างน้ำที่ทำการเก็บทำให้สามารถตรวจพบการรุกรานของปลาบู่ ได้ 4 สถานีจากทั้งหมด 12 สถานี

กลุ่มที่สองทำการเก็บตัวอย่างน้ำในปริมาตรปานกลาง ที่ 1 ลิตร ถึง 2 ลิตร ซึ่งเป็นปริมาตร การเก็บตัวอย่างน้ำที่เป็นที่นิยมที่สุด โดยงานวิจัยของ Takahara *et al.* (2013) ได้ประเมินการแพร่พันธุ์ของปลาลูกกรอก (Lepomis macrochirus) ซึ่งเป็นชนิดพันธุ์รุกรานโดยเก็บตัวอย่างน้ำที่ปริมาตร 1 ลิตร จาก 70 บ่อที่ตั้งอยู่ในพื้นที่ 7 แห่งบนแผ่นดินใหญ่ (mainland) และเกาะรอบ ๆ ของประเทศญี่ปุ่น โดยเก็บจากผิวน้ำของแต่ละบ่อ เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของปลาลูกกรอก และได้มีบันทึกการตรวจพบและการตรวจไม่พบปลาลูกกรอกบริเวณชายฝั่งจากการสำรวจด้วยวิธีสังเกต และสามารถตรวจพบปลาลูกกรอกได้ 19 บ่อจากทั้งหมด 70 บ่อ นอกจากนี้ Mahon *et al.* (2013) ได้ตรวจหาปลาเอเชียคาร์พที่แม่น้ำในรัฐชิคาโก โดยใช้ปริมาตรน้ำ 2 ลิตร ที่บริเวณผิวน้ำของแม่น้ำ Little Calumet ครอบคลุมทั้งทางทิศใต้และทิศตะวันตก (ปลายน้ำ) ของประตูกั้นน้ำ Thomas J. O'Brien (Thomas J. O'Brien Lock) จากการศึกษาพบว่าปริมาตรตัวอย่างน้ำเพียง 2 ลิตร ก็สามารถตรวจพบปลาเอเชียคาร์พได้ อีกทั้ง Bergman *et al.* (2016) ได้ใช้เทคนิค eDNA ในการตรวจหาปลากรีนสเตอร์เจียน (*Acipenser medirostris*) ที่รัฐแคลิฟอร์เนีย เนื่องจากปลาชนิดพันธุ์นี้ถูกพบเห็นได้น้อยลงจากการสร้างเขื่อนที่เป็นผลให้เกิดการขัดขวางการเดินทางมาผสมพันธุ์และวางไข่ โดยการเก็บตัวอย่างน้ำทุก ๆ 100 เมตร ที่บริเวณต้นน้ำและปลายน้ำ ของแม่น้ำซาคาแมนโต เพื่อให้ครอบคลุมในการหาดีเอ็นเอของปลากรีนสเตอร์เจียน (*Acipenser medirostris*) ตัวอย่างน้ำถูกเก็บ ณ บริเวณที่ทราบว่ามีปลาสเตอร์เจียนอยู่ และปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ทำการเก็บนั้นคือ 2 ลิตร ซึ่งสามารถตรวจสอบพบปลากรีนสเตอร์เจียนทั้งบริเวณต้นน้ำและปลายน้ำได้เป็นอย่างดี เช่นเดียวกับ Simpfendorfer *et al.* (2016) ที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 2 ลิตร ในการศึกษาตรวจหาปลาฉลาม (*Pristis microdon*) ที่ใกล้สูญพันธุ์ในแม่น้ำดาเลีย ประเทศออสเตรเลีย โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากอควาเรียมและจากแม่น้ำดาเลีย ซึ่งตัวอย่างน้ำจากอควาเรียมทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 4 ชั่วโมง เก็บในภาชนะขนาด 2 ลิตรจากถึง 3 ถึง หนึ่งถึงมีปลาฉลามอยู่ และอีกสองถึงนั้นไม่มีปลาฉลาม มีเพียงสิ่งมีชีวิตในทะเลเขตร้อนมากกว่า 100 ชนิด นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างควบคุมเชิงลบ 1 ตัวอย่าง และในส่วนของเก็บตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำดาเลีย ได้เก็บตัวอย่างจากทั้งบริเวณกลุ่มแม่น้ำและแม่น้ำสายหลัก รวมทั้งหมด 8 สถานี ซึ่งแต่ละจุดที่ทำการเก็บตัวอย่างนั้นเป็นพื้นที่ ที่มีปลาฉลามอยู่ และมีตัวอย่างน้ำที่เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงลบ 1 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบปลาฉลามได้ ด้วยวิธีการตรวจสอบ eDNA แต่ในทางกลับกันการใช้ตาข่ายดักจับนั้นไม่สามารถตรวจพบปลาฉลามได้ Pflieger *et al.* (2016) ได้ทำการศึกษาตรวจหาปลาอีลฟ์ สเตอร์เจียน (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) และปลาอลาบามา สเตอร์เจียน (*Scaphirhynchus suttkusi*) ซึ่งเป็นปลาสเตอร์เจียนชนิดพันธุ์หายากเพื่อที่จะทำการอนุรักษ์ปลาชนิดพันธุ์นี้ไว้ โดยใช้ตัวอย่างน้ำในปริมาตร 1 ลิตร สุ่มจากสถานีละ 2 ชั่วโมง ที่แม่น้ำทอมบิกปีและแม่น้ำอลาบามา สำหรับการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งมีวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างน้ำโดยการเก็บในภาชนะเก็บความเย็น เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอภายใน 24 ชั่วโมงของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเก็บตัวอย่างน้ำ จากการทำวิจัยสามารถตรวจพบปลาทั้งสองชนิด และยืนยันได้ว่าที่แม่น้ำทอมบิกปีและแม่น้ำอลาบามายังคงมีปลาทั้งสองชนิดอาศัยอยู่นั่นเอง และงานวิจัยที่ใช้ตัวอย่างน้ำที่ปริมาตร 2 ลิตร คืองานวิจัยของ Keskin (2014) ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ 15 สถานี และเก็บตัวอย่างน้ำสถานีละ 2 ลิตร ตัวอย่างน้ำถูกเก็บในภาชนะปลอดเชื้อ และนำไปที่ห้องปฏิบัติการด้วยการเก็บรักษาในภาชนะเก็บความเย็น เพื่อตรวจหาปลาชนิดพันธุ์รุกรานในแหล่งน้ำจืดโดยใช้เทคนิค eDNA พบว่ามี การถูกรุกรานจากปลาตุ๊กแอฟริกา (*Clarias gariepinus*) ปลาการ์ปรัสเซีย (*Carassius gibelio*) ปลาไนล์ (*Oreochromis Niloticus*) และปลาโมโรโกะหินหรือปลาปากบน (*Pseudorasbora parva*) ที่ประเทศตุรกี ในทุก ๆ สถานีที่ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ

กลุ่มที่สามคือกลุ่มที่มีการเก็บน้ำในปริมาณมาก ได้แก่งานวิจัยที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำที่มากกว่า 2 ลิตร จากงานวิจัยของ Eva *et al.* (2016) ในการตรวจหาปลาบิก (*Pangasianodon gigas*) ในแม่น้ำโขง (ไทย กัมพูชา และลาว) โดยเก็บตัวอย่างที่บริเวณผิวน้ำ กลางน้ำและพื้นท้องน้ำเป็นปริมาตร 1 ลิตร และเก็บตัวอย่างน้ำจากศูนย์วิจัยน้ำจืด จังหวัดหนองคาย ประเทศไทย ปริมาตร 10 ลิตร เพื่อตรวจหาการมีอยู่ของปลาบิก และพบว่าปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ 1 ลิตร และ 10 ลิตร สามารถตรวจพบปลาบิกได้เช่นเดียวกัน อีกทั้ง Mahon *et al.* (2013) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิค eDNA ในการตรวจหาปลาเอเชียคาร์พ (*Cyprinus spp.*) ที่รัฐชิคาโก โดยเก็บตัวอย่างน้ำสองปริมาตร คือเก็บตัวอย่างน้ำจากถังเลี้ยงลูกปลาคราฟที่ปริมาตร 3,800 ลิตร และเก็บตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำปริมาตร 2 ลิตร โดยที่ปริมาตรตัวอย่างน้ำ 3800 ลิตร สามารถตรวจพบปลาคราฟได้เช่นเดียวกับปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ 2 ลิตร ซึ่งยังมีงานวิจัยที่หลากหลายที่มีการเก็บตัวอย่างน้ำปริมาตรที่แตกต่างกันดังตารางที่ 1

การเก็บตัวอย่างน้ำนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาตรน้ำเพียงอย่างเดียว แต่ยังรวมถึงการมีปริมาณดีเอ็นเอที่เพียงพอในช่วงเวลาที่มีการสุ่มตัวอย่าง ความหนาแน่นของดีเอ็นเอที่ปล่อยออกมานั้นขึ้นอยู่กับอัตราการขับถ่ายของสิ่งมีชีวิตเป้าหมายซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิด วงจรชีวิต และอัตราการเผาผลาญ Eva *et al.* (2016) อีกทั้งสถานที่เก็บตัวอย่างน้ำยังเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่จะเพิ่มโอกาสในการตรวจหาสิ่งมีชีวิตได้ (Civade *et al.*, 2016; Deiner and Altermatt, 2014; Pilliod *et al.*, 2014) แม้ว่าปริมาตรน้ำที่เก็บรวบรวมในการศึกษา eDNA นั้นมักจะต่ำกว่า 2 ลิตร แต่ก็แสดงให้เห็นว่าปริมาตรน้ำมีอิทธิพลและส่งผลต่อการการตรวจพบ eDNA

2.2.7.3 ขนาดและประเภทของกระดาษกรองตัวอย่างน้ำ

การตรวจสอบ eDNA นั้น เรื่องของขนาดรูพรุนและประเภทของกระดาษกรองตัวอย่างน้ำถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งที่จะช่วยให้งานวิจัยนั้นบรรลุจุดประสงค์ของการศึกษา เนื่องจากกระดาษกรองนั้นทำหน้าที่ดักจับดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำไว้ ซึ่งขนาดรูพรุนของกระดาษกรองนั้นมีหลากหลายขนาดขึ้นอยู่กับลักษณะตัวอย่างน้ำ สิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษา และจุดประสงค์ของงานวิจัย โดยขนาดของกระดาษกรองนั้นมีตั้งแต่ขนาด 0.22 μM และขนาดที่ใหญ่ที่สุดคือ 20 μM ซึ่ง

ขนาดกระดาษกรองที่ 0.22 μM นั้นเป็นขนาดของกระดาษกรองที่นิยมที่สุด ส่วนประเภทของกระดาษกรองนั้นจะแตกต่างกันไปในแต่ละงานวิจัย

โดยงานวิจัยของ Bergman *et al.* (2016) ได้ใช้กระดาษกรอง Millipore Sterivex - GP 0.22 μM (EMD Millipore) ในการตรวจหาปลากรีนสเตอร์เจียน ซึ่งทำให้สามารถตรวจสอบพบปลากรีนสเตอร์เจียนทั้งบริเวณต้นน้ำและปลายน้ำได้เป็นอย่างดี งานวิจัยของ Keskin *et al.* (2016) กรองตัวอย่างน้ำที่ได้จากทะเลสาบอิซนิคด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 μM ประเภท cellulose nitrate filters ในการหาดีเอ็นเอของปลาชนิดพันธุ์รุกราน โดยตัวอย่างน้ำทั้งหมดถูกกรองภายใน 48 ชั่วโมง หลังจากสู่มตัวอย่าง และกระดาษที่มี eDNA นั้นใช้ในการสกัดดีเอ็นเอหรือเก็บรักษาแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ จากการศึกษาของงานวิจัยนี้ทำให้พบว่าในแม่น้ำอิซนิคมีปลาที่เป็นทั้งปลาทางเศรษฐกิจ ปลาชนิดพันธุ์รุกราน และปลาที่ถูกพบเป็นครั้งแรกอีกด้วย และในปี 2014 นั้นยังได้ทำการศึกษการตรวจสอบปลาชนิดพันธุ์รุกรานที่แม่น้ำประเทศตุรกี โดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.22 μM พบว่ามีการถูกรุกรานจากปลาดุกแอฟริกา (*C. gariepinus*) ปลาคาร์พปรัสเซีย (*C. gibelio*) ปลานิล (*O. niloticus*) และปลาโมโรโกะหินหรือปลาปากบน (*P. parva*) ทั้งสี่ชนิดที่บริเวณแม่น้ำซาคาร์ยาในทุก ๆ สถานที่ทำการสู่มเก็บตัวอย่างงานวิจัยของ Hänfling *et al.* (2016) ที่ทำการศึกษาชุมชนของปลาในทะเลสาบด้วยเทคนิค eDNA โดยมีขั้นตอนในการกรองตัวอย่างน้ำโดยใช้กระดาษกรองประเภทเซลลูโลสไนเตรต ขนาด 0.45 μM (sterile 0.45 μM cellulose nitrate membrane filters) อุปกรณ์การกรองต่าง ๆ ถูกฆ่าเชื้อก่อนการใช้งานทุกครั้ง ในการศึกษาค้นครั้งนี้ทำให้สามารถตรวจพบปลาทั้งหมด 14 ชนิดพันธุ์ จาก 16 ชนิดพันธุ์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิค eDNA สามารถประเมินความชุกชุมของปลาได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Bracken *et al.* (2019) ได้ใช้กระดาษกรองประเภทเซลลูโลส ไนเตรต ขนาด 0.45 μM (0.45 μM Whatman cellulose nitrate filters) ในการศึกษาการระบุแหล่งวางไข่และแหล่งที่อยู่อาศัยของปลาแลมเพรย์ (*Petromyzon marinus*) โดยใช้เทคนิค eDNA สำหรับขั้นตอนการกรองตัวอย่างน้ำทำการกรองใน 24 ชั่วโมงหลังจากการเก็บตัวอย่างน้ำ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส พบว่างานวิจัยนี้สามารถตรวจสอบแหล่งวางไข่และแหล่งอาศัยของปลาแลมเพรย์ได้ งานวิจัยของ Eva *et al.* (2016) นั้นได้ใช้กระดาษกรองประเภท Capsule (Envirochek HV 1 μM , Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA) หลังจากเก็บตัวอย่างน้ำมาได้ทำการใส่เอธานอลลงในแคปซูลเก็บตัวอย่างน้ำ และแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นการรักษาสภาพของ eDNA จนกระทั่งถึงห้องปฏิบัติการและทำการสกัดดีเอ็นเอ ในการศึกษาตรวจสอบปลาบิกในแม่น้ำโขงและพบว่าสามารถตรวจพบปลาบิกได้ การศึกษาตรวจหาปลาปลากัลป์ สเตอร์เจียน (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) และปลาอลาบามา สเตอร์เจียน (*Scaphirhynchus suttkusi*) ได้ใช้กระดาษกรองขนาด 1.5 μM ประเภท glass fiber filters (Whatman) อุปกรณ์ต่าง ๆ ของเครื่องกรองที่ใช้ได้ผ่านการฆ่าเชื้อก่อนการกรองตัวอย่างทุกครั้ง หลังจากการกรองเก็บตัวอย่างไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสกัดดีเอ็นเอ โดยจากการทำวิจัยสามารถตรวจพบปลาทั้งสองชนิดและยืนยันได้ว่าที่แม่น้ำทอมบิกปีและแม่น้ำอลาบามา ยังคงมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลาทั้งสองชนิดอาศัยอยู่นั่นเอง (Pfleger *et al.*, 2016) อีกทั้ง Takahara *et al.* (2013) ได้ใช้กระดาษกรองขนาด 3.0 μM ประเภท cellulose acetate (Advantec, Saijo, Japan) ในการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอของปลาบลูกริลชันฟิช (*Lepomis macrochirus*) เพื่อการตรวจสอบการมีอยู่ของปลาบลูกริลชันฟิชที่เป็นชนิดพันธุ์รุกรานในแหล่งน้ำของประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากพบว่าขนาดรูพรุนนี้เหมาะสมที่สุดสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ โดยแผ่นกรองแต่ละแผ่นที่ผ่านการกรองตัวอย่างน้ำจะถูกพับเก็บโดยการห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ที่ปลอดเชื้อ และเก็บรักษาไว้ที่ -25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งการวิเคราะห์เพิ่มเติม อุปกรณ์กรองทั้งหมดถูกล้างด้วยน้ำกลั่นระหว่างการกรองเพื่อป้องกันการปนเปื้อน ทำให้ตรวจพบปลาบลูกริลชันฟิชได้ 19 บ่อจากทั้งหมด 70 บ่อ และงานสุดท้าย (Simpfendorfer *et al.*, 2016) ได้ใช้กระดาษกรองขนาด 20 μM ประเภท nylon filter (Merck Millipore) ในการศึกษาตรวจหาปลาฉลามที่ใกล้สูญพันธุ์ในแม่น้ำดาเลีย ประเทศออสเตรเลีย สามารถตรวจพบปลาฉลามได้ถึง 7 สถานี จากงานวิจัยข้างต้นสามารถใช้การวิเคราะห์ eDNA ในการตรวจสอบชนิดพันธุ์ทั่วไป ชนิดพันธุ์รุกราน และชนิดพันธุ์หายากได้ โดยส่วนใหญ่ใช้ขนาดกระดาษกรองที่มีรูพรุน 0.22 μM . แม้จะใช้ประเภทของกระดาษกรองที่แตกต่างกันก็ตาม ซึ่งยังมีงานวิจัยที่หลากหลายที่มีการใช้ชนิด ประเภท ขนาดรูพรุนของกระดาษกรองที่แตกต่างกันดังตารางที่ 1

อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาเพียงเล็กน้อยที่ทำการศึกษาเพื่อกำหนดขนาดอนุภาคของ eDNA โดยในการศึกษาการกระจายตัวขนาดอนุภาค eDNA จากปลาบรูคเทราต์ ได้ชี้ให้เห็นว่าอนุภาคขนาด 1.2 - 10 ไมโครเมตรเป็นขนาดที่พบมากที่สุดของ eDNA จากปลาบรูคเทราต์ ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานที่ว่า eDNA ในสิ่งแวดล้อมประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็กที่รวมตัวกันอย่างหลวม ๆ ส่งผลให้มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสูง (Wilcox *et al.*, 2015) ดังนั้น eDNA ที่ถูกรวบรวมในตัวอย่างน้ำขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ eDNA ที่ปล่อยออกมา ทั้งอัตราการคงอยู่ การสลายตัว การกระจายตัวตามลักษณะแหล่งน้ำ และวิธีการสุ่มตัวอย่าง (Pilliod *et al.*, 2014) และที่สำคัญปริมาณ eDNA ที่ศึกษาสามารถมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความหนาแน่นของสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย (Wilcox *et al.*, 2015) ดังนั้นในการศึกษา eDNA นั้นต้องมีการวางแผนการทดลองที่รอบคอบ และครอบคลุมในการเก็บตัวอย่างน้ำ

ตารางที่ 1 สรุปปริมาณ วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำ และประเภทกระดาษกรองที่ใช้ในการตรวจหา eDNA ในแหล่งน้ำ

ปริมาณและวิธีเก็บ ตัวอย่างน้ำ	ประเภทกระดาษ กรอง	สถานที่เก็บ ตัวอย่าง	อ้างอิง
250 mL	1.2 μ m isopore membrane filter	Mesocosm	Barnes <i>et al.</i> (2014)
15 mL: collection	N/A	Containers	Collins <i>et al.</i> (2013)
15 mL	N/A	Beaker, artificial/ experimental pond, natural pond	Dejean <i>et al.</i> (2011, 2012)
15 mL	N/A	Aquaria, natural pond	Ficetola <i>et al.</i> (2008)
15 mL collected at a depth of c. 50 cm	N/A	Seawater	Foote <i>et al.</i> (2012)
5 L or 10 L collection with a peristaltic pump	0.45 μ m cellulose nitrate filter	Stream	Goldberg <i>et al.</i> (2011)
250 mL: collection with disposable paper cups	0.45 μ m cellulose	Plastic containers	Goldberg <i>et al.</i> (2013)
4 L or 5 L complete submersion of sterile containers	0.45 μ m cellulose	Plastic containers	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 สรุปปริมาณ วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำ และประเภทกระดาษกรองที่ใช้ในการตรวจหา eDNA ในแหล่งน้ำ (ต่อ)

ปริมาณและวิธีเก็บ ตัวอย่างน้ำ	ประเภทกระดาษ กรอง	สถานที่เก็บ ตัวอย่าง	อ้างอิง
2 L: collection of surface water	1.5 μm glass fibre filter	River	Jerde <i>et al.</i> (2011, 2013)
20 L	0.22 μm Durapore membrane filter	Aquaria	Kelly <i>et al.</i> (2014)
2 L: collection of surface water	1.5 μm glass fibre filter	River	Mahon <i>et al.</i> (2013)
2 L: collection of surface water	3 μm isopore polycarbonate filter	River	Minamoto <i>et al.</i> (2012)
120 mL: collection of surface water	N/A	Tank	
2, 4, 8 L collection of surface water	1.5 μm glass fibre filter	Tank	Olson, Briggler and Williams (2012)
	collection of surface water	River	
5 L collection in sterile bottles	N/A	Tank (trash can/ field site (not specified)	Piaggio <i>et al.</i> (2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 สรุปปริมาณ วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำ และประเภทกระดาษกรองที่ใช้ในการตรวจหา eDNA ในแหล่งน้ำ (ต่อ)

ปริมาณและวิธีเก็บ ตัวอย่างน้ำ	ประเภทกระดาษ กรอง	สถานที่เก็บ ตัวอย่าง	อ้างอิง
500 mL: collection of surface water	0.45 μ m cellulose nitrate filter	Aquaria/ glass mason containers/ streams	Pilliod <i>et al.</i> (2013, 2014)
1 or 2 L peristaltic pump or hand vacuum pump	0.45 μ m cellulose nitrate filter	streams	Pilliod <i>et al.</i> (2013, 2014)
1.5 L (pool of 30* 50 mL subsamples): collected from surface water at depths of 1.5 - 6 m	0.45 μ m nylon filter	Seawater	Thomsen <i>et al.</i> (2012a)
15 mL	N/A	Pond/ lake/ streams/ mesocosm	Thomsen <i>et al.</i> (2012b)
6 L collection with a peristaltic pump	1.5 μ m glass fibre filter	Stream	Wilcox <i>et al.</i> (2013)

2.2.7.4 ไพรเมอร์และปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ใช้สำหรับงาน eDNA

สำหรับขั้นตอนการวิเคราะห์ผล eDNA นั้น ไพรเมอร์และปฏิกิริยาลูกโซ่ถือเป็นอีกขั้นตอนสำคัญที่สามารถช่วยให้งานวิจัยบรรลุเป้าหมายได้ ซึ่งในแต่ละงานวิจัยมีการใช้ไพรเมอร์และปฏิกิริยาลูกโซ่ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของงานวิจัยนั้น

Simpfendorfer *et al.* (2016) ใช้เทคนิค eDNA ในตรวจสอบหาปลาฉลามฟัน

ใหญ่ในธรรมชาติที่พบว่าใกล้สูญพันธุ์โดยอาศัยไพรเมอร์ที่ได้จากยีน COI คือ PZ - COI F1: 5'-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CCTCCTTCTACTAGCCTCTGCC-3' และ PZ - COI R1: 5'-GGAAGAGATACCAGCTAAGTGCAA-3' และใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ในช่วง Denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Annealing 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ช่วง Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และช่วงสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ส่งผลให้สามารถตรวจสอบหาปลาฉลามปากฟืนใหญ่ที่มีน้ำตาได้

Shaw *et al.* (2016) ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค eDNA เพื่อศึกษาอะไรโดยมีการใช้ไพรเมอร์จากยีน 12S ribosomal DNA (12S rDNA) คือ 12S vertebrate F (V5F) 5' CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGxxxxxxTTAGATACCCCACTATGC 3' และ 12S vertebrate R (V5R) 5' CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTAGAACAGGCTCCTCTAG 3' สำหรับสัตว์มีกระดูกสันหลัง และยีน 16S ribosomal DNA (16S rDNA) สำหรับปลา คือ 16S fish-specific F 5' CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGxxxxxxGGTCGCCCAACCRAAG 3' และ 16S fish-specific R 5' CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCGAGAAGACCCTWTGGAGCTTIAG 3' ซึ่งในขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่นั้นได้ปฏิบัติตามดังนี้ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ช่วง Annealing 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และช่วงสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

Mahon *et al.* (2013) ได้ตรวจหากลุ่มปลาเอเชียคาร์พที่แม่น้ำในรัฐชิคาโก โดยใช้ไพรเมอร์จากยีน Mitochondrial cytochrome oxidase II (COII) คือ BLC-COII-F 5' AAACCTACCAACAAATAC 3' และ BLC-COII-R 5' TATCATTGATGTCCTATG 3', ยีน COI คือ GFCCCOI-F 5' AGCCCACGCAGGAGCATCAG 3' และ GFCC-COI-R 5' ACGGCGTTACAAGCACGGA 3' และยีน NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2 (ND2) คือ GRC-ND2-F 5' AATCAACTTAGCAATCATTCCA 3' และ GRC-ND2-R 5' TATTTATATCTCACTCTCCTGTAA T3' และได้ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ในการวิเคราะห์ผล ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Annealing 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ช่วงสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที และได้ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ดังต่อไปนี้สำหรับปลาทอง ปลาไน คือ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Annealing 52 เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และช่วงสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 3 นาที ซึ่งสามารถทำให้ตรวจหากลุ่มปลาเอเชียคาร์พได้

Keskin *et al.* (2016) ใช้ยีน *cytb* เพื่อตรวจหาปลาน้ำจืดที่หายากและรุกรานในทะเลสาบอิชนิค ประเทศตุรกี โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ FishCBL 5' TCCTTTTGAGGCGCTACAGT 3' และ FishCBR 5' GGAATGCGAAGAATCGTGTT 3' และใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ในการวิเคราะห์ผล ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ตามด้วย 50 รอบ ของ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วินาที ช่วง Annealing 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ช่วงสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ทำให้ตรวจพบปลาทั้งหมด 23 ชนิดพันธุ์ ปลาชนิดพันธุ์พื้นเมืองที่มีความสำคัญเศรษฐกิจ 8 ชนิด ปลาชนิดพันธุ์รุกราน 3 ชนิด และปลาอีก 5 ชนิดพันธุ์ที่ไม่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าในแต่ละงานวิจัยที่มีการเลือกใช้ไพรเมอร์จากยีนที่ต่างกัน เช่น *COI*, *COII*, *12S rDNA*, *16S rDNA*, *ND2* และ *cytb* จะมีการเลือกใช้เวลาและอุณหภูมิในปฏิกิริยา ลูกโซ่ที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้จะเห็นว่าอุณหภูมิในช่วง Annealing ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายนั้นแตกต่างกัน แต่เวลาที่ใช้ส่วนใหญ่ในขั้นตอนนี้คือ 30 วินาที

2.2.7.5 เทคนิค eDNA กับการประยุกต์ใช้

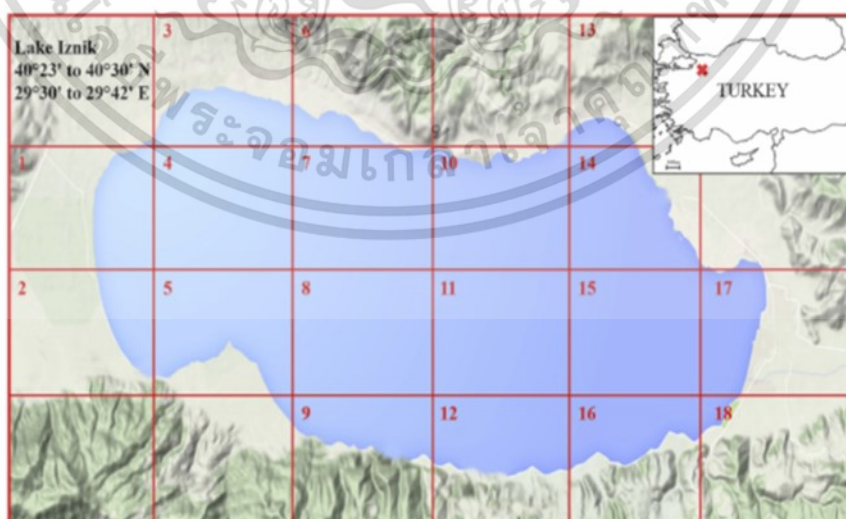
เนื่องจากเทคนิค eDNA นั้นมีความคุ้มค่า และไม่รุกรานสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในระบบนิเวศ อีกทั้งยังมีความละเอียดอ่อนเมื่อเทียบกับวิธีการตรวจสอบแบบดั้งเดิมที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการจัดการประมงและการตรวจสอบความหลากหลายของปลาในระบบนิเวศน้ำจืดและน้ำทะเล (Ruppert *et al.*, 2019) การใช้งานนี้ยังรวมถึงการตรวจสอบสัดส่วนของปลา (composition) โครงสร้างชุมชนของปลา (community) และการเปลี่ยนแปลงเชิงพื้นที่และเชิงเวลาของชุมชนปลาในระบบนิเวศทางน้ำต่าง ๆ เช่น สระ ลำธาร ทะเลสาบ แม่น้ำ ปากแม่น้ำ และอ่าว Pont *et al.* (2018) ได้ทำการวิเคราะห์ความสามารถของ eDNA เพื่อศึกษารูปแบบเชิงปริมาณของความหลากหลายทางชีวภาพของปลาตามแม่น้ำสายสำคัญในยุโรป โดยใช้เมตาบาร์โค้ดในการประเมินการจัดกลุ่มชนิดของปลาที่เป็นชนิดเดียวกันมาอธิบายถึงรูปแบบอนุกรมวิธาน (metabarcoding operational taxonomic units) เพื่อเปรียบเทียบความชุกชุมของชนิดพันธุ์ระหว่างพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง และการเปรียบเทียบกับการสำรวจปลาด้วยการช็อตไฟฟ้า (traditional electrofishing) แบบดั้งเดิม ซึ่งพบว่าเทคนิค eDNA มีความสามารถตรวจพบชนิดปลาได้หลากหลายรวมถึงตรวจพบชนิดพันธุ์หายากได้ Hänfling *et al.* (2016) ได้สาธิตการใช้ eDNA สำหรับการให้ข้อมูลเชิงปริมาณและคุณภาพที่ถูกต้องเกี่ยวกับชุมชนและความชุกชุมของปลาในทะเลสาบขนาดใหญ่ โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลส่วนใหญ่ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธีดั้งเดิม (การใช้ตาข่ายจับปลา) โดยศึกษาชุมชนของปลาในสามทะเลสาบในสหราชอาณาจักร ข้อมูลที่ได้จากการใช้ eDNA พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในแง่ของการตรวจจับชนิดพันธุ์ และข้อมูลที่ได้จาก eDNA ยังสะท้อนถึงชุมชนปลาในทะเลสาบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า eDNA นั้นไวต่อการตรวจหาชนิดพันธุ์ การตรวจสอบความหลากหลายทางชีวภาพ สามารถประเมินความอุดมสมบูรณ์ได้ สามารถอธิบายชุมชนปลาในทะเลสาบขนาดใหญ่ ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ และมีศักยภาพที่ดีในฐานะเครื่องมือเสริมสำหรับวิธีการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตได้

การตรวจหาชนิดพันธุ์หายากและชนิดพันธุ์ที่ใกล้สูญพันธุ์หรือแม้แต่ชนิดพันธุ์รุกราน การนำเทคนิค eDNA มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ของ Balasingham *et al.* (2018) ใช้เครื่องหมาย Cytochrome c oxidase subunit 1 mitochondrial gene (*COI*) เพื่อช่วยตรวจจับปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ 3 ชนิด เป็นปลาชนิดพันธุ์รุกราน 1 ชนิด และเป็นปลาชนิดพันธุ์พื้นเมือง 78 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสองทะเลสาบใหญ่ในสหรัฐอเมริกา และ Keskin *et al.* (2016) ใช้เครื่องหมาย Mitochondrial cytochrome b gene (*cytb*) เพื่อตรวจจับปลาทั้งหมด 23 ชนิดพันธุ์ จากแหล่งสู่มตัวอย่าง 18 แห่งในทะเลสาบอิซนิค ประเทศตุรกี (รูปที่ 2.16) รวมถึงปลาชนิดพันธุ์พื้นเมืองที่มีความสำคัญเศรษฐกิจ 8 ชนิด ปลาชนิดพันธุ์รุกราน 3 ชนิด และปลาอีก 5 ชนิดที่ไม่มีการรายงานก่อนหน้านี้ในงานวิจัยของ Evans *et al.* (2017) ได้ใช้เทคนิค eDNA ตรวจพบปลาทุกชนิดที่เคยตรวจสอบด้วยวิธีทั่ว ๆ ไปจากอ่างเก็บน้ำขนาด 2.2 เฮกษา โดยใช้ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ (Universal primer) สำหรับปลาด้วยกัน 3 คู่ และยังพบปลาอีก 11 ชนิดที่ไม่เคยจับมาก่อน ผลลัพธ์เหล่านี้ไม่เพียงแต่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ eDNA เท่านั้น ในการตรวจสอบความหลากหลายของปลาในน่านน้ำเป้าหมายแต่ยังแสดงให้เห็นว่า eDNA มีแนวโน้มที่จะตรวจพบชนิดพันธุ์ที่หายากหรือชนิดพันธุ์ที่ยากแก่การจับด้วยวิธีการแบบดั้งเดิม

eDNA นั้นสามารถวิเคราะห์ชนิดโดยใช้วิธีการหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) (Thomsen and Willerslev, 2015) โดยนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Gene Bank (Fahner *et al.*, 2016) ในการศึกษาแหล่งน้ำโดยใช้ eDNA นั้น ยังสามารถบ่งชี้องค์ประกอบชุมชนของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำได้ การเข้าถึงข้อมูลพันธุกรรมนี้มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อการทำความเข้าใจขนาดประชากร การกระจายตัวของชนิดพันธุ์ และการเปลี่ยนแปลงประชากรสำหรับชนิดพันธุ์ที่ไม่ได้รับการบันทึกไว้ โดย eDNA นั้นได้ถูกนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ อย่างหลากหลาย เช่น การตรวจสอบตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในน้ำจืด น้ำทะเล ตัวอย่างดินบนบก ตัวอย่างดินในแหล่งน้ำ เป็นต้น (Thomsen and Willerslev, 2015) ซึ่งผลความถูกต้องในการตรวจสอบ eDNA อาจขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัย เช่น ปริมาตรตัวอย่างน้ำหรือดินที่เก็บมาวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ขนาดรูพรุน และประเภทของกระดาษกรอง เป็นต้น



รูปที่ 2.16 แหล่งสู่มตัวอย่างน้ำ 18 แห่งในทะเลสาบอิซนิค ประเทศตุรกี

ที่มา: Keskin *et al.* (2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.8 ข้อดีและประโยชน์ของการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

2.2.8.1 เปรียบเทียบเทคนิค eDNA กับการสำรวจแบบวิธีการดั้งเดิม

สำหรับข้อดีของเทคนิค eDNA ที่เหนือกว่าการสำรวจแบบวิธีการดั้งเดิมได้รับการอธิบายไว้แล้วในการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งมีงานวิจัยหลาย ๆ งานได้ทำการเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบชนิด ด้วยวิธีทางเทคนิค eDNA และวิธีการแบบดั้งเดิม (เช่น การถ่ายภาพสำรวจใต้น้ำ (UV) การตกปลาด้วยไฟฟ้า (EF) และการจับด้วยตาข่าย) ในระบบนิเวศธรรมชาติ

มีการแสดงให้เห็นในกรณีส่วนใหญ่ว่าการสำรวจด้วยเทคนิค eDNA ให้ข้อมูลที่คล้ายกันหรือมีความเป็นไปได้ในการตรวจพบชนิดสัตว์น้ำได้สูงกว่าการถ่ายภาพสำรวจใต้น้ำ (UV) และการตรวจพบชนิดพันธุ์ซ่อนเร้น (cryptic species) ที่ครอบคลุมถิ่นอาศัยได้ดีกว่าวิธีการสำรวจด้วยการมอง (Port *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตาม การสำรวจด้วยเทคนิค eDNA ยังไม่สามารถครอบคลุมทุกชนิดพันธุ์ที่ตรวจพบโดย UV (Mirimin *et al.*, 2021; Valdivia-Carrillo *et al.*, 2021) และเมื่อเปรียบเทียบเทคนิค eDNA กับวิธีการตกปลาด้วยไฟฟ้า (EF) ในแม่น้ำขนาดใหญ่ การตรวจจับด้วยเทคนิค eDNA ทำการตรวจจับได้ไวกว่าเมื่อชนิดพันธุ์นั้น ๆ มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ (Czeglédi *et al.*, 2021; Goutte *et al.*, 2020; McColl-Gausden *et al.*, 2021; McDevitt *et al.*, 2019; Pont *et al.*, 2018; Pont *et al.*, 2021) ในทำนองเดียวกัน Civade *et al.* (2016) และ Pont *et al.* (2018) ยืนยันความเป็นไปได้ในการตรวจจับปลาชนิดพันธุ์ท้องถิ่นโดยใช้เทคนิค eDNA และเปรียบเทียบกับผลลัพธ์จากการสำรวจด้วยวิธี EF เป็นเวลานานในแม่น้ำขนาดใหญ่ เมื่อทำการเปรียบเทียบเทคนิค eDNA กับวิธีการใช้ตาข่ายนั้นงานวิจัยของ Shaw *et al.* (2016) ได้แสดงให้เห็นว่ามีปลาหลายชนิดพันธุ์ถูกตรวจพบโดยเทคนิค eDNA ด้วยไพรเมอร์ 12S rRNA ได้มากกว่าการสำรวจด้วยโพงพาง (fyke net) ใน 3 สถานีของแม่น้ำนอร์ธปารา (North Para river) ในประเทศออสเตรเลีย

อีกประโยชน์จากเทคนิค eDNA คือการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายเมื่อสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นชนิดพันธุ์หายากหรือเมื่อสเกลของการสำรวจมีขนาดใหญ่ เทคนิค eDNA เป็นเครื่องมือสำรวจทางชีววิทยาทางเลือกที่ไม่รู้กราน ประหยัดเวลาและมีความคุ้มค่า อย่างไรก็ตาม เทคนิคของ eDNA นั้นยังมีข้อจำกัดอยู่มากเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการวัดทางสัญญาณวิทยา การวิเคราะห์โครงสร้าง การระบุช่วงชีวิตหรือวิวัฒนาการ และเมื่อเปรียบเทียบโดยตรงกับการสำรวจแบบดั้งเดิมสำหรับการตรวจสอบปลาและการอนุรักษ์ การสำรวจด้วยวิธีดั้งเดิมจะให้ข้อมูลตามเวลาจริงเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของที่อยู่อาศัยและตำแหน่งที่แน่นอนของชนิดพันธุ์เป้าหมาย แต่การใช้เทคนิคของ eDNA อาจสะท้อนให้เห็นข้อมูลในอดีต

ถึงแม้ว่าเทคนิค eDNA จะเป็นวิธีการสำรวจแบบใหม่ แต่ eDNA นั้นมีศักยภาพในการตรวจสอบงานทางชีววิทยา (Zou *et al.*, 2020) และมีความน่าเชื่อถือเพียงพอที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการประเมินระบบนิเวศวิทยาต่าง ๆ (Pont *et al.*, 2021) การศึกษาด้านความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลากหลายทางชีวภาพแบบเดิมคือการสำรวจโดยใช้เครื่องมือทางการประมงแบบดั้งเดิมในการเก็บตัวอย่าง เช่น ตาข่าย อวนลาก หรือกระแสไฟฟ้า เป็นต้น ซึ่งวิธีการดังกล่าวทำให้เกิดการรบกวนหรือทำลายที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตทั้งหมดในแหล่งน้ำ และด้วยวิธีการนี้สามารถกำหนดเป้าหมายสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันไปตามความต้องการศึกษาได้ (Pont *et al.*, 2021) นอกจากนี้ eDNA สามารถตรวจจับสิ่งมีชีวิตที่หายากได้ แต่ eDNA นั้นยังไม่สามารถระบุข้อมูลในเชิงกลุ่มประชากร เช่น อัตราส่วนเพศวัย ขนาด หรืออื่น ๆ ได้ (Goldberg *et al.*, 2016) แม้ว่าการใช้ประโยชน์จากเทคนิค eDNA จะไม่สามารถตอบโจทย์เรื่องทางชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตได้ทั้งหมด แต่มีประโยชน์อย่างมากในการตรวจสอบหาชนิดพันธุ์ที่ใกล้สูญพันธุ์ และกลุ่มสัตว์ต่างถิ่นได้เป็นอย่างดี (Zou *et al.*, 2020) และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพด้านต้นทุนของการตรวจสอบทางชีวภาพด้วยเทคนิค eDNA และการสำรวจแบบวิธีการดั้งเดิม สามารถสรุปได้ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของการตรวจสอบทางชีวภาพด้วยเทคนิค eDNA และการสำรวจแบบวิธีการดั้งเดิม

การประเมินต้นทุน	เทคนิคด้าน eDNA	วิธีการแบบดั้งเดิม
การเก็บตัวอย่าง	ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง ค่าใช้จ่ายราคาไม่สูง	ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างมี ค่าใช้จ่ายราคาค่อนข้างสูง ต้อง จัดหาเครื่องมือจับสัตว์น้ำที่มี ความเฉพาะเจาะจงกับสัตว์น้ำ ที่ต้องการ
การวิเคราะห์ผลตัวอย่าง	ค่าใช้จ่ายขึ้นอยู่กับวัสดุ สิ้นเปลือง และวิธีการวิเคราะห์ ผล ที่มีตั้งแต่อย่างง่ายที่ราคา ไม่สูง ไปจนถึงวิธีการวิเคราะห์ ที่ซับซ้อนและมีราคาสูง	ค่าใช้จ่ายขึ้นอยู่กับน้ำยาเก็บ รักษาสภาพตัวอย่าง และ อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษา ตัวอย่าง
บุคลากร	ใช้บุคลากรจำนวนน้อย ค่าใช้จ่ายราคาไม่สูง	ใช้บุคลากรจำนวนน้อย - มาก ขึ้นอยู่กับความเชี่ยวชาญ เฉพาะด้าน และต้องมีความ ชำนาญทางด้านอนุกรมวิธาน อาจมีต้นทุนตั้งแต่น้อยไปจนถึง มาก

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Littlefair *et al.* (2021)

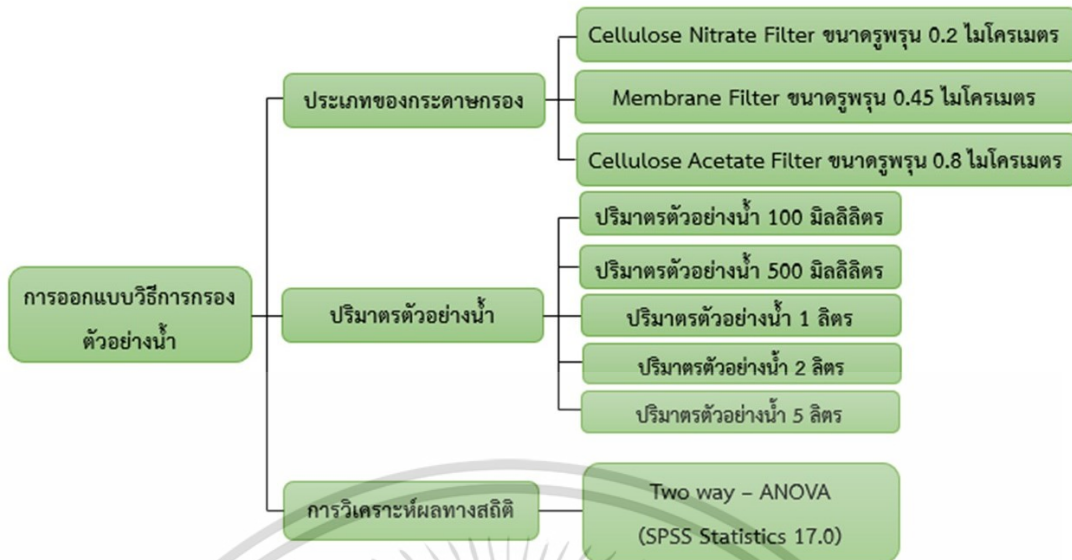
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีการกรองตัวอย่างน้ำ

วิธีการกรองตัวอย่างน้ำได้ทดสอบหาประเภทและขนาดรูพรุนของกระดาษกรองเพื่อให้ได้กระดาษกรองที่มีประสิทธิภาพ และใช้เวลาในการกรองน้อยที่สุดเพื่อช่วยลดเวลาในการทำงานในขั้นตอนการกรองตัวอย่างน้ำ โดยนำกระดาษกรองที่มีความแตกต่างกันในเรื่องของประเภทและขนาดรูพรุน 3 ประเภทที่สามารถหาซื้อได้ในประเทศไทยและมีรายงานการใช้ในงานวิจัยก่อนหน้า ได้แก่ Cellulose Nitrate Filter ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร Membrane Filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร และ Cellulose Acetate Filter ขนาดรูพรุน 0.8 ไมโครเมตร มาทดสอบการกรองตัวอย่างน้ำที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร 1 ลิตร 2 ลิตร และ 5 ลิตร และจับเวลาที่กระดาษกรองทั้ง 3 ประเภทใช้ในการกรองตัวอย่างน้ำที่ปริมาตรต่างกัน การกรองตัวอย่างน้ำนั้นทำการกรองด้วยเครื่องปั๊มน้ำ Peristaltic Pump BT100F (LEAD FLUID) โดยในขั้นตอนการกรองตัวอย่างน้ำที่ทำการกรองด้วยกระดาษกรองทั้ง 3 ประเภทและที่ปริมาตรตัวอย่างน้ำต่าง ๆ นั้นได้ทำการกรองตัวอย่างน้ำอย่างละ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาความแตกต่างของเวลาที่ใช้กรองตัวอย่างน้ำในปริมาตรตัวอย่างน้ำที่แตกต่างกัน โดยใช้ Two way – ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) การคำนวณทางสถิติทั้งหมดจะใช้โปรแกรม SPSS Statistics 17.0 โดยในขั้นตอนนี้จะปฏิบัติตามแผนการดังรูปที่ 3.17



รูปที่ 3.17 แผนการปฏิบัติการทดสอบกระดาษกรองและปริมาณตัวอย่างน้ำเพื่อการพัฒนาวิธีการมาตรฐานสำหรับการเก็บตัวอย่างน้ำ

3.2 การออกแบบไพรเมอร์และการทดสอบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์และการทดสอบไพรเมอร์นั้นเป็นวิธีการเพื่อให้ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับกลุ่มของปลาทุเพียกลุ่มเดียวเท่านั้น ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับกลุ่มปลาทุนั้นได้ถูกพัฒนาขึ้นใหม่โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) ซึ่งเลือกข้อมูลจาก Cytochrome c oxidase I (COI) และจาก mitochondrial cytochrome b (cytb) ของปลาในกลุ่ม *Rastrelliger* spp. เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับกลุ่มปลาทุด้วยโปรแกรม Primer3web version 4.1.0 (<https://primer3.ut.ee/>) เลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน COI และยีน cytb ของปลาทุ (*R. brachysoma*) จากฐานข้อมูล NCBI เป็นตัวแทนในการออกแบบไพรเมอร์ โดยตั้งค่าพื้นฐานตามการแนะนำของโปรแกรม จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ได้จากทั้งสองยีนมา Alignment ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis X (MEGA 11) เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาทุทั้ง 3 ชนิด เพื่อตรวจสอบตำแหน่งที่ไพรเมอร์จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยได้เลือกคู่ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับกลุ่มปลาทุทั้ง 3 ชนิดมากที่สุดมาศึกษาขั้นต่อไป

จากนั้นเมื่อได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบหากกลุ่มปลาทุแล้ว นำไพรเมอร์ที่ได้ทำอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ในการทำฟิชเชอร์ หรือ Temperature Annealing (T_A) โดยตั้งอุณหภูมิในการทำ Polymerase chain reaction (PCR) ในขั้นตอน Annealing ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ถึง 72 องศาเซลเซียส

จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยเปรียบเทียบกับปลาชนิดอื่น ๆ เริ่มจากการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree) ของตัวอย่างปลาในกลุ่ม *Rastrelliger*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spp. และปลาอื่น ๆ ที่จะนำมาเป็น Outgroup โดยเลือกปลาชนิดพันธุ์ที่มักพบอาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกันกับปลาหู ได้แก่ ปลาซาบะ (*Scomber japonicus*) ปลาสีกุน (*Selaroides leptolepis*) ปลาหางแข็ง (*Megalaspis cordyla*) ปลากระทัก (*Stolephorus indicus*) ปลาทรายแดง (*Nemipterus hexodon*) รวมถึงปลาที่มักใช้เป็นตัวอย่างต้นแบบของการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์อย่างปลาม้าลาย (*Danio rerio*) (รูปที่ 3.18) เพื่อดูความแตกต่างทางพันธุกรรมของสัตว์น้ำเป้าหมายคือ ปลาหู และปลาอื่น ๆ ที่นำมาเป็น outgroup โดยการประเมินหาโมเดลที่จะใช้สร้างแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการ อาศัยโปรแกรม jModel Test โดยโมเดลที่ใช้สำหรับยีน *COI* คือ Hasegawa-Kishino-Yano model +G parameter (HKY +I +G) และยีน *cytb* คือ General Time Reversible model +G parameter (GTR +I +G) จากนั้นสร้างแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม MEGA 11 ใช้ ค่า bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ ในทั้ง 2 ยีน



ปลาซาบะ (*S. japonicus*)



ปลาสีกุน (*S. leptolepis*)



ปลาหางแข็ง (*M. cordyla*)



ปลากระทัก (*S. indicus*)



ปลาทรายแดง (*N. hexodon*)



ปลาม้าลาย (*D. rerio*)

รูปที่ 3.18 ลักษณะทางกายภาพของปลาซาบะ (*S. japonicus*) ปลาสีกุน (*S. leptolepis*) ปลาหางแข็ง (*M. cordyla*) ปลากระทัก (*S. indicus*) ปลาทรายแดง (*N. hexodon*) และปลาม้าลาย (*D. rerio*)

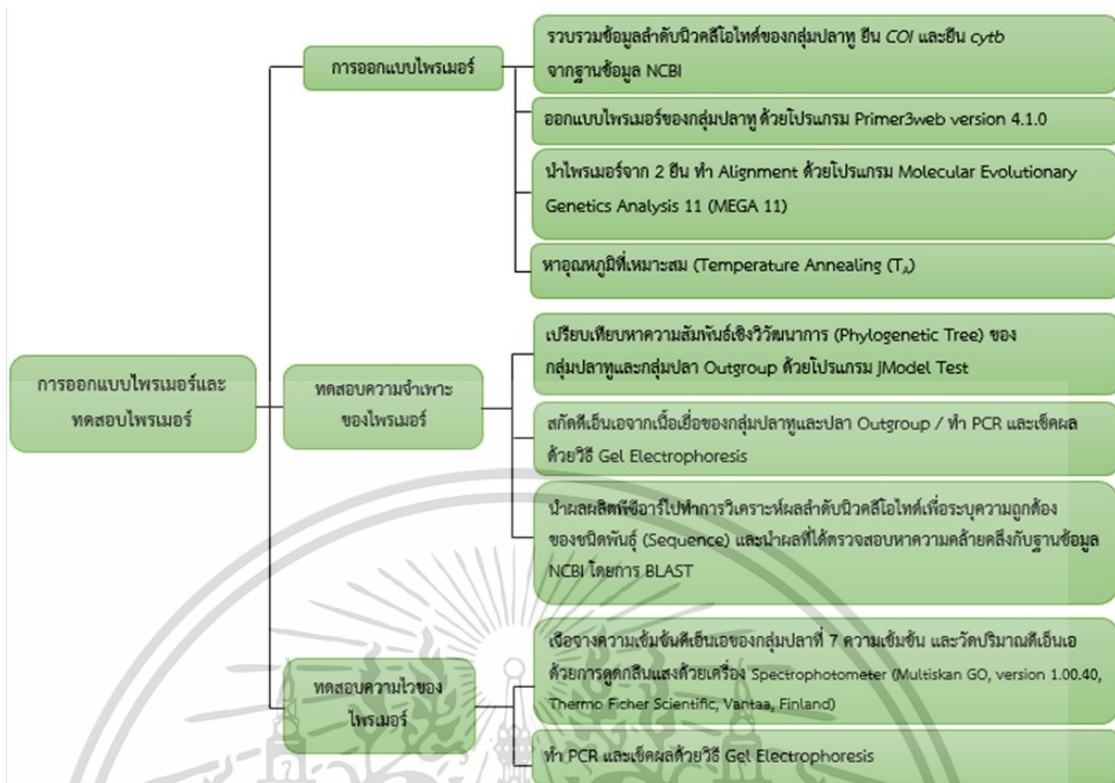
ที่มา: <http://www.fishbase.org>

สกัดดีเอ็นเอของกลุ่มปลาหู และปลาอื่น ๆ ที่นำมาเป็น outgroup จากเนื้อปลาสด แล้วนำดีเอ็นเอเหล่านี้มาทำพีซีอาร์ ซึ่งมีพีซีอาร์ reaction รวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้ MyTaq™ HS Mix 2x จำนวน 10 ไมโครลิตร Primer F/R อย่างละ 2 ไมโครลิตร DNA template 2 ไมโครลิตร และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารสิทธิ์สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์ในการนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dnase free water 4 ไมโครลิตร โดยอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนพีซีอาร์ สำหรับไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่นั้น ประกอบไปด้วย 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ในขั้นตอน Denaturation ใช้ T_A องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 หรือ 60 วินาที ขึ้นอยู่กับชนิดไพรเมอร์ ในขั้นตอน Annealing และ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 หรือ 90 วินาที ขึ้นอยู่กับชนิดไพรเมอร์ ในขั้นตอน Extension และช่วงสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำตรวจสอบขนาดของผลผลิต พีซีอาร์ ด้วยวิธี Gel Electrophoresis และส่งผลผลิตพีซีอาร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ไปทำการวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุความถูกต้องของชนิดพันธุ์ เมื่อได้รับผลลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำมาทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และทำการตัดแต่งลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA 11 จากนั้นทำการเปรียบเทียบข้อมูลดีเอ็นเอและตรวจสอบความคล้ายคลึงของผลลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) โดยใช้การ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) หาความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อระบุชนิดพันธุ์ โดยจะแสดงผลค่า query coverage และ percent identity หากมีค่าที่สูง 100% แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่คือชนิดพันธุ์นั้นในฐานข้อมูลใน NCBI ซึ่งเป็นการตรวจสอบผลว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะกับกลุ่มของปลาทุเท่านั้น

เมื่อได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับกลุ่มปลาทุเท่นั้นแล้วในขั้นตอนต่อไปนำไพรเมอร์ทำการทดสอบความไว (Sensitivity) ในการจับกับดีเอ็นเอของกลุ่มปลาทุเท่นั้นคือนำดีเอ็นเอกลุ่มปลาทุเท่นั้นที่ได้จากการสกัดจากเนื้อปลาสดมาเจือจางความเข้มข้น 7 เท่า ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือเตรียมหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร (Centrifuge tube) ซึ่งในหลอดเซนตริฟิวจ์นั้นได้ทำการเติมน้ำที่ปราศจากดีเอ็นเอ (DNase water) 9 ไมโครลิตร และเติมดีเอ็นเอจากการสกัดก่อนหน้านี้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรลงในหลอดเซนตริฟิวจ์เดียวกันและทำการเจือจางความเข้มข้นจากหลอดเซนตริฟิวจ์ที่ 1 ไปหลอดเซนตริฟิวจ์ที่ 2 ทำเช่นนี้จนครบ 7 หลอด และนำมาวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เจือจางได้ด้วยการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Spectrophotometer (Multiskan GO, version 1.00.40, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) ที่ช่วงการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร 280 นาโนเมตร และ 320 นาโนเมตร จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์โดยการเปรียบเทียบค่า OD260 และ OD280 (ค่าอัตรา OD260 / OD280) (Daebok *et al.*, 2018) และตรวจสอบหาปริมาณดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบค่า OD260 และ OD320 โดยใช้สูตร $OD260 - OD320 * 50 / 0.052$ จากนั้นทำพีซีอาร์จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผ่านการเจือจางทั้ง 7 ความเข้มข้น ซึ่งวิธีการปฏิบัติเช่นเดียวกับวิธีการดังกล่าวข้างต้น และตรวจสอบผลด้วยการทำ Gel Electrophoresis โดยในขั้นตอนนี้จะปฏิบัติตามแผนการดังรูปที่ 3.19



รูปที่ 3.19 แผนการปฏิบัติการการออกแบบไพรเมอร์และทดสอบไพรเมอร์เพื่อการพัฒนาวิธีการมาตรฐาน

3.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับห้องปฏิบัติการ

เมื่อได้ขั้นตอนการกรองตัวอย่างน้ำ และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะแล้ว ทดลองนำวิธีการที่ได้นั้น มาตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับห้องปฏิบัติการ ที่สามารถยืนยันได้ว่ามีปลาทุอยู่ในแหล่งน้ำจริง เพื่อให้ได้วิธีมาตรฐานที่สามารถนำมาใช้ศึกษา ตรวจสอบ และสำรวจการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุในธรรมชาติต่อไป โดยจับปลาทุที่มีชีวิตจากการตกเบ็ดในแหล่งน้ำธรรมชาติใส่ในถังน้ำทะเลที่มีปริมาตร 30 ลิตร/ถัง ถึงละ 3 ตัว จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจำนวน 100 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร 1 ลิตร 2 ลิตร และ 5 ลิตรที่เวลา 10 นาที และ 60 นาทีตามลำดับ หลังจากใส่ปลาลงในถังน้ำทะเล และนำตัวอย่างน้ำทะเลที่ได้มายังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการกรองน้ำและการศึกษาโดยอาศัยขั้นตอนที่ได้จากข้อ 3.1 และ 3.2 โดยใช้กระดาษกรอง Membrane Filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เมื่อทำการกรองน้ำเสร็จนำกระดาษกรองที่มีดีเอ็นเออยู่จะถูกเก็บลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ 1.5 ไมโครลิตร และเก็บรักษาที่ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัดดีเอ็นเอ สำหรับขั้นตอนการตรวจสอบเพื่อระบุว่า eDNA จากตัวอย่างน้ำที่ได้ทำการเก็บและกรองมานั้นมี eDNA ของกลุ่มปลาทุหรือไม่ โดยการนำกระดาษกรองที่มีดีเอ็นเอมาสกัดดีเอ็นเอ และสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อปลาทุสดเพื่อนำมาใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) ด้วยวิธีฟินอล: คลอโรฟอร์ม เมื่อได้ดีเอ็นเอแล้วมาทำพีซีอาร์ ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขั้นตอนนี้ได้นำไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับกลุ่มปลาทุเท่านั้นที่ได้ออกแบบจากข้อ 3.2 นั่นคือ Rb_COI_F 5'GATATCGGCACCCTCTACCTAGTAT3' และ Rb_COI_R 3'AGCAGAAGAACGGCTGTAATTAGTA5' (548 คู่เบส) มาใช้ในวิธีการเพิ่มจำนวนปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) โดยมี PCR reaction รวม 20 ไมโครลิตร คือเติม MyTaq™ HS Mix 2x 10 ไมโครลิตร Primer F/R 2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอ ต้นแบบ 1 ไมโครลิตร และ Dnase water free 5 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในขั้นตอนการทำพีซีอาร์ โดยปฏิกิริยา Thermal cycler ประกอบไปด้วย 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 30 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 60 องศาเซลเซียส และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และช่วงสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และดูผลที่ปรากฏบนแผ่น Agarose gel ด้วยวิธี Gel Electrophoresis โดยผลผลิตพีซีอาร์ ที่ถูกต้องจะมีขนาด 548 คู่เบส โดยในขั้นตอนนี้จะปฏิบัติตามแผนการดังรูปที่ 3.20



รูปที่ 3.20 แผนการปฏิบัติการตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดัห้องปฏิบัติการเพื่อการพัฒนาวิธีการมาตรฐาน

3.4 การตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดัภาคสนาม

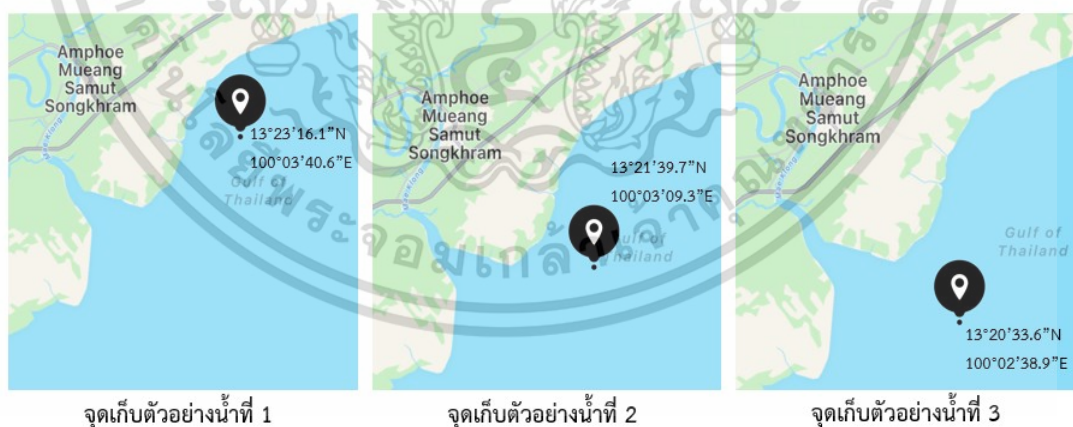
สำหรับการเก็บตัวอย่างน้ำภาคสนามซึ่งขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบระบุงการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุและการอพยพของกลุ่มปลาทุบริเวณจังหวัดสมุทรสงครามในรอบปี

โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจากบริเวณปากแม่น้ำแม่กลอง ตำบลแม่กลอง อำเภอมืองจังหวัดสมุทรสงคราม โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลเป็นประจำทุกเดือน เดือนละ 2 รอบรวมเก็บตัวอย่างน้ำทั้งสิ้น 11 รอบ (ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2564- เดือนเมษายน พ.ศ. 2565 โดยเดือน

พฤศจิกายนทำการเก็บตัวอย่างน้ำเพียง 1 รอบ) มีจุดเก็บตัวอย่างน้ำ 3 จุด (ดังรูปที่ 3.21) โดยอ้างอิงเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือนำไปใช้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

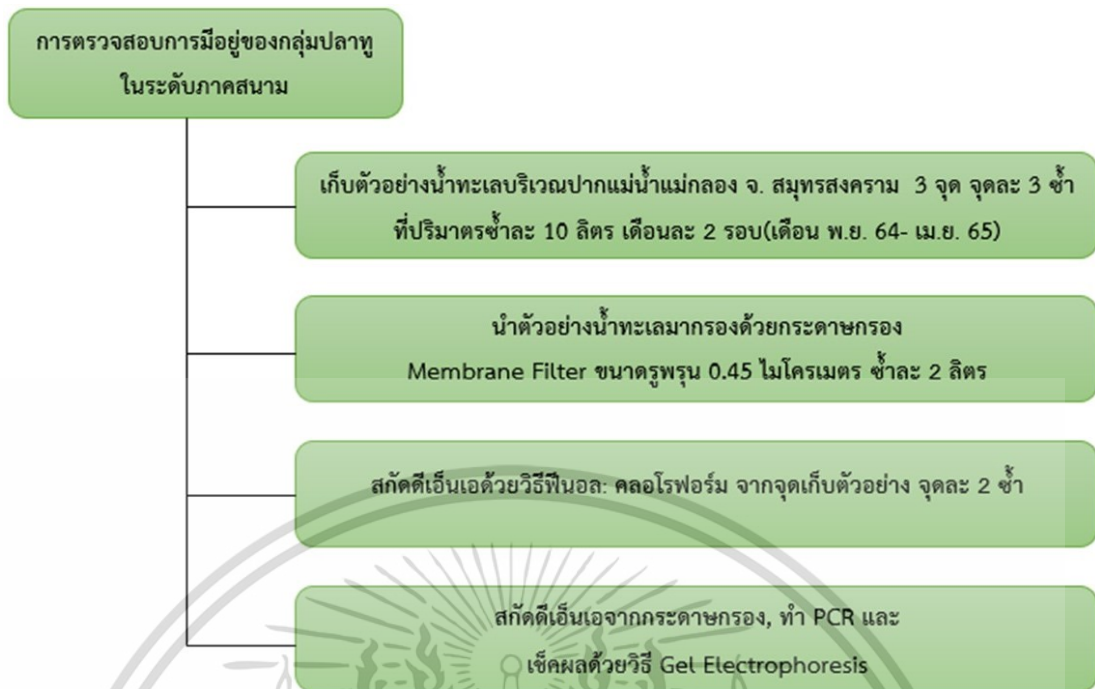
จากบริเวณที่ชาวประมงพื้นบ้านสามารถดักจับปลาหูได้ในรอบปีที่ผ่านมา และเก็บตัวอย่างน้ำจืดละ 3 ซ้ำ โดยในแต่ละซ้ำเก็บตัวอย่างน้ำที่ 10 ลิตร จากนั้นนำตัวอย่างน้ำทะเลปริมาตร 1 ลิตร มากรองตามวิธีมาตรฐานที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ คือกรองน้ำด้วยเครื่องบีมน้ำ Peristaltic Pump BT100F (LEAD FLUID) โดยใช้กระดาษกรอง Membrane Filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตรที่ได้จากข้อ 3.1 จากนั้นเก็บกระดาษกรองที่มีดีเอ็นเออยู่ลงในหลอด microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัดดีเอ็นเอ

สำหรับกระดาษกรองที่ได้จากขั้นตอนการกรองตัวอย่างน้ำข้างต้นจะถูกทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟินอล: คลอโรฟอร์ม โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากจุดเก็บตัวอย่างน้ำจืดละ 2 ซ้ำ เมื่อได้ดีเอ็นเอแล้วนำมาทำพีซีอาร์ ในขั้นตอนนี้สามารถปฏิบัติตามได้จากข้อ 3.3 การสกัดดีเอ็นเอ และการทำพีซีอาร์ ในขั้นตอนนี้เป็น การตรวจสอบ eDNA ของปลาหูจากตัวอย่างน้ำทะเลที่ และได้มีการรวบรวมข้อมูลสถิติการจับปลาหูการทำประมงพื้นบ้านรายเดือนจากกรมประมงปี 2564 ถึงปี 2565 บริเวณการทำประมงแหล่งที่ 2 ได้แก่ พื้นที่ทำการประมงบริเวณจังหวัดชลบุรี จังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดเพชรบุรี (กรมประมง, 2565) ในช่วงเดือนที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ เพื่อนำมาเทียบกับผล eDNA ของปลาหูในธรรมชาติที่ได้จากการเก็บตัวอย่างน้ำ เพื่อหาความสัมพันธ์ของปริมาณปลาหูในธรรมชาติและความสามารถในการใช้วิธีมาตรฐานนี้ในการตรวจดีเอ็นเอของปลาหูในภาคสนาม โดยในขั้นตอนนี้จะปฏิบัติตามแผนการดังรูปที่ 3.22



รูปที่ 3.21 จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณปากแม่น้ำแม่กลอง ตำบลแม่กลอง อำเภอมือง จังหวัดสมุทรสงคราม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.22 แผนการปฏิบัติการตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุกระดับห้องปฏิบัติการเพื่อการพัฒนาวิธีการมาตรฐาน

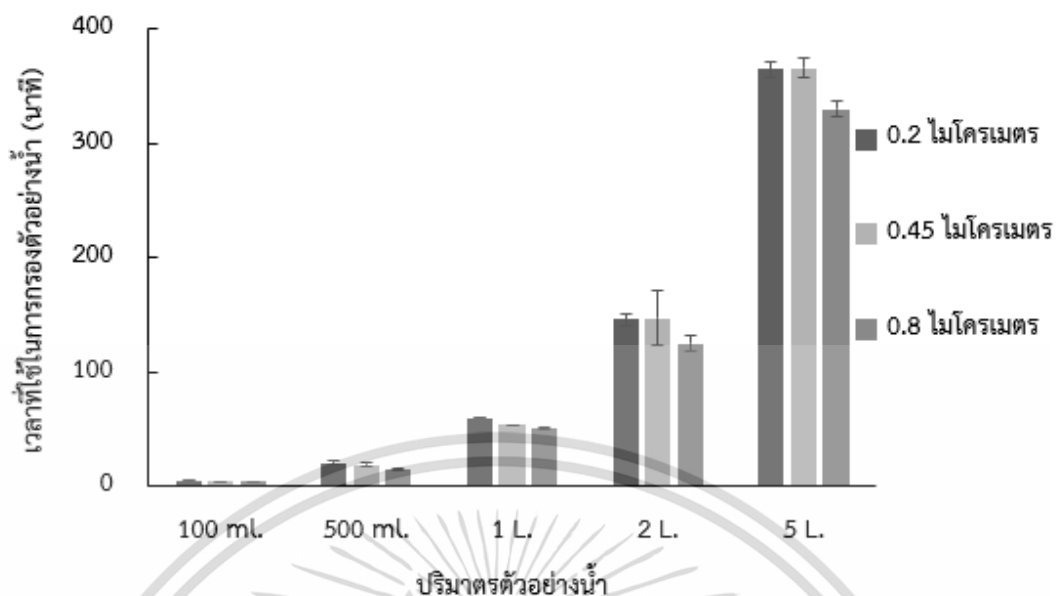
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 วิธีการกรองตัวอย่างน้ำ

การทดสอบประเภทและขนาดรูพรุนของกระดาษกรองทั้ง 3 ประเภทพบว่ากระดาษกรอง Cellulose Nitrate Filter ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร ในการกรองตัวอย่างน้ำที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร 1 ลิตร 2 ลิตร และ 5 ลิตร ใช้เวลาในการกรองตัวอย่างน้ำ 5 นาที, 20 นาที, 60 นาที, 2 ชั่วโมง 30 นาที และ 6 ชั่วโมง 10 นาที ตามลำดับ Membrane Filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ในการกรองตัวอย่างน้ำที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร 1 ลิตร 2 ลิตร และ 5 ลิตร ใช้เวลาในการกรองตัวอย่างน้ำ 4 นาที 18 นาที 54 นาที 2 ชั่วโมง 10 นาที และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ และ Cellulose Acetate Filter ขนาดรูพรุน 0.8 ไมโครเมตร ในการกรองตัวอย่างน้ำที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร 1 ลิตร 2 ลิตร และ 5 ลิตร ใช้เวลาในการกรองตัวอย่างน้ำ 4 นาที 15 นาที 50 นาที 2 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง 35 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 4.23) สำหรับการเปรียบเทียบหาความแตกต่างของเวลาที่ใช้กรองตัวอย่างน้ำในปริมาตรตัวอย่างน้ำที่แตกต่างกัน พบว่า ปริมาตรตัวอย่างน้ำและประเภทกระดาษกรอง ขนาดรูพรุนกระดาษกรองมีผลต่อเวลาที่ใช้ในการกรองตัวอย่างน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 3) โดยประเภทของกระดาษกรอง จะส่งผลต่อเวลาในการกรองเมื่อกรองน้ำในปริมาณมากขึ้น โดยกระดาษกรอง Cellulose Acetate Filter ขนาดรูพรุน 0.8 ไมโครเมตร สามารถกรองน้ำได้รวดเร็วที่สุด รองลงมาคือกระดาษกรอง Membrane Filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร



รูปที่ 4.23 การเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการกรองตัวอย่างน้ำที่มีปริมาณน้ำและประเภทกระดาษกรองแตกต่างกัน โดยแท่งสีดำคือ กระดาษกรอง Cellulose Nitrate Filter ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครลิตร แท่งสีเทาอ่อนคือ กระดาษกรอง Membrane Filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร และแท่งสีเทาเข้มคือ กระดาษกรอง Cellulose Acetate Filter ขนาดรูพรุน 0.8 ไมโครเมตร

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการกรองตัวอย่างน้ำกับปริมาณตัวอย่างน้ำและประเภทกระดาษกรอง

	SS	df	MS	F	Sig.
ประเภทกระดาษกรอง	1271.667	2	635.833	11.498	.001
ปริมาณตัวอย่างน้ำ	496427.7	4	124106.9	2244.248	.000
ประเภทกระดาษกรอง * ปริมาณตัวอย่างน้ำ	1165.333	8	145.667	2.634	.050
ค่าความคลาดเคลื่อน (error)	829.5	15	55.3		
ผลรวม (Total)	890715.000	30			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การออกแบบไพรเมอร์และการทดสอบไพรเมอร์

สำหรับการออกแบบไพรเมอร์และการทดสอบไพรเมอร์นั้น ในขั้นตอนการเลือกตำแหน่ง - นิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* และ *cytb* โดยโปรแกรม Primer3 web version 4.1.0 นั้น ทำให้ได้ไพรเมอร์จากยีน *COI* ทั้งหมด 5 คู่ และหลังจากนำไพรเมอร์ยีน *COI* ทั้ง 5 คู่ ไปทำการ Alignment ทำให้ได้ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาทุ้งสามชนิดพันธุ์มากที่สุด 2 คู่ คือ Rb_COI_F/R และ Rb_COIF1/R1 ดังตารางที่ 4 โดยมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เลือกทำไพรเมอร์ ดังรูปที่ 4.24 สำหรับยีน *cytb* หลังการใช้โปรแกรม Primer3 web version 4.1.0 ทำให้ได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 5 คู่ และหลังจากนำไพรเมอร์ยีน *cytb* มาทำการ Alignment ทำให้ได้ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาทุ้งสามชนิดพันธุ์มากที่สุด 2 คู่ คือ Rb_CYTb_F/R, และ Rb_cytbF1/R1 ดังตารางที่ 5 โดยมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เลือกทำไพรเมอร์ ดังรูปที่ 4.25 และจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่พัฒนาใหม่ไปเปรียบเทียบข้อมูลดีเอ็นเอกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเป็นไพรเมอร์ Rb_COI_F/R มีความจำเพาะเจาะจงกับปลากลุ่มปลาทุ้ง เนื่องจากมีความคล้ายคลึงกับปลาฉิ่ง (*R. kanagurta*) ที่ค่า Query cover 100%, Percent identity 99.69% ไพรเมอร์ Rb_COIF1/R1 หลังจากเปรียบเทียบข้อมูลดีเอ็นเอกับฐานข้อมูลพบมีความคล้ายคลึงทั้งกับปลาทุ้งสั้น (*R. brachysoma*) โดยมีค่า Query cover 100%, Percent identity 100% ไพรเมอร์ Rb_CYTb_F/R ความคล้ายคลึงทั้งกับปลาทุ้งสั้น (*R. brachysoma*) โดยมีค่า Query cover 100%, Percent identity 100% และสำหรับ Rb_cytbF1/R1 พบมีความคล้ายคลึงกับปลาทุ้งสั้น (*R. brachysoma*) ที่ค่า Query cover 100%, Percent identity 100% จากทั้งหมดของฐานข้อมูล (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 4 ข้อมูลของไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบขึ้นมาใหม่จากยีน COI เพื่อใช้ในการตรวจสอบการมีอยู่ของกุ่มปลาทุจากร่องรอยดีเอ็นเอในสิ่งแวดล้อม

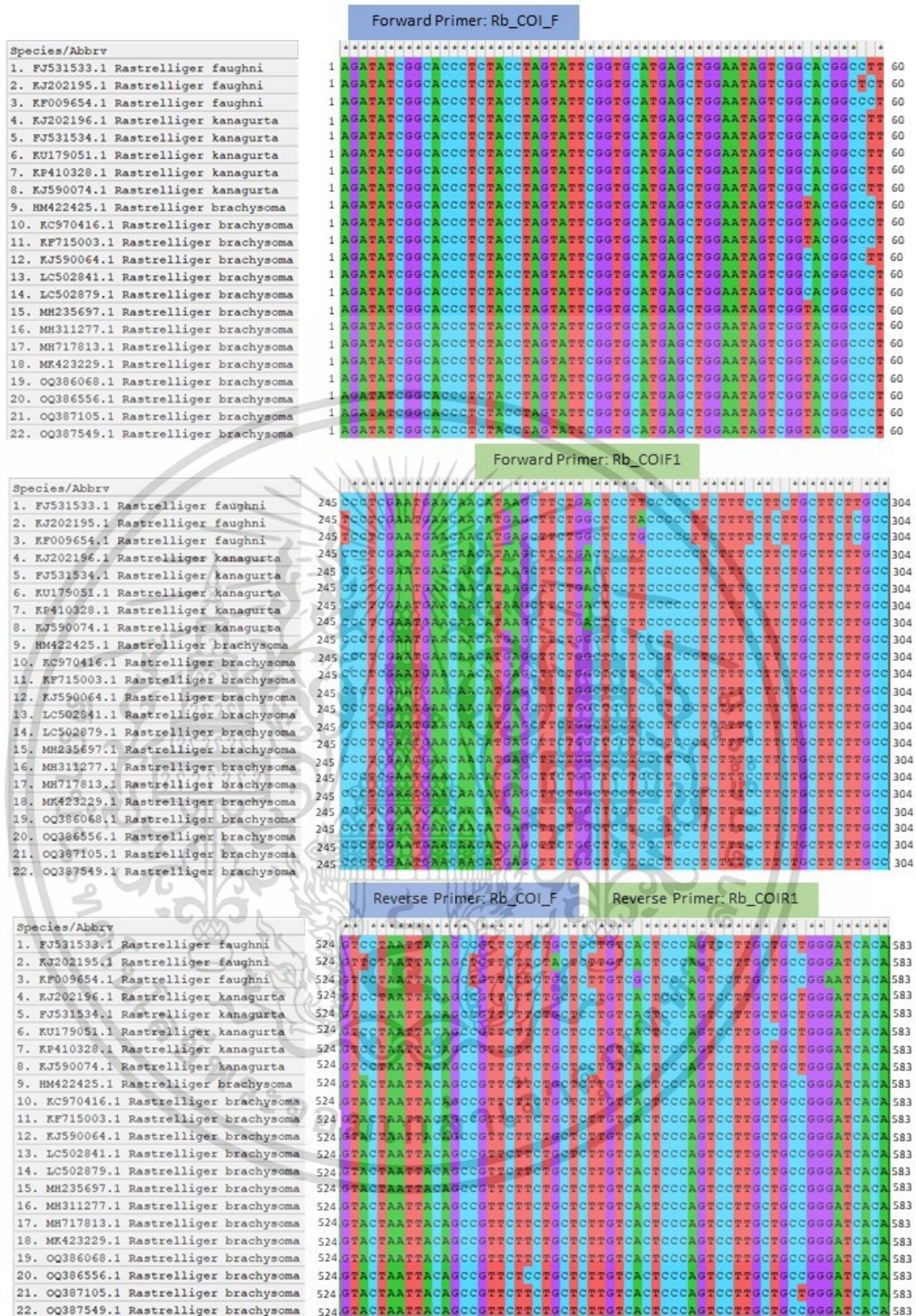
คุณสมบัติที่เหมาะสมของไพรเมอร์ COI										
No.		start	len.	tm	gc%	any_th	3'_th	hairpin	seq.	this study
1	FORWARD PRIMER	2	25	65.80	48.00	0.00	0.00	0.00	GATATCGGCACCCTCTACCTAGTAT	Rb_COI_F
	REVERSE PRIMER	525	25	62.50	40.00	0.00	0.00	0.00	AGCAGAAGAACGGCTGTAATTAGTA	Rb_COI_R
	PRODUCT SIZE 548,									
2	FORWARD PRIMER	260	25	72.90	64.00	0.00	0.00	0.00	CATGAGCTTCTGGCTCCTCCCTCCC	Rb_COIF1
	REVERSE PRIMER	551	25	70.90	60.00	0.00	0.00	0.00	CGGCAGCAAGGACTGGGAGTGACAA	Rb_COIR1
	PRODUCT SIZE 317,									
3	FORWARD PRIMER	88	20	59.10	60.00	7.76	0.00	0.00	CCAACCAGGGTCCCTCTTAG	
	REVERSE PRIMER	292	20	59.20	55.00	0.00	0.00	0.00	AAGGAAAGAGGGAGGGAGGA	
	PRODUCT SIZE 205,									
4	FORWARD PRIMER	273	20	59.20	50.00	0.00	0.00	0.00	TCCTCCCTCCCTCTTTCCTT	
	REVERSE PRIMER	491	20	59.10	60.00	0.00	0.00	0.00	ATGTGGCTGCAGGTTTCATG	
	PRODUCT SIZE 219,									
5	FORWARD PRIMER	278	20	58.69	55.00	0.00	0.00	0.00	CCTCCCTCTTTCCTTCTGCT	
	REVERSE PRIMER	524	20	58.89	50.00	0.00	0.00	0.00	CTGCTCAGACGAATAGGGGT	
	PRODUCT SIZE 247,									

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ข้อมูลของไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบขึ้นมาใหม่จากยีน *cytb* เพื่อใช้ในการตรวจสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุจากร่องรอยดีเอ็นเอในสิ่งแวดล้อม

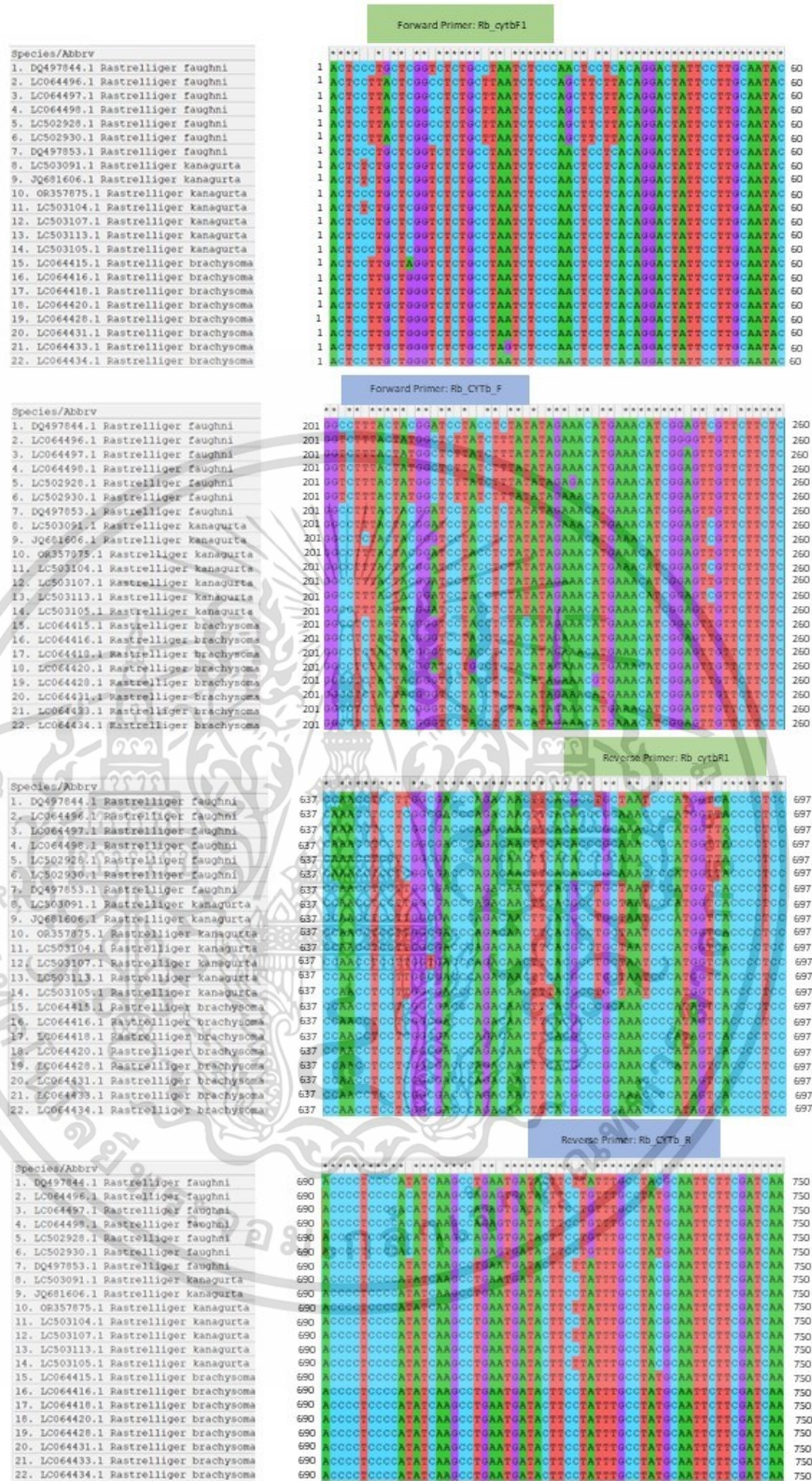
คุณสมบัติที่เหมาะสมของไพรเมอร์ <i>cytb</i>										
No.		start	len.	tm	gc%	any_th	3'_th	hairpin	seq.	this study
1	FORWARD PRIMER	203	25	69.10	56.00	0.00	0.00	0.00	CCTCTACTACGGGTCCTACCTCTAC	Rb_CTYb_F
	REVERSE PRIMER	717	25	60.90	36.00	0.00	0.00	0.00	GAATTGCATAGGCAAATAGGAAGTA	Rb_CTYb_R
	PRODUCT SIZE 539,									
2	FORWARD PRIMER	6	25	68.90	56.00	0.00	0.00	0.00	TTGCTGGGTCTCTGCCTAATCTCCC	Rb_cytbF1
	REVERSE PRIMER	671	25	72.90	64.00	0.00	0.00	0.00	AGGGGTGACTATGGGGTTTGCGGGC	Rb_cytbR1
	PRODUCT SIZE 690,									
3	FORWARD PRIMER	416	20	59.00	50.00	0.00	0.00	0.00	TGCAACCCTCACTCGATTCT	
	REVERSE PRIMER	624	20	58.86	55.00	6.18	0.00	0.00	GGGATGTGAGGGCCATAAGA	
	PRODUCT SIZE 209,									
4	FORWARD PRIMER	402	20	58.86	50.00	17.16	0.00	0.00	TTCTCCGTGACAATGCAAC	
	REVERSE PRIMER	632	20	59.24	60.00	0.00	0.00	0.00	GAGTGCTAGGGATGTGAGGG	
	PRODUCT SIZE 231,									
5	FORWARD PRIMER	191	20	58.88	55.00	29.73	12.48	0.00	CATTGGACGAGGCTCTACT	
	REVERSE PRIMER	421	20	58.86	50.00	11.62	0.00	0.00	GTTGCATTGTGACGGAGAA	
	PRODUCT SIZE 231,									

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.24 ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 ที่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลากลุ่มปลาทุ้มทั้ง 3 ชนิดพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.25 ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 ที่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytb ในปลากลุ่มปลาหูทั้ง 3 ชนิดพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

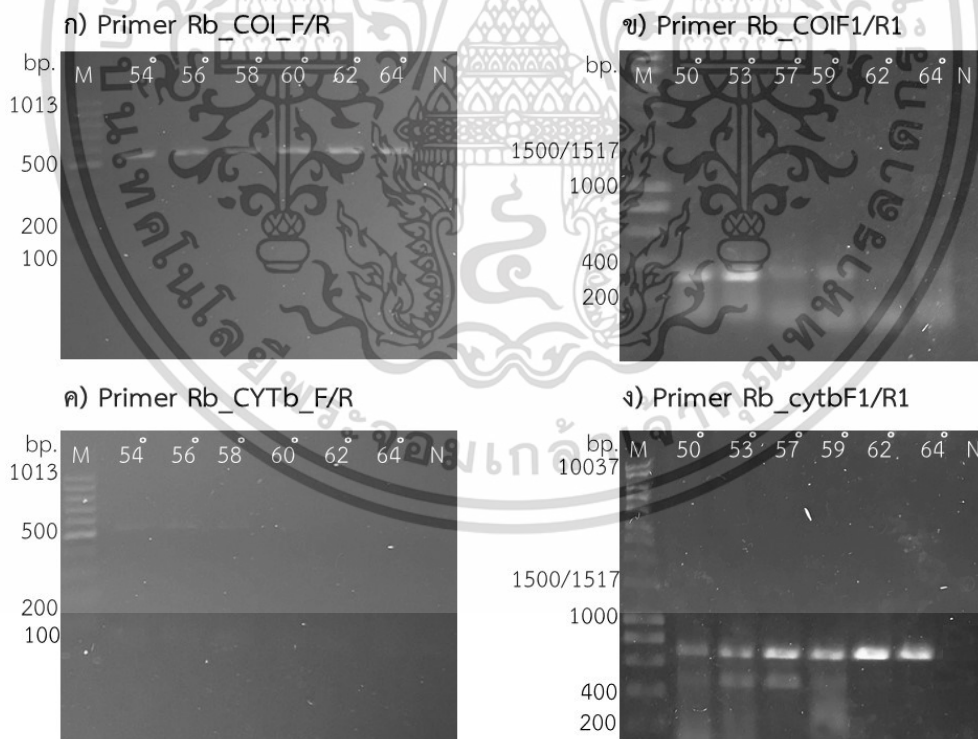
ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่กับลำดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตในฐานข้อมูล NCBI โดยรายงานความคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตเพียงสามลำดับแรกที่ได้จากการค้นหา

การเปรียบเทียบไพรเมอร์กับฐานข้อมูล NCBI						
ไพรเมอร์	ยีน	ขนาดไพรเมอร์ (คู่เบส)	Query cover (%)	Percent Identity (%)	Sequencing identification	Accession number Reference
Rb_COI_F/R	COI	548	100	99.69	<i>R. kanagurta</i>	MT076820.1
			100	99.69	<i>R. kanagurta</i>	MT076819.1
			100	99.69	<i>R. kanagurta</i>	KY802062.1
Rb_COIF1/R1	COI	317	100	100	<i>R. brachysoma</i>	MK423229.1
			100	100	<i>R. brachysoma</i>	MH882460.1
			100	100	<i>R. brachysoma</i>	MH717813.1
Rb_CYTb_F/R	cytb	539	100	100	<i>R. brachysoma</i>	LC064473.1
			100	100	<i>R. brachysoma</i>	LC064471.1
			100	100	<i>R. brachysoma</i>	LC064468.1
Rb_cytbF1/R1	cytb	690	100	100	<i>R. brachysoma</i>	LC064473.1
			100	100	<i>R. brachysoma</i>	LC064471.1
			100	100	<i>R. brachysoma</i>	LC064468.1

สำหรับไพรเมอร์ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นมาใหม่ได้รับการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยการ ทำ gradient temperature ผลการตรวจสอบไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่ในยีน COI พบว่าไพรเมอร์ Rb_COI_F/R ปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่อุณหภูมิ 54 56 58 60 62 และ 64 องศาเซลเซียส ในระดับที่ไม่แตกต่างกันมากโดยพิจารณาด้วยสายตา และทุกอุณหภูมิสร้างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาด 548 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ถูกต้องตามข้อมูลของไพรเมอร์ที่ออกแบบ ดังนั้นสำหรับไพรเมอร์คู่นี้จึงเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.26ก) ไพรเมอร์ Rb_COIF1/R1 ปรากฏแถบ –

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอตรงตำแหน่งเป้าหมาย คือ 317 คู่เบส ชัดสุดที่อุณหภูมิ 50 และ 53 องศาเซลเซียส และปรากฏแถบดีเอ็นเอจางๆ ที่อุณหภูมิ 57 59 62 และ 64 องศาเซลเซียส แต่ทุกอุณหภูมิปรากฏแถบด้านล่างแถบดีเอ็นเอเป้าหมายที่ขนาดประมาณ 100-200 คู่เบส ดังนั้นสำหรับไพรเมอร์คู่นี้จึงเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 60 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบไขชั้นตอนต่อไป (รูปที่ 4.26ข) ผลการตรวจสอบไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่ในยีน *cytb* พบว่าไพรเมอร์ Rb_CYTb_F/R ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเป้าหมายคือ 539 คู่เบสจางมากที่อุณหภูมิ 54 56 58 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 62 และ 64 องศาเซลเซียส ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 60 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอนการศึกษาลำดับถัดไป (รูปที่ 4.26ค) และไพรเมอร์คู่สุดท้ายคือ Rb_cytbF1/R1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดสุดที่ 62 และ 64 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 50 53 57 และ 59 องศาเซลเซียส ปรากฏแถบดีเอ็นเอจาง ๆ และยังพบว่ายังมีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นด้านล่างตำแหน่งเป้าหมาย ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 62 องศาเซลเซียส ซึ่งไพรเมอร์คู่นี้มีขนาดไพรเมอร์ 690 คู่เบส (รูปที่ 4.26ง) สรุปขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และอุณหภูมิที่เลือกใช้ดังแสดงในตารางที่ 7



รูปที่ 4.26 การทำ gradient temperature เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่ จากยีน *COI* และยีน *cytb* ทั้ง 4 คู่ คือ Rb_COI_F/R (ก) Rb_COIF1/R1 (ข) CYTb_F/R (ค) และ Rb_cytbF1/R1 (ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ สำหรับการศึกษานี้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 รายละเอียดของไพรเมอร์ยีน *COI* และ *cytb* ที่พัฒนาขึ้นใหม่ พร้อมทั้งอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน Annealing และขนาดเป้าหมายของผลผลิตพีซีอาร์

ชื่อไพรเมอร์	ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	ขนาดเป้าหมายของผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส)
Rb_COI_F	<i>COI</i>	5' GATATCGGCACCCTCTACCTAGTAT 3'	60	548
Rb_COI_R		3' AGCAGAAGAACGGCTGTAATTAGTA 5'		
Rb_COIF1	<i>COI</i>	5' CATGAGCTTCTGGCTCCTCCCTCCC 3'	50	317
Rb_COIR1		3' CGGCAGCAAGGACTGGGAGTGACAA 5'		
Rb_CYTb_F	<i>cytb</i>	5' CCTCTACTACGGGTCCTACCTCTAC 3'	60	539
Rb_CYTb_R		3' GAATTGCATAGGCAAATAGGAAGTA 5'		
Rb_cytbF1	<i>cytb</i>	5' TTGCTGGGTCTCTGCCTAATCTCCC 3'	62	690
Rb_cytbR1		3' AGGGGTGACTATGGGGTTTTGCGGGC 5'		

การหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างปลาของกลุ่มปลาทุ และปลาที่เป็น outgroup ของทั้งยีน *COI* และ *cytb* นั้น พบว่าในยีน *COI* ปลาทุทั้ง 3 ชนิดพันธุ์มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน เช่นเดียวกับยีน *cytb* ปลาทุทั้ง 3 ชนิดพันธุ์มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน โดยแยกจากปลาชนิดอื่น ๆ ที่มาเป็น outgroup อย่างชัดเจนดังรูปที่ 4.27 และรูปที่ 4.28 ผลการทดสอบความจำเพาะกับกลุ่มปลาทุของไพรเมอร์นั้นพบว่าไพรเมอร์ Rb_COI_F/R ที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ที่ 548 คู่เบส ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตัวอย่าง P1 และ P2 ได้อย่างชัดเจน ซึ่งก็คือดีเอ็นเอของกลุ่มปลาทุ (รูปที่ 4.29ก) ไพรเมอร์ Rb_COIF1/R1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเป้าหมาย คือ 317 คู่เบสได้ในตัวอย่างปลาทุ P1 และ P2 แต่ไม่ชัดเจน และปรากฏแถบดีเอ็นเอนอกตำแหน่งเป้าหมายในตัวอย่างปลาซาบะ ปลาสิกุน ปลาหางแข็ง ปลากะตัก ปลาทรายแดง และ ปลาม้าลาย ด้วยเช่นกันแต่ไม่ชัดเจน ซึ่งแสดงถึงความไม่จำเพาะของไพรเมอร์ จึงไม่ใช่ไพรเมอร์นี้ในขั้นตอนต่อไปของการทดลอง (รูปที่ 4.29ข) ไพรเมอร์ Rb_CYTbF/R ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเป้าหมาย คือ 539 คู่เบส เฉพาะแค่นั้นใน P1 ไม่ได้ขึ้นในตัวอย่างปลาทุทุกตัวอย่าง และไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างปลาชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นถึงความไม่สม่ำเสมอของความสำเร็จในการใช้ไพรเมอร์นี้ในการจำลองดีเอ็นเอปลาทุ จึงไม่ใช่ไพรเมอร์นี้ในขั้นตอนต่อไปของการทดลอง (รูปที่ 4.29ค) และไพรเมอร์ Rb_cytbF1/R1 ที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ที่ 690 คู่เบส ปรากฏแถบดีเอ็นเอของกลุ่มปลาทุ อีกทั้งยังพบแถบดีเอ็นเอนอกตำแหน่งเป้าหมายในปลา ปลาซาบะ และตัวอย่างที่ปรากฏหลายแถบดีเอ็นเอ (Multiple bands) ในปลาสิกุน และปลาหางแข็ง ซึ่งแสดงถึงความไม่จำเพาะของไพรเมอร์ จึงไม่ใช่ไพรเมอร์นี้ในขั้นตอนต่อไปของการทดลอง (รูปที่ 4.29ง) จึงสามารถสรุปได้ว่าไพรเมอร์

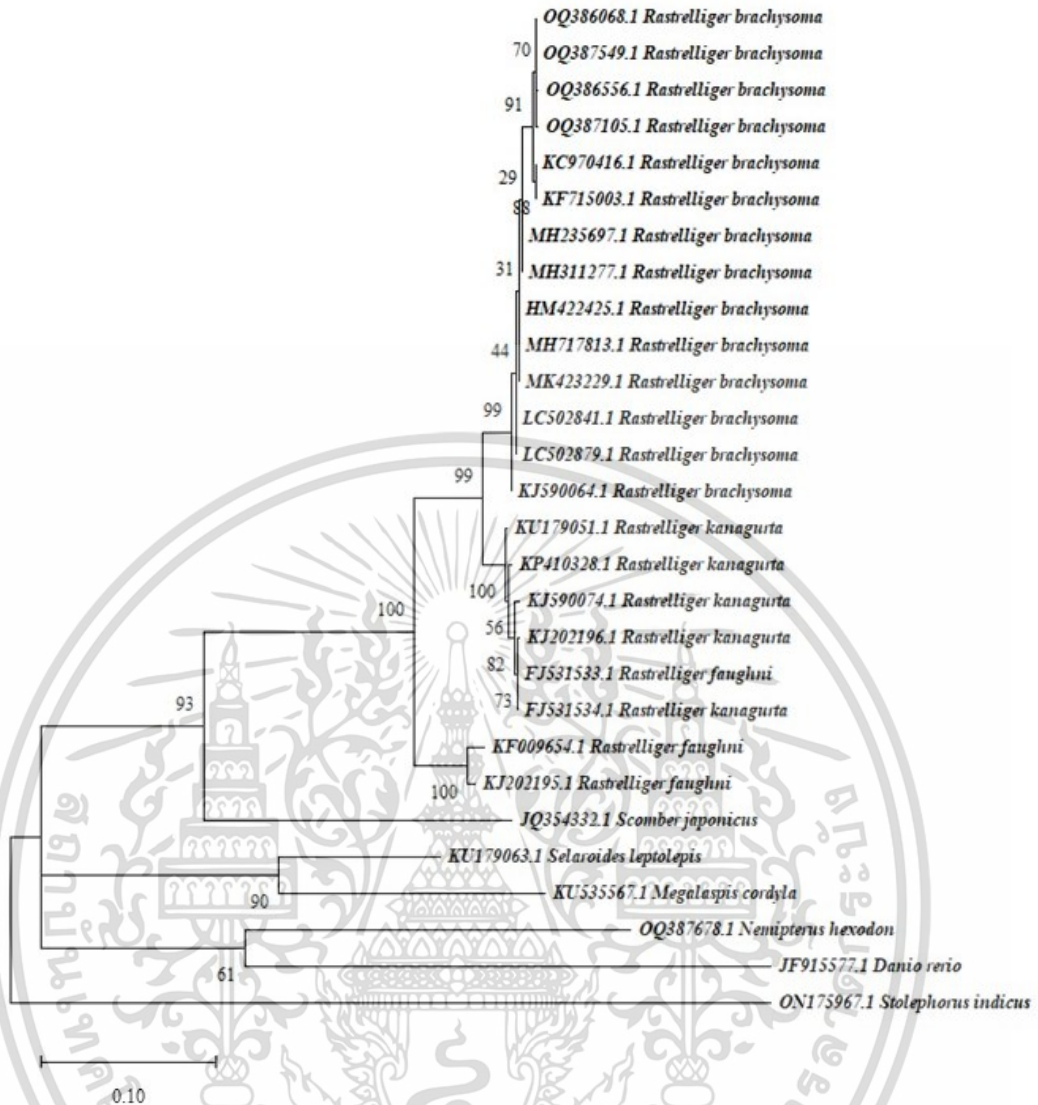
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rb_COI_F/R นั้นเป็นไพรเมอร์เพียงคู่เดียวที่มีความจำเพาะกับกลุ่มปลาทุเท่านั้น เนื่องจากไพรเมอร์เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เฉพาะตัวอย่างปลาทุ เห็นได้จากการปรากฏแถบดีเอ็นเอบนแผ่น Agarose gel จากตัวอย่างในกลุ่มปลาทุเท่านั้น โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ 548 คู่เบส และไม่พบแถบดีเอ็นเอของปลาซาบะ ปลาสีกุน ปลาหางแข็ง ปลากระตัก ปลาทรายแดง และปลาม้าลาย

การทดสอบความไว (Sensitivity) ของไพรเมอร์ Rb_COI_F/R ที่จำเพาะกับปลาทุ แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่ำสุด 10^{-3} ได้ (รูปที่ 4.30) โดยจากการวัดปริมาณของดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 10^{-1} พบดีเอ็นเอปริมาณ 20 ± 8 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร โดยมีคุณภาพดีเอ็นเอโดยดูจากสัดส่วนของ OD206 ต่อ OD208 อยู่ที่ 2.1 ± 2.2 ดังนั้นปริมาณ DNA ที่ได้จากการกรองที่ต่ำที่สุดที่สามารถใช้ตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุคือ 0.02 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร

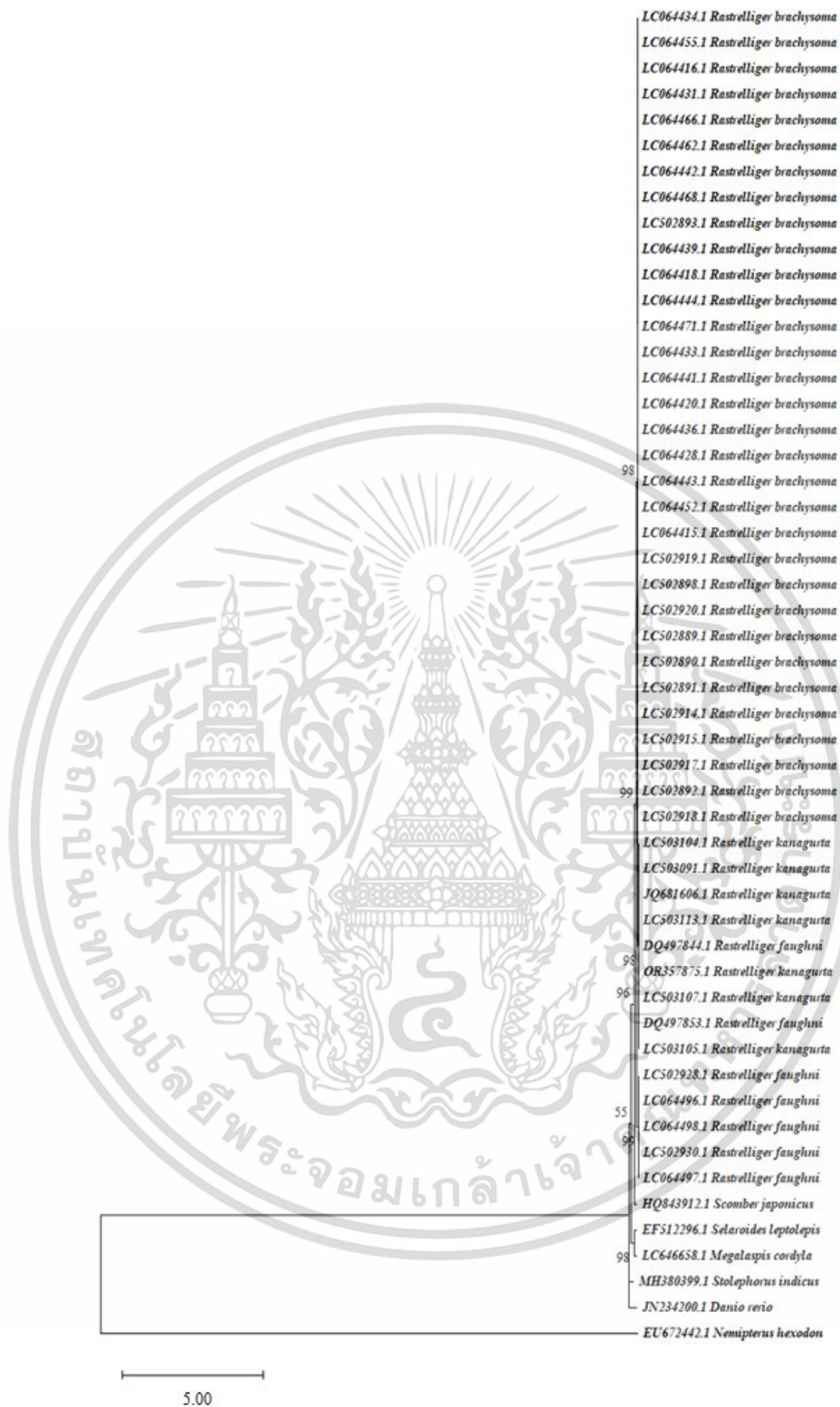


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



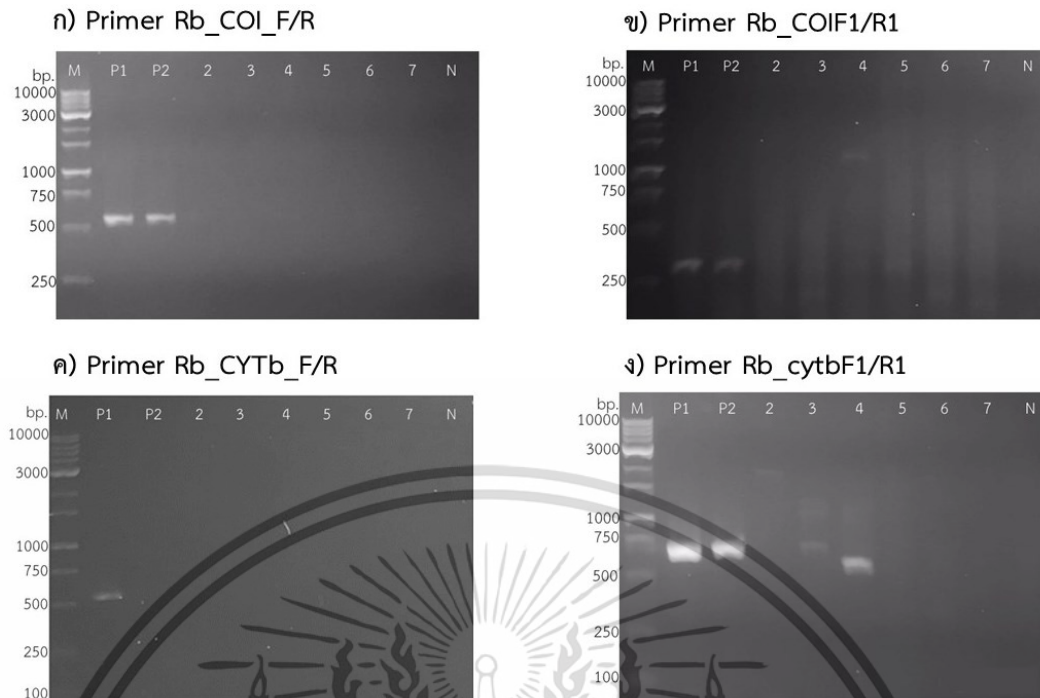
รูปที่ 4.27 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลากลุ่มปลาทุเทียบกับปลาชนิดอื่นๆที่นำมาตรวจสอบ
ความจำเพาะของไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่จากยีน COI ด้วยวิธี Maximum likelihood

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

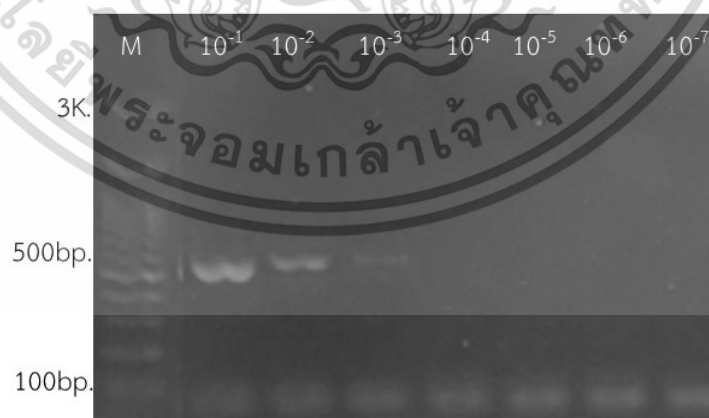


รูปที่ 4.28 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลากลุ่มปลาทุเทียบกับปลาชนิดอื่นๆที่นำมาตรวจสอบ ความจำเพาะของไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่จากยีน *cytb* ด้วยวิธี Maximum likelihood

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.29 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่ 4 คู่ คือ Rb_COI_F/R (ก) Rb_COIF1/R1 (ข) CYTb_F/R (ค) และ Rb_cytbF1/R1 (ง) โดย M คือ Marker (1Kb. plus DNA Ladder RTU.) P1 และ P2 คือ Positive Control (ดีเอ็นเอเนื้อเยื่อกลุ่มปลาทุ) หมายเลข 2 คือ ปลาซาบะ หมายเลข 3 คือ ปลาสิ่กุน หมายเลข 4 คือ ปลาหางแข็ง หมายเลข 5 คือ ปลากระตัก หมายเลข 6 คือ ปลาทรายแดง หมายเลข 7 คือ ปลาม้าลาย และ N คือ Negative Control



รูปที่ 4.30 การทดสอบความไว (Sensitivity) ของไพรเมอร์จำเพาะกับกลุ่มปลาทุ โดย M คือ Marker (HyperLadder™ 100 คู่เบส + 3K.) 10^{-1} ถึง 10^{-7} คือความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ทำพีซีอาร์ (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร) จากความเข้มข้นมากไปหาความเข้มข้นน้อย

ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดัห้องปฏิบัติการ

การทดลองใช้วิธีการเก็บและกรองตัวอย่างน้ำทะเลในระดับห้องปฏิบัติการที่มีปลาทุมีชีวิตอาศัยอยู่ แล้วนำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับกลุ่มปลาทุเท่านั้นที่ได้จากการพัฒนาขึ้นใหม่ดังกล่าวข้างต้น โดยผลจากตัวอย่างน้ำทะเลทั้ง 3 ถัง แสดงให้เห็นชัดเจนว่าสามารถพบดีเอ็นเอของกลุ่มปลาทุได้เมื่อทำการใส่กลุ่มปลาทุลงในถังน้ำทะเลเป็นเวลาเพียง 10 นาที และสามารถพบดีเอ็นเอของกลุ่มปลาทุได้จากตัวอย่างน้ำทะเลที่มีปริมาตรเริ่มต้นตั้งแต่ 100 มิลลิลิตร เป็นต้นไป ในขณะที่ตัวอย่างน้ำที่ปริมาตร 2 ลิตร และ 5 ลิตร ไม่พบแถบดีเอ็นเอ และหลังจากใส่ปลาทุมีชีวิตลงไปจนถึงน้ำทะเลเป็นเวลา 60 นาที พบแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำทะเลที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตรเท่านั้น ส่วนตัวอย่างน้ำทะเลที่ปริมาตรอื่นนั้นไม่พบแถบดีเอ็นเอ (รูปที่ 4.31)



รูปที่ 4.31 ผลการตรวจสอบพบ eDNA ของกลุ่มปลาทุ โดย M คือ Marker (HyperLadderTM 1 Kb.), P1 คือ Positive control (ดีเอ็นเอปลาทุที่สกัดจากเนื้อปลาทุ) หมายเลข คือ ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ 100 มิลลิลิตร หมายเลข 2 คือ ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ 500 มิลลิลิตร หมายเลข 3 คือ ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ 1 ลิตร หมายเลข 4 ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ 2 ลิตร และหมายเลข 5 ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ 5 ลิตร ที่เวลา 10 นาที หมายเลข 6 คือ ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ 100 มิลลิลิตร หมายเลข 7 คือ ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ 500 มิลลิลิตร หมายเลข 8 คือ ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ 1 ลิตร หมายเลข 9 ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ 2 ลิตร หมายเลข 10 ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่ 5 ลิตร ที่เวลา 60 นาที และ N คือ Negative Control

4.4 การตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับภาคสนาม

จากการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลในธรรมชาติบริเวณที่มีกลุ่มปลาทุอาศัยอยู่ทั้ง 3 จุดนั้น ได้ถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับกลุ่มปลาทุเท่านั้นที่ได้พัฒนาขึ้นใหม่ข้างต้นโดยทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำทะเลจุดละ 2 ซ้ำ ซึ่งผลที่ได้ในแต่ละเดือนที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ

จากการเก็บตัวอย่างน้ำช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2564 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2565 ที่ได้ทำการวิเคราะห์ผลตามวิธีมาตรฐานเพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุนั้นพบว่าเทคนิค eDNA สามารถตรวจสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุได้จากจุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ 1 ของเดือนพฤศจิกายน เนื่องจากมีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอจางๆ ส่วนที่จุดเก็บตัวอย่างน้ำจุดอื่นในเดือนพฤศจิกายนไม่พบแถบดีเอ็นเอปรากฏ รวมถึงไม่พบแถบดีเอ็นเอปรากฏเช่นกันในเดือนอื่น ๆ ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 4.32 และสรุปผลการตรวจสอบได้ดังตารางที่ 8



รูปที่ 4.32 ผลการตรวจพบ eDNA ของกลุ่มปลาทุ จากบริเวณปากแม่น้ำแม่กลอง จังหวัดสมุทรสงคราม ที่จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดที่ 1 2 และ 3 ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2564 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2565 โดย M คือ Marker (HyperLadderTM 100 คู่เบส + 3K.) P คือ Positive control (ดีเอ็นเอปลาทุที่สกัดจากเนื้อปลาทุ) พ.ย.(1) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 1, พ.ย.(2) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 2, พ.ย.(3) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 3, ธ.ค.(1) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 1, ธ.ค.(2) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 2, ธ.ค.(3) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 3, ม.ค.(1) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 1, ม.ค.(2) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 2, ม.ค.(3) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 3, ก.พ.(1) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 1, ก.พ.(2) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 2, ก.พ.(3) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 3, มี.ค.(1) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 1, มี.ค.(2) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 2, มี.ค.(3) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 3, เม.ย.(1) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 1, เม.ย.(2) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 2, เม.ย.(3) คือ จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดเก็บที่ 3 และ N คือ Negative Control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์พีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอของกลุ่มปลาหู (+ คือ ตรวจสอบพบดีเอ็นเอ และ - คือ ไม่สามารถตรวจสอบพบดีเอ็นเอ) ที่จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจุดที่ 1 2 และ 3 ณ บริเวณปากแม่น้ำแม่กลอง ตำบลแม่กลอง อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม

เดือนที่เก็บตัวอย่างน้ำทะเล	จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเล		
	1	2	3
พฤศจิกายน ปี 2564	+	-	-
ธันวาคม ปี 2564	-	-	-
มกราคม ปี 2565	-	-	-
กุมภาพันธ์ ปี 2565	-	-	-
มีนาคม ปี 2565	-	-	-
เมษายน ปี 2565	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การออกแบบวิธีการกรองตัวอย่างน้ำ

การออกแบบวิธีการกรองตัวอย่างน้ำนั้นขนาดรูพรุนและประเภทของกระดาษกรองที่ใช้ในการศึกษา eDNA เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญเนื่องจากเป็นตัวช่วยดักจับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ และกระดาษกรองยังมีผลต่อปริมาณความเข้มข้นของ eDNA ที่ดักจับอีกด้วย (Lacoursiere-Roussel *et al.*, 2016; Xing *et al.*, 2022) โดยขนาดรูพรุนของกระดาษกรองที่ใช้ในการศึกษา eDNA อยู่ระหว่าง 0.22 ไมโครเมตร ถึง 20 ไมโครเมตร (ตารางที่ 1) โดยจากการศึกษาค้นคว้าได้เลือกใช้กระดาษกรองประเภท Membrane Filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร มาใช้เป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากกระดาษกรองประเภท Membrane Filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ใช้เวลาสำหรับการกรองตัวอย่างน้ำในแต่ละปริมาตรได้รวดเร็วกว่ากระดาษกรอง Cellulose Nitrate Filter ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร เพราะกระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุนที่เล็กกว่าส่งผลให้เกิดการอุดตันจากสารแขวนลอยได้เร็ว ทำให้ยุ่งยากในการทำงาน และต้องเปลี่ยนกระดาษกรองบ่อยครั้งเมื่อใช้กรองน้ำที่มีปริมาตรสูง ส่วนกระดาษกรองประเภท Cellulose Acetate Filter ขนาดรูพรุน 0.8 ไมโครเมตร แม้จะใช้เวลากรองรวดเร็วกว่ากระดาษกรองประเภท Membrane Filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แต่ขนาดรูพรุนกระดาษกรองที่ใหญ่กว่า อาจทำให้ดักดีเอ็นเอในแหล่งน้ำได้น้อย (Eichmiller *et al.*, 2016; Lacoursiere-Roussel *et al.*, 2016; Liang and Keeley, 2013; Muha *et al.*, 2019; Turner *et al.*, 2014; Xing *et al.*, 2022)

และอีกหนึ่งปัจจัยที่ควรนำมาพิจารณาคือปริมาณตัวอย่างน้ำที่ทำการเก็บเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ข้อมูล แต่ในทางตรงกันข้ามการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำที่ปริมาตรมากเกินไปอาจยืดเวลาในการกรองและเพิ่มความน่าจะเป็นของการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอได้เช่นกัน (Hänfling *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020) ดังเช่นการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นว่าปริมาตรตัวอย่างน้ำทะเลที่สามารถตรวจสอบพบดีเอ็นเอของกลุ่มปลาหูคือ ที่ปริมาตรตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร และ 1 ลิตร เนื่องจากปริมาตรตัวอย่างน้ำทะเลที่น้อยช่วยลดระยะเวลาในการกรองตัวอย่างน้ำ ในขณะที่น้ำปริมาตร 2 ลิตร และ 5 ลิตร ไม่สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของกลุ่มปลาหู ในการเก็บรักษาตัวอย่างน้ำนั้นจำเป็นต้องเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิต่ำเพื่อลดการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ แต่ในขั้นตอนการกรอง ระบบกรองที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้เป็นระบบกรองที่สามารถควบคุมความเย็นให้อยู่ในอุณหภูมิต่ำได้ตลอดเวลาการทำงาน การกรองน้ำเป็นเวลานานนั้นจะทำให้ตัวอย่างดีเอ็นเอในน้ำเสื่อมสภาพได้ เนื่องจากน้ำที่ไม่ได้ถูกเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำจะทำให้ไม่เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิจกรรมของจุลินทรีย์และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้ดีเอ็นเอสลายตัว
 นั้นเอง (Harrison *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021)

5.2 วิธีการออกแบบไพรเมอร์และการทดสอบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับกลุ่มปลาที่ได้นำมาพัฒนาขึ้นใหม่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามี
 ความสามารถที่จับกับดีเอ็นเอของกลุ่มปลาที่ได้นำมาพัฒนาขึ้นใหม่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามี
 นั้นมีดีเอ็นเอของกลุ่มปลาที่เป็นกลุ่มเป้าหมายได้หรือไม่ในทันที สามารถช่วยบ่งชี้บริเวณที่มีกลุ่มปลา
 ทูอาศัยอยู่ได้ ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับกลุ่มสัตว์น้ำเป้าหมายนั้นเป็นหนึ่งในวิธี
 การศึกษาที่สำคัญของการใช้เทคนิค eDNA (Xiong *et al.*, 2022) โดยเฉพาะการศึกษาที่ต้องการ
 ตรวจสอบเฉพาะบางชนิดพันธุ์ เช่นงานวิจัยที่ทำการพัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับปลาฉลาม
Pristis pristis (Simpfendorfer *et al.*, 2016) ปลาคาร์พรัสเซียน *Carassius gibelio* ปลาตุ๊ก
 แอฟริกาเหนือ *Clarias gariepinus* ปลานิล *Oreochromis niloticus* ปลาที่อปปเมาร์ท กุดเจียน
Pseudorasbora parva (Keskin, 2014) และปลาสปอตการ์ *Lepisosteus oculatus* (Boothroyd
et al., 2016) การออกแบบไพรเมอร์และลักษณะของไพรเมอร์มีผลต่อความสำเร็จในการทำพีซีอาร์
 ได้ (Chuang *et al.*, 2013) ซึ่งเห็นได้ว่าแต่ละงานวิจัยมีการออกแบบไพรเมอร์จากยีนที่ต่างกันขึ้นอยู่กับ
 กับเป้าหมายของงานวิจัยนั้น ๆ และไพรเมอร์ที่ได้จากยีนที่ต่างกันมีผลต่อเรื่องของอุณหภูมิและเวลาที่
 เหมาะสมสำหรับขั้นตอนการทำพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จากยีน
 COI ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับกลุ่มปลา มีช่วงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการการทำพีซีอาร์ที่
 ปฏิกริยาถูกโซ่ ประกอบไปด้วย 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ 94 องศา
 เซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา
 45 วินาที และช่วงสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เช่นเดียวกับงานวิจัยของ
 Simpfendorfer *et al.* (2016) ออกแบบไพรเมอร์จากยีน COI เพื่อการตรวจหาปลาฉลามฟันใหญ่
 โดยมีปฏิกริยาถูกโซ่ในช่วง Denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ
 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Annealing 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ช่วง
 Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และช่วงสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที และ
 งานวิจัยของ Mahon *et al.* (2013) ได้ออกแบบไพรเมอร์จากยีน COI เพื่อตรวจหาปลาเอเชีย
 คาร์พที่แม่น้ำในรัฐชิคาโก และมีปฏิกริยาถูกโซ่ในการวิเคราะห์ผล ประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียส
 เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Annealing 50
 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ช่วง
 สุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที และสำหรับปลาทอง ปลาไน ประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Annealing 52 เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และช่วงสุดท้าย 72 – องศาเซลเซียส 3 นาที ซึ่งจากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นว่าเวลาในการทำปฏิกิริยาอุทกโซนั้นมีความจำเพาะ ในแต่ละงานวิจัย โดยในยีน *COI* มีการใช้อุณหภูมิและเวลาที่ต่างกันในทุกขั้นตอน การหาอุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมที่จำเพาะกับแต่ละไพรเมอร์จึงเป็นเรื่องสำคัญ และในอนาคตอาจเพิ่มการทดสอบ ความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์คู่นี้ให้มีความจำเพาะเจาะจงยิ่งขึ้นโดยอาจพัฒนาไพรเมอร์คู่นี้ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับปลาทุตัวสั้น (*R. brachysoma*) ปลาลัง (*R. kanagurta*) และปลาทุปาก-จิ้งจก (*R. faughni*) เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง

5.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับห้องปฏิบัติการ

การศึกษาครั้งนี้ที่สามารถพบดีเอ็นเอของกลุ่มปลาทุ หลังจากใส่กลุ่มปลาทุลงในถังน้ำทะเลเป็นเวลา 10 นาที ได้ดีกว่าหลังการใส่กลุ่มปลาทุลงในถังน้ำทะเลเป็นเวลา 60 นาที ทั้งนี้คาดว่าอัตราการปล่อยดีเอ็นเอ ความหนาแน่นดีเอ็นเอและอัตราการเผาผลาญของปลาทุที่เพิ่งใส่ในถังมีมากกว่า กล่าวคือขณะที่ปลาทุอยู่ในถังน้ำทะเลในช่วงเวลา 10 นาที กลุ่มปลาทุนั้นอาจมีความเครียดและยังต้องปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมใหม่ ส่งผลให้ปลาทุว่ายน้ำอย่างรวดเร็วตลอดเวลาทำให้เกิดการปล่อยดีเอ็นเอสูง แต่เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที กลุ่มปลาทุเริ่มปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ ส่งผลความเครียดลดลงทำให้มีการว่ายน้ำช้าอัตราการเผาผลาญและการปล่อยดีเอ็นเอออกมาลดน้อยลง (Klymus *et al.*, 2015; Pilliod *et al.*, 2014) โดยในงานวิจัยของ Klymus *et al.* (2015) ได้บันทึกปริมาณ eDNA ของปลาครีปที่นำมาเลี้ยงในถังเลี้ยง 6 สัปดาห์ต่อเนื่อง และพบว่าปริมาณ eDNA ที่ตรวจวัดได้สูงมากในช่วงสัปดาห์แรกของการเก็บข้อมูล ซึ่งอาจเกิดจากความเครียดและการพยายามปรับตัว เข้าหาสภาพแวดล้อมใหม่ส่งผลให้ปลาเคลื่อนที่มาก จึงทำให้อาจเกิดมูลหรือเนื้อเยื่อที่ปลาปลดปล่อย ออกมานำไปสู่การปลดปล่อย eDNA ที่สูงขึ้น ซึ่งมีความสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ และจากงานวิจัยของ Eva *et al.* (2016) ที่กล่าวว่าการศึกษาชนิดพันธุ์เป้าหมายอยู่ในสถานที่เก็บตัวอย่างจะต้องมีปริมาณดีเอ็นเอที่เพียงพอในการสุ่มตัวอย่าง ความหนาแน่นของดีเอ็นเอที่ปล่อยออกมานั้นขึ้นอยู่กับอัตราการเผาผลาญ (metabolic rates) ของสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย โดยความเข้มข้นของ eDNA ที่ถูกปล่อยออกมานั้นจะมีอัตราการคงอยู่ที่แตกต่างกันไปในแต่ละสิ่งแวดล้อม (Pilliod *et al.*, 2014) กล่าวคือหาก ณ ช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างมีสิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก หรือสัตว์น้ำเป้าหมายอพยพผ่านจุดเก็บตัวอย่างน้ำจะส่งผลให้พบความเข้มข้นของ eDNA มีความเข้มข้นมาก เนื่องจากเกิดการเผาผลาญเมตาบอลิซึมเช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าในช่วงที่กลุ่มปลาทุอยู่ในถังน้ำที่ 10 นาที มีความเข้มข้นของ eDNA มากกว่าช่วงที่กลุ่มปลาทุอยู่ในถังน้ำที่ 60 นาที ซึ่งอาจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทียบได้กับการกับการเก็บตัวอย่างน้ำในช่วงเวลาที่ปลาทูนั้นเพิ่งเคลื่อนที่อพยพผ่าน หรือมีจำนวนปลาที่เคลื่อนที่ผ่านจุดเก็บตัวอย่างน้ำจำนวนมาก เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Thalinger *et al.* (2019) ที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความเข้มข้นของ eDNA กับจำนวนปลาที่นับได้ในระหว่างการอพยพเพื่อไปวางไข่ของปลา Potamodromous ความเข้มข้นของ eDNA ในน้ำยังขึ้นอยู่กับช่วงชีวิตของปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำและกิจกรรมที่เกิดขึ้น เช่น การเคลื่อนที่อพยพย้ายถิ่นเพื่อเจริญเติบโต และการอพยพในช่วงฤดูสืบพันธุ์ เนื่องจากการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ การรวมตัวของวัยเจริญพันธุ์จำนวนมาก และการปรากฏตัวของปลาว่ายอ่อนในช่วงฤดูสืบพันธุ์ล้วนส่งผลต่อความเข้มข้นของ eDNA ที่สามารถตรวจพบได้ (Bracken *et al.*, 2019; Bylemans *et al.*, 2017; Kamoroff and Goldberg, 2018; Maruyama *et al.*, 2018; Nevers *et al.*, 2018; Plough *et al.*, 2018; Rourke *et al.*, 2022; Schloesser *et al.*, 2018; Spear *et al.*, 2015) ตัวอย่างเช่น Bracken *et al.* (2019) สังเกตความเข้มข้นของ eDNA ในน้ำในแม่น้ำเพิ่มขึ้นในช่วงฤดูวางไข่ของปลาแลมเพอร์รี่ (*Petromyzon marinus*) มีสาเหตุมาจากการมารวมตัวของปลาที่โตเต็มวัยเพื่อวางไข่ ซากของปลาที่ตายหลังวางไข่ และเซลล์สืบพันธุ์

5.4 การตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุในระดับภาคสนาม

จากการนำวิธีการมาตรฐานจากการศึกษาครั้งนี้มาตรวจสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาทุในธรรมชาตินั้น พบว่าสามารถตรวจสอบพบดีเอ็นเอของกลุ่มปลาทุได้เพียง 1 ครั้ง คือช่วงเวลาเก็บตัวอย่างน้ำทะเลเดือนพฤศจิกายน ส่วนในช่วงเดือนธันวาคมถึงเดือนเมษายนไม่สามารถพบดีเอ็นเอของกลุ่มปลาทุได้ เมื่อพิจารณาจากข้อมูลสถิติปริมาณการจับปลาทุรายเดือนโดยประมงพาณิชย์และประมงพื้นบ้านของทั้งประเทศในปี 2564 ถึง 2565 ซึ่งตรงกับช่วงเวลาที่ได้ทำการศึกษา (เดือนพฤศจิกายน 2564 ถึง เดือนเมษายน 2565) มีปริมาณการจับปลาทุอยู่ที่ 1947.09, 1944.76, 2218.38, 2252.78, 2418.72 และ 2629.24 ตัน (กรมประมง, 2564; กรมประมง, 2565) ตามลำดับ ซึ่งสถิติการจับนี้ไม่สามารถสะท้อนปริมาณปลาที่บริเวณพื้นที่ศึกษาได้ และเนื่องจากข้อจำกัดเรื่องข้อมูลการจับปลาทุบริเวณแหล่งประมงของพื้นที่ศึกษา คือบริเวณจังหวัดสมุทรสงคราม การทดลองครั้งนี้จึงไม่สามารถอธิบายยืนยันความสัมพันธ์ของประสิทธิภาพการใช้วิธีมาตรฐานตรวจสอบการมีอยู่ของปลาทุด้วย eDNA และปริมาณปลาทุในธรรมชาติได้อย่างชัดเจน แต่การเปรียบเทียบระหว่างปริมาณของปลาในธรรมชาติ และการใช้ eDNA ในการประเมินการมีอยู่ของสัตว์น้ำเป้าหมายได้ถูกตรวจสอบมาแล้วในปลาหลายชนิด เช่นงานวิจัยของ Yatsuyanagi *et al.* (2020) เป็นอีกตัวอย่างที่ใช้ eDNA ในการติดตามการอพยพเพื่อการสืบพันธุ์ของปลาชิซาโมะ (*Spirinchus lanceolatus*) ที่เป็นปลาเศรษฐกิจ โดยการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างปริมาณการจับปลา และการใช้ eDNA ในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเมินการมีอยู่ของปลาชนิดนี้ ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของ eDNA นั้นสอดคล้องกับปริมาณปลาที่อพยพจากข้อมูลการสำรวจการจับปลา ซึ่งให้เห็นว่าการตรวจจับ eDNA มีประโยชน์ในการติดตามการอพยพเพื่อสืบพันธุ์ของปลาชิมาโมะโต้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการอพยพของปลาระหว่างทะเลและแม่น้ำ ของ Yamanaka and Minamoto (2016) ที่ได้ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค eDNA ในการระบุการมีอยู่ของปลากะพงญี่ปุ่น (*Lateolabrax japonicus*) ปลากะบอกเทา (*Mugil cephalus*) และปลาอายุ (*Plecoglossus altivelis altivelis*) ซึ่งทำให้สามารถทราบถึงถิ่นที่อยู่อาศัยของปลาทั้งสามชนิดที่แตกต่างกันได้ (Yatsuyanagi *et al.*, 2020) ปลากรีนสเตอร์เจียน *Acipenser medirostris* (Bergman *et al.*, 2016) สามารถตรวจพบ eDNA ได้แม้ว่าไม่มีการบันทึกการอพยพอย่างชัดเจนและไม่จำเป็นต้องพบตัวปลาในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง อีกทั้งงานวิจัยที่ศึกษาหาปัจจัยที่ส่งผลต่อการลดลงของความเข้มข้น eDNA โดยการเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้น eDNA ระหว่างปลาครีปลและปลาทอง (Klymus *et al.*, 2015) ซึ่งให้เห็นว่าความเข้มข้น eDNA มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับจำนวนปลา คือหากมีจำนวนปลามาก ปริมาณความเข้มข้น eDNA ก็จะมีมากขึ้นด้วย เนื่องจากปลามีการปลดปล่อย eDNA ออกมามากทั้งในรูปของมูล และเนื้อเยื่อที่เกิดจากการเคลื่อนที่หาอาหารและการกินอาหารนั่นเอง ผลการศึกษาจากงานวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าวิธี eDNA ที่นำมาใช้ในที่นี้สามารถติดตามการอพยพตามฤดูกาลของปลาในแหล่งน้ำได้

การอพยพของปลาทุในอ่าวไทยอาจช่วยอธิบายการพบดีเอ็นเอของกลุ่มปลาทุได้ในเดือนพฤศจิกายน บริเวณจังหวัดสมุทรสาคร เนื่องจากเป็นช่วงที่ฝูงปลาทุในพื้นที่อ่าวไทยฝั่งตะวันตกว่ายน้ำขึ้นมาทางทิศเหนือมุ่งหน้าสู่พื้นที่อ่าวไทยตอนในซึ่งเป็นปลาทุสาวในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน ส่วนในช่วงเดือนธันวาคมถึงเดือนมกราคมแม้จะมีปริมาณการจับปลาทุได้มากคือ 1944.76 ตัน และ 2218.38 ตัน ตามลำดับ แต่ไม่สามารถพบดีเอ็นเอของปลาทุได้ เนื่องจากถึงฤดูกาลที่ต้องสืบพันธุ์คือ ในช่วงประมาณเดือนธันวาคม - เดือนมกราคม ปลาทุที่อาศัยอยู่ในบริเวณอ่าวไทยตอนใน (จังหวัดสมุทรสาคร และสมุทรสงคราม) ที่พร้อมที่จะสืบพันธุ์ได้ก็จะเริ่มอพยพไปยังแหล่งวางไข่ ซึ่งจะอยู่ตามยาวของแนวชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตั้งแต่ อำเภอบางคนที จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร ไปจนถึงหมู่เกาะต่าง ๆ ของจังหวัดสุราษฎร์ธานี และจะเริ่มทยอยวางไข่ตั้งแต่เดือนมกราคม และในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายนเป็นช่วงที่ลูกปลาทุที่เกิดใหม่เริ่มเดินทางเข้าหาฝั่งและมีการเจริญเติบโตในพื้นที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์, 2550; คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2563) จึงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ไม่สามารถพบดีเอ็นเอของปลาทุได้ในเดือนธันวาคมถึงเดือนเมษายน

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการวิจัย

จากการพัฒนาเทคนิค eDNA เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาในธรรมชาติบริเวณอ่าวไทย ในครั้งนี้ ทำให้ได้วิธีมาตรฐานที่จะสามารถนำมาใช้ตรวจสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาในธรรมชาติ โดยพบว่ากระดาษกรองประเภท Membrane Filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร มีความเหมาะสมในการกรองน้ำเพื่อสำรวจ eDNA เนื่องจากใช้เวลาในการกรองตัวอย่างน้ำได้เร็ว ช่วยประหยัดเวลาในการสำรวจภาคสนาม ส่วนการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับกลุ่มปลาทำให้ได้ไพรเมอร์จากยีน COI จำนวน 1 คู่ และไพรเมอร์คู่นี้มีความจำเพาะเจาะจงกับกลุ่มปลาเท่านั้น สามารถใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีปริมาณตั้งแต่ 0.02 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร จากกระดาษกรองได้ และการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการสามารถพบดีเอ็นเอของปลาได้จากการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลเพียง 100 มิลลิลิตรเท่านั้น ทำให้สะดวกในการสำรวจในภาคสนาม การตรวจสอบการมีอยู่ของปลาในภาคสนามบริเวณปากแม่น้ำแม่กลอง ตำบลแม่กลอง อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2564 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2565 พบว่าวิธีการมาตรฐานที่ได้ทำการพัฒนานั้นสามารถนำมาใช้ตรวจสอบการมีอยู่ของกลุ่มปลาในธรรมชาติได้ เนื่องจากพบแลบดีเอ็นเอจากการเก็บตัวอย่างน้ำในช่วงเดือนพฤศจิกายนได้นั่นเอง จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีมาตรฐานที่ได้ทำการทดสอบดังกล่าวข้างต้น ได้แก่ การทดสอบประเภทกระดาษกรอง ขนาดรูพรุนกระดาษกรอง การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับกลุ่มปลา และการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการสามารถที่จะนำไปสู่การตรวจสอบหาการมีอยู่ของกลุ่มปลาในธรรมชาติระดับภาคสนามได้อย่างมีประสิทธิภาพ

6.2 ข้อเสนอแนะ

1 สำหรับการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างน้ำอาจทำการเก็บตัวอย่างน้ำที่มาจากบ่อเลี้ยงปลา หรือจากอควาเรียมที่มีปลาอยู่จริง เพื่อพิสูจน์ให้แน่ชัดว่าวิธีการต่างๆ ที่พัฒนาขึ้นมานั้นสามารถตรวจพบปลาได้

2 สำหรับไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบเพื่อให้มีความจำเพาะเจาะจงกับกลุ่มปลา นั้นในอนาคตอาจพัฒนาโดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับปลาชนิดพันธุ์ใดชนิดพันธุ์หนึ่งเท่านั้น

3 สำหรับขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่อาจทดลองเพิ่มรอบวัฏจักรพีซีอาร์ เพื่อให้ได้จำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กาญจนา สุจิราชาติ, โชติช่วง พนโสภาณกุล, รัชณี สุวรรณนุรักษ์, จันจิรา เครือดี, ศิริขวัลญ ะวาดชู และ วิชาญ เปี้ยวนิม. 2564. ประสิทธิภาพของ DNA จากน้ำลายและเส้นผมของคนสกัดด้วยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol. วารสารก้าวหน้าทันตวิทยาศาสตร์, 21(1) : 119-134.

กรมประมง. 2558. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2556. กรมประมง กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์. 92 หน้า.

กรมประมง. 2559. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2557. กรมประมง กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์. 93 หน้า.

กรมประมง. 2560ก. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2558. กรมประมง กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์. 92 หน้า.

กรมประมง. 2560ข. ปริมาณการจับสัตว์น้ำเค็มจากการทำประมงพาณิชย์ 2559. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 199 หน้า.

กรมประมง. 2561ก. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2559. กรมประมง กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์. 92 หน้า.

กรมประมง. 2561ข. ปริมาณการจับสัตว์น้ำเค็มจากการทำประมงพาณิชย์ 2560. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 199 หน้า.

กรมประมง. 2561ค. ปริมาณการจับสัตว์น้ำเค็มจากการทำประมงพื้นบ้าน 2560. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 145 หน้า.

กรมประมง. 2562ก. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2560. กรมประมง กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์. 92 หน้า.

กรมประมง. 2562ข. ปริมาณการจับสัตว์น้ำเค็มจากการทำประมงพาณิชย์ 2561. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 197 หน้า.

กรมประมง. 2562ค. ปริมาณการจับสัตว์น้ำเค็มจากการทำประมงพื้นบ้าน 2561. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 120 หน้า.

กรมประมง. 2563ก. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2561. กรมประมง กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์. 88 หน้า.

กรมประมง. 2563ข. ปริมาณการจับสัตว์น้ำเค็มจากการทำประมงพาณิชย์ 2562. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 191 หน้า.

กรมประมง. 2563ค. ปริมาณการจับสัตว์น้ำเค็มจากการทำประมงพื้นบ้าน 2562. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 120 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรมประมง. 2564ก. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2562. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 92 หน้า.

กรมประมง. 2564ข. ปริมาณการจับสัตว์น้ำเค็มจากการทำประมงพาณิชย์ 2563. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 191 หน้า.

กรมประมง. 2564ค. ปริมาณการจับสัตว์น้ำเค็มจากการทำประมงพื้นบ้าน 2563. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 132 หน้า.

กรมประมง. 2565ก. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2563. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 92 หน้า.

กรมประมง. 2565ข. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2564. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 92 หน้า.

กรมประมง. 2565ค. ปริมาณการจับสัตว์น้ำเค็มจากการทำประมงพาณิชย์ 2564. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 188 หน้า.

กรมประมง. 2565ง. ปริมาณการจับสัตว์น้ำเค็มจากการทำประมงพื้นบ้าน 2564. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 144 หน้า.

กรมประมง. 2566ก. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2565. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 95 หน้า.

กรมประมง. 2566ข. ปริมาณการจับสัตว์น้ำเค็มจากการทำประมงพาณิชย์ 2565. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 187 หน้า.

กรมประมง. 2566ค. ปริมาณการจับสัตว์น้ำเค็มจากการทำประมงพื้นบ้าน 2565. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 143 หน้า.

คณะประมง. 2563. รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการบูรณาการฐานข้อมูลและองค์ความรู้ปัจจุบัน ด้านสถานการณ์และปัญหาของทรัพยากรปลาในอ่าวไทยเพื่อการบริหารจัดการประมงอย่างยั่งยืน. กรุงเทพฯ : คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดำริห์ สมใจวงศ์. 2523. การทดลองติดเครื่องหมายปลาทุปล่อยลงทะเลในอ่าวไทย. กองประมงทะเล กรมประมง. กรุงเทพฯ : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ธีระรักษ์ ศรีนวลกราย และ ศานิต ปิยพัฒนาการ. 2552. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลา *Rastrelliger brachysoma* ในอ่าวไทยและทะเลอันดามันโดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR. หน้า 254-260. ใน การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

ปวันรัตน์ บัวโรย, เจษฎ์ เกษตรระทัต, เพราลัย นุชหมอน และศานิต ปิยพัฒนาการ. 2557.

“โครงสร้างประชากรปลาลัง *Rastrelliger kanagurta* (Cuvier, 1816) ที่พบในประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ฝั่งทะเลอันดามันโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน Cytochrome b. หน้า 271-277. ใน **การประชุมวิทยาศาสตร์ทางทะเล ครั้งที่ 4**. กรุงเทพฯ : กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลชายฝั่ง และป่าชายเลน.
- พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์. 2554. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตกรณีศึกษา: จิ้ง Cytochrome c Oxidase I (COI) ในสัตว์; DNA Barcode for Identification of Living Species: Case Studies of Cytochrome c Oxidase I (COI) in Animals. Rajabhat Maha Sarakham University Journal, 5(2) 205-210.
- ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์ 2550. ปิดอ่าว เพื่ออะไร ใครได้ประโยชน์. **วารสารการประมง**. (60)1 : 55-63.
- วิสุทธิ ไปไม้. 2536. **พันธุศาสตร์**. ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : เจ้าพระยาระบบการพิมพ์.
- สุกัญญา สุนทรส. 2549. **อิเล็กโทรโฟรีซิส**. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุทัศน์ ดวงจิตร. 2554. “ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอและการประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์.” **วารสารนิติเวชศาสตร์**. 4(1) : 53-65.
- สุนีย์ สุภักษ์พันธ์ และอำพัน เหลือสินทรัพย์. 2508. “ผลการวิเคราะห์สิ่งที่มีอยู่ในกระเพาะและลำไส้ของปลาทุในอ่าวไทย ปี 2506.” หน้า 209-218. ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ครั้งที่ 4 สาขาพืชและชีววิทยา กับสาขาสัตว์**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์.
- สิริธร กังแสง, รัตนาวลี พูลสวัสดิ์ และอัครพงษ์ สวัสดิพงษ์. 2559. “โครงสร้างประชากรปลาที่ถูกทำประมงในบริเวณอ่าวไทยตอนบน.” ใน **การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 54**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อากัสสรฯ ขมิတ်. 2537. **เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส Electrophoresis techniques**. กรุงเทพฯ : รั้วเขียว.
- Abdel-Latif, A., & Osman, G. 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. **Plant methods**. 13: 1-9.
- Balasingham, K. D., Walter, R. P., Mandrak, N. E., & Heath, D. D. 2018. Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. **Molecular Ecology**. 27(1): 112-127.
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. 2016. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. **Conservation genetics**. 17(1): 1-17.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bartlett, S. E., & Davidson, W. S. 1991. Identification of Thunnus Tuna Species by the Polymerase Chain Reaction and Direct Sequence Analysis of their Mitochondrial Cytochrome b Genes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. 48(2): 309-317.
- Bergman, P. S., Schumer, G., Blankenship, S., & Campbell, E. 2016. Detection of Adult Green Sturgeon Using Environmental DNA Analysis. **PLoS One**. 11(4).
- Boothroyd, M., Mandrak, N. E., Fox, M., & Wilson, C. C. 2016. Environmental DNA (eDNA) detection and habitat occupancy of threatened spotted gar (*Lepisosteus oculatus*).
- Bracken, F. S. A., Rooney, S. M., Kelly-Quinn, M., King, J. J., & Carlsson, J. 2019. Identifying spawning sites and other critical habitat in lotic systems using eDNA "snapshots": A case study using the sea lamprey *Petromyzon marinus* L. **Ecology and Evolution**. 9(1): 553-567.
- Bucklin, A., Wiebe, P. H., Smolenack, S. B., Copley, N. J., Beaudet, J. G., Bonner, K. G., Farber-Lorda, J., & Pierson, J. J. 2007. DNA barcodes for species identification of euphausiids (Euphausiacea, Crustacea). **Journal of Plankton Research**. 29(6): 483-493.
- Bylemans, J., Furlan, E. M., Hardy, C. M., McGuffie, P., Lintermans, M., & Gleeson, D. M. 2017. An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: A case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*). **Methods in Ecology and Evolution**. 8(5): 646-655.
- Carpenter, K. E., & Niem, V. H. 2001. FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific. Volume 6. Bony fishes part 4 (*Labridae* to *Latimeriidae*), estuarine crocodiles, sea turtles, sea snakes and marine mammals. **FAO Library**.
- Čekovská, b. K., Čekovská, K., Scholar, S. o., Publications, V., Šanda, R., Ašenbrennerová, E., Kassar, A., Zogaris, D., Pappalardo, A. M., Tarkan, A. S., Vasil'eva, E., Santos, D., & Vukić, J. 2023. Cytochrome b Sequencing as a Tool for Identification of Morphologically Similar Mediterranean Gobies *Gobius incognitus* and *Gobius bucchichi* (Actinopterygii: Gobiidae). **Journal of Marine Science and Engineering**. 11(12).
- Chuang, L. Y., Cheng, Y. H., & Yang, C. H. 2013. Specific primer design for the polymerase chain reaction. **Biotechnology letters**. 35: 1541-1549.

- Civade, R., Dejean, T., Valentini, A., Roset, N., Raymond, J.-C., Bonin, A., Taberlet, P., & Pont, D. 2016. Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. **PLoS One**. 11(6).
- Czeglédi, I., Sály, P., Specziár, A., Preiszner, B., Szalóky, Z., Maroda, Á., Pont, D., Meulenbroek, P., Valentini, A., & Erő, T. 2021. Congruency between two traditional and eDNA-based sampling methods in characterising taxonomic and trait-based structure of fish communities and community-environment relationships in lentic environment. **Ecological Indicators**. 129.
- Daebok, M., Iamsamang, S., Srisaivramas, B., & Khoonsab, K. 2018. การเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอในใบมะขามแห้งที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน โดยใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์. **Journal of Science and Technology Phetchabun Rajabhat University**. 3(1): 40-54.
- Deiner, K., & Altermatt, F. 2014. Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. **PLoS One**. 9(2).
- Deiner, K., Bik, H. M., Machler, E., Seymour, M., Lacoursiere-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., Vere, N. d., Pfrender, M. E., & Bernatchez, L. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. **Molecular Ecology**. 26(21): 5872-5895.
- Eichmiller, J. J., Miller, L. M., & Sorensen, P. W. 2016. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. **Molecular Ecology Resources**. 16(1): 56-68.
- Eva, B., Harmonyb, P., Thomasc, G., Francoisd, G., Alicea, V., Claudee, M., & Tony, D. 2016. Trails of river monsters: Detecting critically endangered Mekong giant catfish *Pangasianodon gigas* using environmental DNA. **Global Ecology and Conservation**. 7: 148-156.
- Evans, N. T., Li, Y., Renshaw, M. A., Olds, B. P., Deiner, K., Turner, C. R., Jerde, C. L., Lodge, D. M., Lamberti, G. A., & Pfrender, M. E. 2017. Fish community assessment with eDNA metabarcoding: effects of sampling design and bioinformatic filtering. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. 74(9): 1362-1374.
- Fahner, N. A., Shokralla, S., Baird, D. J., & Hajibabaei, M. 2016. Large-Scale Monitoring of Plants through Environmental DNA Metabarcoding of Soil: Recovery, Resolution, and Annotation of Four DNA Markers. **PLoS One**. 11(6).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. **Biology Letters**. 4(4): 423-425.
- Frézal, L., & Leblois, R. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**. 8(5): 727-736.
- Garlapati, D., Charankumar, B., Ramu, K., Madeswaran, P., & Murthy, M. V. R. 2019. A review on the applications and recent advances in environmental DNA (eDNA) metagenomics. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**. 18: 389-411.
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Kristy Deiner, Katy E. Klymus, Francis Thomsen, P., Murphy, M. A., Spear, S. F., McKee, A., Oyler-McCance, S. J., Cornman, R. S., Matthew B. Laramie, Mahon, A. R., Lance, R. F., Pilliod, D. S., Strickler, K. M., Waits, L. P., Fremier, A. K., Takahara, T., Herder, J. E., & Taberlet, P. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. **Methods in Ecology and Evolution**. 7(11): 1299-1307.
- Goutte, A., Molbert, N., Guérin, S., Richoux, R., & Rocher, V. 2020. Monitoring freshwater fish communities in large rivers using environmental DNA metabarcoding and a long-term electrofishing survey. **Journal of Fish Biology**. 97(2): 444-452.
- Hänfling, B., Handley, L. L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., Blackman, R. C., Oliver, A., & Winfield, I. J. 2016. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. **Molecular Ecology**. 25(13): 3101-3119.
- Harrison, J. B., Sunday, J. M., & Rogers, S. M. 2019. Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. **Proceedings of the Royal Society B**, 286(1915). 286(1915).
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**. 270.
- Irene, A. K., & Patricia, B. H. 2016. An eDNA Assay to Monitor a Globally Invasive Fish Species from Flowing Freshwater. **PLoS One**. 11(1): 1-22.
- Kamoroff, C., & Goldberg, C. S. 2018. Environmental DNA quantification in a spatial and temporal context: A case study examining the removal of brook trout from a high alpine basin. **Limnology**. 19: 335-342.

- Keskin, E. 2014. Detection of invasive freshwater fish species using environmental DNA survey. **Biochemical Systematics and Ecology**. 56: 68-74.
- Keskin, E., Unal, E. M., & Atar, H. H. 2016. Detection of rare and invasive freshwater fish species using eDNA pyrosequencing: Lake Iznik ichthyofauna revised. **Biochemical Systematics and Ecology**. 67: 29-36.
- Klymus, K. E., Richter, C. A., Chapman, D. C., & Paukert, C. 2015. Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. **Biological Conservation**. 183: 77-84.
- Kongseng, S., Phoonsawat, R., Wanchana, W., & Swatdipong, A. 2021 b. Genetic mixed-stock analysis of short mackerel, *Rastrelliger brachysoma*, catches in the Gulf of Thailand: Evidence of transboundary migration of the commercially important fish. **Fisheries Research**. 235.
- Kongseng, S., Phoonsawat, R., & Swatdipong, A. 2020 a. Individual assignment and mixed-stock analysis of short mackerel (*Rastrelliger brachysoma*) in the Inner and Eastern Gulf of Thailand: Contrast migratory behavior among the fishery stocks. **Fisheries Research**. 221.
- Lacoursiere-Roussel, A., Rosabal, M., & Bernatchez, L. 2016. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. **Molecular Ecology Resources**. 16(6): 1401-1414.
- Lance, R. F., Klymus, K. E., Richter, C. A., Guan, X., Farrington, H. L., Carr, M. R., Thompson, N., Chapman, D. C., & Baerwaldt, K. L. 2017. Experimental observations on the decay of environmental DNA from bighead and silver carps **Management of Biological Invasions**. 8(3): 343-359.
- Liang, Z., & Keeley, A. 2013. Filtration recovery of extracellular DNA from environmental water samples. **Environmental Science & Technology**. 47(16): 9324-9331.
- Littlefair, J. E., Hrenchuk, L. E., Blanchfield, P. J., Rennie, M. D., & Cristescu, M. E. 2021. Thermal stratification and fish thermal preference explain vertical eDNA distributions in lakes. **Molecular Ecology**. 30(13): 3083-3096.
- Mahon, A. R., Jerde, C. L., Galaska, M., Bergner, J. L., Chadderton, W. L., Lodge, D. M., Hunter, M. E., & Nico, L. G. 2013. Validation of eDNA Surveillance Sensitivity for Detection of Asian Carps in Controlled and Field Experiments. **PLoS One**. 8(3).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M., & Minamoto, T. 2014. The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish. **PLoS One**. 9(12).
- Maruyama, A., Sugatani, K., Watanabe, K., Yamanaka, H., & Imamura, A. 2018. Environmental DNA analysis as a non-invasive quantitative tool for reproductive migration of a threatened endemic fish in rivers. **Ecology and Evolution**. 8(23): 11964-11974.
- McCull-Gausden, E. F., Weeks, A. R., Coleman, R. A., Robinson, K. L., Song, S., Raadik, T. A., & Tingley, R. 2021. Multispecies models reveal that eDNA metabarcoding is more sensitive than backpack electrofishing for conducting fish surveys in freshwater streams. **Molecular Ecology**. 30(13): 3111-3126.
- McDevitt, A. D., Sales, N. G., Browett, S. S., Sparnenn, A. O., Mariani, S., Wangensteen, O. S., Coscia, I., & Benvenuto, C. 2019. Environmental DNA metabarcoding as an effective and rapid tool for fish monitoring in canals. **Journal of Fish Biology**. 95(2): 679-682.
- Mirimin, L., Desmet, S., Romero, D. L., Fernandez, S. F., Miller, D. L., Mynott, S., Brincau, A. G., Stefanni, S., Berry, A., Gaughan, P., & Aguzzi, J. 2021. Don't catch me if you can – Using cabled observatories as multidisciplinary platforms for marine fish community monitoring: An in situ case study combining Underwater Video and environmental DNA data. **Science of the Total Environment**. 773.
- Mondal, D., & Mandal, N. 2020. Molecular phylogeny of mitochondrial DNA: Shrimp species identification by multiplex and real-time PCR. **Food Control**. 108.
- Muha, T. P., Robinson, C. V., Leaniz, C. G. d., & Consuegra, S. 2019. An optimised eDNA protocol for detecting fish in lentic and lotic freshwaters using a small water volume. **PLoS One**. 14(7).
- Nagler, M., Podmirseg, S. M., Ascher-Jenull, J., Sint, D., & Traugott, M. 2022. Why eDNA fractions need consideration in biomonitoring. **Molecular Ecology Resources**. 22(7): 2458-2470.
- Nevers, M. B., Byappanahalli, M. N., Morris, C. C., Shively, D., Przybyla-Kelly, K., Spoljaric, A. M., Dickey, J., & Roseman, E. F. 2018. Environmental DNA (eDNA): A tool for quantifying the abundant but elusive round goby (*Neogobius melanostomus*). **PLoS One**. 13(1).

- Panprommin, D., Soontornprasit, K., Tuncharoen, S., Pithakpol, S., Kannika, K., & Wongta, K. 2023. DNA barcoding for fish species identification and diversity assessment in the Mae Tam reservoir, Thailand. **Fisheries and Aquatic Sciences**. 26(9): 548-557.
- Pfleger, M. O., Rider, S. J., Johnston, C. E., & Janosik, A. M. 2016. Saving the doomed: Using eDNA to aid in detection of rare sturgeon for conservation (*Acipenseridae*). **Glob Ecol Conserv**. 8: 99-107.
- Picard, M., Wallace, D. C., & Burrelle, Y. 2016 The rise of mitochondria in medicine. **Mitochondrion**. 30: 105-116.
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. 2014. Factors Influencing Detection of eDNA from a Stream-dwelling Amphibian. **Molecular Ecology Resources**. 14(1): 109-116.
- Plough, L. V., Ogburn, M. B., Fitzgerald, C. L., Geranio, R., Marafino, G. A., & Richie, K. D. 2018. Environmental DNA analysis of river herring in Chesapeake Bay: A powerful tool for monitoring threatened keystone species. **PLoS One**. 13(11).
- Pont, D., Rocle, M., Alice Valentini, Raphaël Civade, Jean, P., Maire, A., Roset, N., Schabuss, M., Zornig, H., & Dejean, T. 2018. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. **Scientific reports**. 8(1): 1-13.
- Pont, D., Valentini, A., Rocle, M., Maire, A., Delaigue, O., Jean, P., & Dejean, T. 2021. The future of fish-based ecological assessment of European rivers: from traditional EU Water Framework Directive compliant methods to eDNA metabarcoding-based approaches. **Journal of Fish Biology**. 98(2): 354-366.
- Port, J. A., O'Donnell, J. L., Romero-Maraccini, O. C., Leary, P. R., Litvin, S. Y., Nickols, K. J., Yamahara, K. M., & Kelly, R. P. 2016. Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. **Molecular Ecology**. 25(2): 527-541.
- Robinson, C. V., Leaniz, C. G. d., Rolla, M., & Consuegra, S. 2019. Monitoring the eradication of the highly invasive topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*) using a novel eDNA assay. **Environmental DNA**. 1(1): 74-85.
- Rodríguez-Ezpeleta, N., Zinger, L., Kinzinger, A., Bik, H. M., Bonin, A., Coissac, E., Emerson, B. C. C. O., Martins Lopes, C., Pelletier, T. A., Taberlet, P., & Narum, S. 2021.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Biodiversity monitoring using environmental DNA. **Molecular Ecology Resources**. 21(5): 1405–1409.
- Rourke, M. L., Fowler, A. M., Hughes, J. M., Broadhurst, M. K., DiBattista, J. D., Fielder, S., Walburn, J. W., & Furlan, E. M. 2022. Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. **Environmental DNA**. 4(1): 9-33.
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. **Global Ecology and Conservation**. 17: 1-29.
- Sansom, B. J., & Sassoubre, L. M. 2017. Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates to Model Freshwater Mussel eDNA Transport in a River. **Environmental science & technology**. 51(24): 14244-14253.
- Sassoubre, L. M., Yamahara, K. M., Gardner, L. D., Block, B. A., & Boehm, A. B. 2016. Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish. **Environmental science & technology**. 50(19): 10456-10464.
- Schloesser, N. A., Merkes, C. M., Rees, C. B., Amberg, J. J., Steeves, T. B., & Docker, M. F. 2018. Correlating sea lamprey density with environmental DNA detections in the lab. **Management of Biological Invasions**. 9(4): 483-495.
- Sepulveda, A. J., Nelson, N. M., Jerde, C. L., & Luikart, G. 2020. Are environmental DNA methods ready for aquatic invasive species management. **Trends in ecology & evolution**. 35(8): 668-678.
- Shaw, J. L. A., Clarke, L. J., Wedderburn, S. D., Barnes, T. C., Weyrich, L. S., & Cooper, A. 2016. Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. **Biological conservation**. 197: 131-138.
- Simpfendorfer, C. A., Kyne, P. M., Noble, T. H., Goldsbury, J., Basiita, R. K., Lindsay, R., Shields, A., Perry, C., & Jerry, D. R. 2016. Environmental DNA detects Critically Endangered largemouth sawfish in the wild. **Endangered Species Research**. 30: 109-116.
- Spear, S. F., Groves, J. D., Williams, L. A., & Waits, L. P. 2015. Using environmental DNA methods to improve detectability in a hellbender (*Cryptobranchus alleganiensis*) monitoring program. **Biological conservation**. 183: 38-45.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Strickler, K. M., Fremier, A. K., & Goldberg, C. S. 2015. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. **Biological conservation**. 183: 85-92.
- Takahara, T., Minamoto, T., & Doi, H. 2013. Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds. **PLoS One**. 8(2).
- Thalinger, B., Wolf, E., Traugott, M., & Wanzenböck, J. 2019. Monitoring spawning migrations of potamodromous fish species via eDNA. **Scientific reports**. 9(1).
- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. 2015. Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. **Biological conservation**. 183: 4-18.
- Tsuji, S., Yamanaka, H., & Minamoto, T. 2017. Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples. **Limnology**. 18: 1-7.
- Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., & Lodge, D. M. 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. **Methods in Ecology and Evolution**. 5(7): 676-684.
- Valdivia-Carrillo, T., Rocha-Olivares, A., Reyes-Bonilla, H., Domínguez-Contreras, J. F., & Munguía-Vega, A. 2021. Integrating eDNA metabarcoding and simultaneous underwater visual surveys to describe complex fish communities in a marine biodiversity hotspot. **Molecular Ecology Resources**. 21(5): 1558-1574.
- Wang, S., Yan, Z., Hänfling, B., Zheng, X., Wang, P., Fan, J., & Li, J. 2021. Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. **Science of the Total Environment**. 755.
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Lowe, W. H., & Schwartz, M. K. 2015. Environmental DNA particle size distribution from Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). **Conservation Genetics Resources**. 7(3): 639-641.
- Xing, Y., Gao, W., Shen, Z., Zhang, Y., Bai, J., Cai, X., Ouyang, J., & Zhao, Y. 2022. A Review of Environmental DNA Field and Laboratory Protocols Applied in Fish Ecology and Environmental Health. **Frontiers in Environmental Science**. 10.
- Xiong, F., Shu, L., Zeng, H., Gan, X., He, S., & Peng, Z. 2022. Methodology for fish biodiversity monitoring with environmental DNA metabarcoding: the primers, databases and bioinformatic pipelines. **Water Biology and Security**. 1(1).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Yamanaka, H., & Minamoto, T. 2016. The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. **Ecological Indicators**. 62: 147-153.
- Yatsuyanagi, T.,Ishida, R.,Sakata, M. K.,Kanbe, T.,Mizumoto, H.,Kobayashi, Y.,Kamada, S.,Namba, S.,Nii, H.,Minamoto, T., & Araki, H. 2020. Environmental DNA monitoring for short-term reproductive migration of endemic anadromous species, Shishamo smelt (*Spirinchus lanceolatus*). **Environmental DNA**. 2(2): 130-139.
- Zhang, S.,Zhao, J., & Yao, M. 2020. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. **Methods in Ecology and Evolution**. 11(12): 1609-1625.
- Zou, K.,Chen, J.,Ruan, H.,Li, Z.,Guo, W.,Li, M., & Liu, L. 2020. eDNA metabarcoding as a promising conservation tool for monitoring fish diversity in a coastal wetland of the Pearl River Estuary compared to bottom trawling. **Science of the Total Environment**. 702.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ- นามสกุล นางสาวนิลบล ไพรินทร์
วัน เดือน ปีเกิด 16 มีนาคม พ.ศ. 2534
ที่อยู่ปัจจุบัน 42/2 ม.11 ต.บึงน้ำรักษ์ อ.บางน้ำเปรี้ยว จ.ฉะเชิงเทรา 24170
ประวัติการศึกษา (2557) วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะเทคโนโลยีทางทะเล เกردเฉลี่ย 3.13
(มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี)
(2553) มัธยมศึกษาตอนปลาย เกรดเฉลี่ย 3.33
(โรงเรียนดอนฉิมพลีพิทยาคม)

ผลงานวิจัย

พ.ศ. 2565

การพัฒนาเทคนิค Environmental DNA เพื่อตรวจสอบการมี
อยู่ของกลุ่มปลาในธรรมชาติบริเวณอ่าวไทย ในงานประชุมวิชาการ
วิทยาศาสตร์ทางทะเลครั้งที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้