

## บทความวิจัย

# การศึกษาบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลาสกุล *Oryzias* และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *O. minutillus* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย

สินัย สมิตินุชานนท์ อัจฉริยา รั้งมรุจิ\* และ วิเชียร มากตุ่น

### บทคัดย่อ

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *Oryzias minutillus*, *O. mekongensis*, *O. javanicus*, *O. dancena* และ *O. celebensis* พบ 3 domain ที่สำคัญ domain I พบ termination-associated sequence (TAS) และ extended termination-associated sequence (ETAS) domain II พบ central conserved sequence block 3 บริเวณ (CSB-F, CSB-E, CSB-D) และ domain III พบ conserved sequence block 3 บริเวณ (CSB1, CSB2, CSB3) ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย (domain II และ III) ของ *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด และใช้ *Cololabis saira* เป็น outgroup พบว่า *O. javanicus* และ *O. dancena* มีความใกล้เคียงกัน (BS = 100%) โดยมี *O. minutillus* เป็น sister group และในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *O. minutillus* จาก 11 แหล่งในประเทศไทยและจาก 1 แหล่งในประเทศกัมพูชา โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย (domain I) และใช้ *O. dancena* และ *O. celebensis* เป็น outgroup พบว่า *O. minutillus* จากทั้ง 12 แหล่ง สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 clade ที่สำคัญ ได้แก่ clade I (BS = 100%) ประกอบด้วย *O. minutillus* จากลุ่มน้ำโตนเลสาบ (สุรินทร์ สระแก้ว และประเทศกัมพูชา) และจากลุ่มน้ำภาคใต้ฝั่งตะวันออก (สงขลา และนครศรีธรรมราช) และ clade II (BS = 100%) ประกอบด้วย *O. minutillus* จากลุ่มน้ำเจ้าพระยา (สุพรรณบุรี นครสวรรค์ สระบุรี และพระนครศรีอยุธยา) จากลุ่มน้ำเพชรบุรี (เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์) และจากลุ่มน้ำโขงตอนบน (เชียงราย) ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแสดงแนวโน้มในการจัดกลุ่ม *O. minutillus* ที่สอดคล้องกับรูปแบบของโครโมโซมกลุ่ม primitive type (clade I) และกลุ่ม developed type (clade II)

**คำสำคัญ:** *Oryzias* บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

# Studies of the Mitochondrial Control Region in *Oryzias* and Phylogenetic Relationships of *O. minutillus* Using Nucleotide Sequences of the Partial Mitochondrial Control Region

Sinotai Smitthikunanon, Achariya Rangsiruji\* and Wichian Magtoon

---

## ABSTRACT

A study of the entire mitochondrial control region sequences from *Oryzias minutillus*, *O. mekongensis*, *O. javanicus*, *O. dancena* and *O. celebensis* revealed three important domains. Domain I consists of the termination-associated sequence (TAS) and extended termination-associated sequence (ETAS). Domain II contains three central conserved sequence blocks (CSB-F, CSB-E, CSB-D) and domain III comprises three conserved sequence blocks (CSB1, CSB2, CSB3). A phylogenetic study based on the mitochondrial control region (domains II and III) of these five *Oryzias* species using *Cololabis saira* as outgroup revealed a close relationship between *O. javanicus* and *O. dancena* (BS = 100%) with *O. minutillus* as a sister group. A study of phylogenetic relationships based on nucleotide sequences of the partial mitochondrial control region (domain I) of *O. minutillus* from 11 localities in Thailand and one locality from Cambodia using *O. dancena* and *O. celebensis* as outgroup revealed two important clades. Clade I (BS = 100%) comprises *O. minutillus* from Tonle Sap basin (Surin, Sakaeo and Cambodia) and from the eastern Peninsula basin (Songkhla and Nakhon Si Thammarat). Clade II (BS = 100%) consists of *O. minutillus* from Chao Phraya basin (Suphanburi, Nakorn Sawan, Saraburi and Ayutthaya), Phetchaburi basin (Phetchaburi and Prachuapkhirikhan) and upper Mekong basin (Chiang Rai). The results of phylogenetic study showed a tendency to classify *O. minutillus* according to their patterns of chromosomes as primitive type (clade I) and developed type (clade II).

**Keywords:** *Oryzias*, mitochondrial control region, phylogenetics

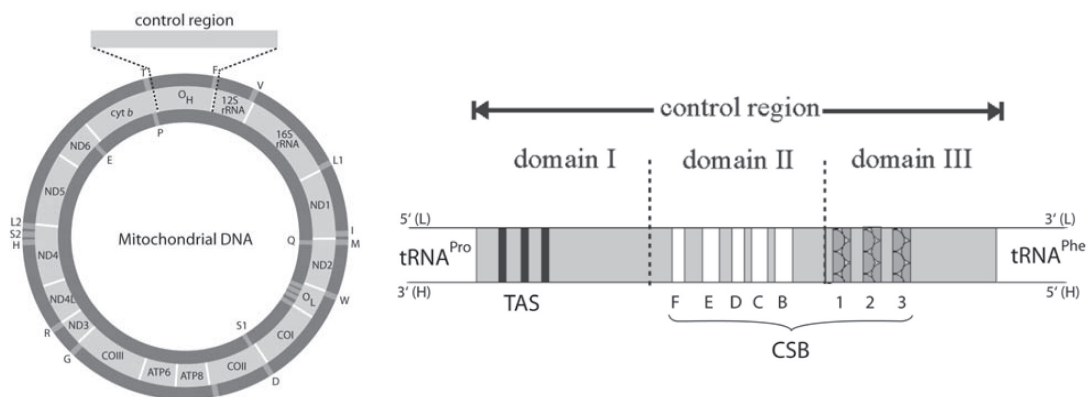
## บทนำ

ปลาสกุล *Oryzias* (Order Belontiiformes; Family Adrianichthyidae) หรือ ปลาข้าวสาร (ricefish) พบอาศัยตามแหล่งน้ำจืด ทั้งในนาข้าว ร่องน้ำ คลอง บ่อ ทะเลสาบ และในน้ำกร่อย [1] ปัจจุบันพบ 24 ชนิด แพร่กระจายตั้งแต่อินเดียไปจนถึงญี่ปุ่น และลงมาทางใต้ถึงหมู่เกาะอินโด-ออสเตรเลีย ทิมอร์ สุลาเวสี และลูซอน [2-4] โดยปลาในสกุลนี้ที่เป็นที่รู้จักกันดีคือ *Oryzias latipes* หรือในชื่อภาษาญี่ปุ่นว่า เมดากะ (medaka) ซึ่งนิยมใช้เป็นตัวอย่างทดลองในห้องปฏิบัติการ (model organism) เนื่องจากมีวัฏจักรชีวิตสั้น มีขนาดเล็ก ไข่มีขนาดใหญ่และใสทำให้สามารถศึกษาการเจริญเติบโตได้ดี และปลาชนิดนี้ยังเป็นปลากระดูกแข็งที่มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมไว้อย่างสมบูรณ์ (complete genome sequence) [5] ในประเทศไทยมีรายงานพบปลาสกุล *Oryzias* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *O. minutillus* [6], *O. mekongensis* [7], *O. javanicus* [8] และ *O. melastigma* [9] (หรือปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *O. dancena*) โดย *O. minutillus* พบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย *O. mekongensis* พบแพร่กระจายเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือบริเวณลุ่มน้ำโขง และลุ่มน้ำมูล ส่วน *O. javanicus* และ *O. dancena* พบอาศัยในน้ำกร่อยบริเวณป่าชายเลนทางภาคใต้ของประเทศไทย ในการศึกษาครั้งนี้รวมถึง *O. celebensis* ซึ่งพบบริเวณเกาะสุลาเวสี ประเทศอินโดนีเซียด้วย [10]

ปลา *Oryzias minutillus* หรือ Thai medaka เป็นปลาน้ำจืดขนาดเล็กมีความยาวมาตรฐานไม่เกิน 17 มิลลิเมตร และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จากรายงานการศึกษาจำนวนโครโมโซมที่เป็นดิพลอยด์พบความแปรผันจาก 28 ถึง 42 โครโมโซม และจากการศึกษาการไอโทปีของปลาชนิดนี้พบว่า มีรูปแบบโครโมโซมที่จัดอยู่ในกลุ่ม fused chromosome [11, 12] และกลุ่ม monoarmed chromosome ด้วย [13] นอกจากนี้ผลจากการศึกษาด้านอัลโลไซม์ (allozyme) [14] ยังแสดงถึงการแบ่ง *O. minutillus* เป็น 3 ประชากรกลุ่มย่อย (subpopulation) ตามระบบของแม่น้ำสายเจ้าพระยา แม่น้ำโขง และคาบสมุททางภาคใต้ด้วย

ในปัจจุบันการศึกษาด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต นอกจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการใช้ความรู้ด้านเซลล์พันธุศาสตร์แล้ว การศึกษาด้านนี้ยังได้ขยายขอบเขตไปถึงการใช้เทคนิคด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย โดย DNA ในไมโทคอนเดรียประกอบด้วยยีนทั้งหมด 37 ยีน มียีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน 13 ยีน ยีนสำหรับสร้าง rRNA 2 ยีน และยีนสำหรับสร้าง tRNA 22 ยีน นอกจากนี้ยังมีส่วนที่ไม่ถอดรหัส (non-coding region) ซึ่งเป็นบริเวณควบคุมที่เรียกว่า control region หรือ displacement loop (D-loop) พบอยู่ระหว่างยีน tRNA<sup>Pro</sup> และ tRNA<sup>Phe</sup> มีหน้าที่ในการควบคุมการจำลองตัวของ DNA ในไมโทคอนเดรีย บนสาย H-strand และควบคุมการถอดรหัสของทั้ง H-strand และ L-strand ซึ่งบริเวณควบคุมนี้มีอัตราการกลายสูงกว่าบริเวณยีนในไมโทคอนเดรียที่กำหนดการสร้างโปรตีนประมาณ 2-5 เท่า และมีขนาดแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (ตั้งแต่ 200-4100 คู่เบส) ขึ้นอยู่กับจำนวนซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์ (tandem duplication) [15] ตัวอย่างเช่น ในปลาบิเซีย (*Polypterus ornatipinnis*) มีขนาดของบริเวณควบคุม 1068 คู่เบส [16] และในปลาปักเป้าจุดดำ (*Tetraodon nigroviridis*) มีขนาดของบริเวณควบคุม 810 คู่เบส [17] จึงนิยมใช้บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมในระดับประชากร [18, 19] การแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ [20, 21] และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลา [22, 23]

บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียแบ่งเป็น 3 domain ที่สำคัญ (รูปที่ 1) ได้แก่ domain I ประกอบด้วย termination-associated sequence (TAS) และ extended termination-associated sequence (ETAS) domain II ประกอบด้วย central conserved sequence block (CSB-F, CSB-E, CSB-D, CSB-C, CSB-B) และ domain III ประกอบด้วย conserved sequence block (CSB1, CSB2, CSB3) [24] โดย TAS ซึ่งพบบริเวณปลาย 3' จะทำหน้าที่เป็นสัญญาณในการหยุดการสังเคราะห์ D-loop [25] ส่วน CSB ที่พบบริเวณปลาย 5' ทำหน้าที่เป็นสัญญาณในกระบวนการสังเคราะห์ RNA primer ที่จำเป็นในการเริ่มต้นการจำลองตัวของ H-strand [26]



**รูปที่ 1** DNA ในไมโทคอนเดรียและโครงสร้างของบริเวณควบคุมประกอบด้วย 3 domain ได้แก่ termination-associated sequence (TAS), central conserved sequence block (CSB-F, CSB-E, CSB-D, CSB-C, CSB-B) และ conserved sequence block (CSB1, CSB2, CSB3) (ดัดแปลงจาก Ruokonen [27])

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลา *Oryzias* 5 ชนิด ได้แก่ *O. minutillus*, *O. mekongensis*, *O. javanicus*, *O. dancena* และ *O. celebensis* และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *O. minutillus* ในแต่ละกลุ่มประชากร

## วิธีการทดลอง

### การเก็บรวบรวมตัวอย่าง และการตรวจสอบชนิด

เก็บตัวอย่างตามพื้นที่การแพร่กระจายของปลา *Oryzias* 5 ชนิด ได้แก่ *O. minutillus*, *O. mekongensis*, *O. javanicus*, *O. dancena* และ *O. celebensis* โดยเก็บตัวอย่างของ *O. minutillus* 12 แหล่ง แบ่งเป็นในประเทศไทย 11 แหล่ง และในประเทศกัมพูชา 1 แหล่ง (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 2) โดยตรวจสอบชนิดของปลาตาม Magtoon และ Termvidchakorn [28]

ตารางที่ 1 ชนิดของปลา *Oryzias* ที่ใช้ในการศึกษา และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

ชนิดของปลา	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
<i>Oryzias minutillus</i>	จังหวัดเชียงราย
<i>O. minutillus</i>	จังหวัดสุรินทร์
<i>O. minutillus</i>	จังหวัดสุพรรณบุรี
<i>O. minutillus</i>	จังหวัดนครสวรรค์
<i>O. minutillus</i>	จังหวัดสระบุรี
<i>O. minutillus</i>	จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
<i>O. minutillus</i>	จังหวัดสระแก้ว
<i>O. minutillus</i>	จังหวัดเพชรบุรี
<i>O. minutillus</i>	จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
<i>O. minutillus</i>	จังหวัดสงขลา
<i>O. minutillus</i>	จังหวัดนครศรีธรรมราช
<i>O. minutillus</i>	โตนเลสาบ ประเทศกัมพูชา
<i>O. mekongensis</i>	จังหวัดหนองคาย
<i>O. javanicus</i>	จังหวัดภูเก็ต
<i>O. dancena</i>	จังหวัดระนอง
<i>O. celebensis</i>	เกาะสุลาเวสี ประเทศอินโดนีเซีย

รูปที่ 2 แหล่งที่เก็บตัวอย่างของ *Oryzias minutillus*

## การศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

### การสกัด DNA

สกัด DNA ตัวอย่างปลา *Oryzias* จาก 16 แหล่งที่ศึกษา จำนวนแหล่งละ 2 ตัว โดยใช้ DNeasy® Tissue Kit (QIAGEN)

### การทำ PCR การโคลน และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *Oryzias* 5 ชนิด

เพิ่มปริมาณ DNA บริเวณควบคุมของ *Oryzias* 5 ชนิด ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ primer L15923 และ Cont-42Re รายละเอียดของ primer ดังตารางที่ 2 และรูปที่ 3 โดย PCR reaction มีปริมาตร 25  $\mu$ L ประกอบด้วยสารต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 50 ng ของ DNA template, 1X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 1  $\mu$ M ของ forward primer และ reverse primer และ 0.5 unit *Taq* DNA polymerase นำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง MiniCycler™ MJ Research โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังต่อไปนี้

Initial heating	94 °C	2 นาที	} 30 รอบ
Denaturation step	94 °C	1 นาที	
Annealing step	55.4 °C	1 นาที	
Extension step	72 °C	1 นาที	
Final extension	72 °C	10 นาที	

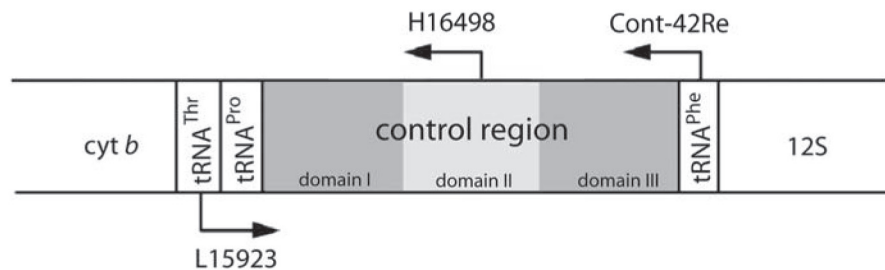
ตรวจสอบ PCR product ของ *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด โดยวิธี gel electrophoresis โดยเทียบกับ DNA มาตรฐาน ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN) นำไปเชื่อมต่อกับ pGEM®-T Easy Vector (Promega) แล้วนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue เลือกโคลนจาก *Oryzias* ชนิดละ 2 โคลน (1 โคลนจากปลา 1 ตัว) สกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างไปที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

### การทำ PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *O. minutillus*

เพิ่มปริมาณ DNA บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *O. minutillus* ทั้ง 12 แหล่ง ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ primer L15923 และ H16498 รายละเอียดของ primer ดังตารางที่ 2 และรูปที่ 3 โดยส่วนประกอบของ PCR reaction อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR เหมือนกับที่กล่าวมาข้างต้น ยกเว้น annealing step (50 °C 1 นาที) และ final extension (72 °C 2 นาที) ตรวจสอบ PCR product ของ *O. minutillus* ในแต่ละแหล่ง โดยวิธี gel electrophoresis โดยเทียบกับ DNA มาตรฐาน และทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN) เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างไปที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

## ตารางที่ 2 primer สำหรับการทำ PCR

primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer 5' → 3'	ทิศทาง	เอกสารอ้างอิง
L15923	5'-TTA AAG CAT CGG TCT TGT AA-3'	forward	[29]
H16498	5'-CCT GAA GTA GGA GGA ACC AGA TG-3'	reverse	[29]
Cont-42Re	5'-CTT AAC ATC TTC AGT GTT ATG CTT T-3'	reverse	[22]



รูปที่ 3 ตำแหน่งการจับของ primer บน DNA ของไมโทคอนเดรีย

## การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ และการสร้าง phylogenetic tree

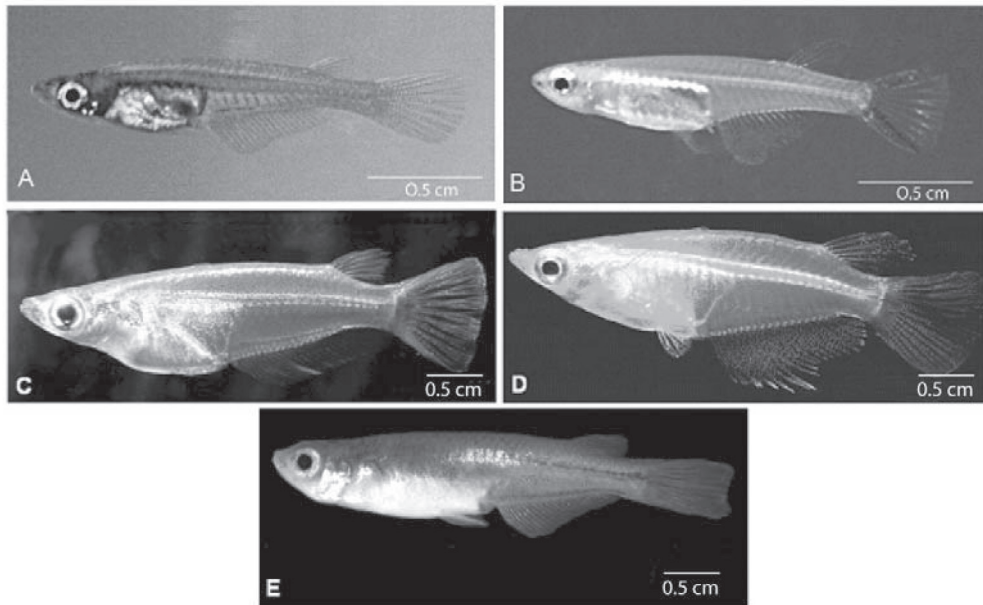
เทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลา *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด โดยในแต่ละชนิดใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเอกฉันท์ (consensus sequence) จากทั้ง 2 โคลน ด้วยโปรแกรม Clustal X [30] และวิเคราะห์โครงสร้างของบริเวณควบคุมทั้ง 3 domain โดยเทียบกับบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของปลาในกลุ่มปลาเก๋า (Siniperacine) [23] ในการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PAUP\* version 4.0b [31] โดยวิธี parsimony (branch-and-bound search) ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะใน domain II และ domain III ซึ่งมีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เข้ากันได้ อย่างชัดเจน (ไม่มี ambiguous site) โดยใช้ *Cololabis saira* (GenBank accession number AP002932) เป็น outgroup

สำหรับตัวอย่าง *O. minutillus* จาก 12 แหล่ง นำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย (domain I) มาเทียบเคียง และสร้าง phylogenetic tree โดยวิธีเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ใช้ *O. dancena* และ *O. celebensis* เป็น outgroup

## ผลการทดลอง

ตัวอย่างปลา *Oryzias* ที่ใช้ในการศึกษา

ผลจากการเก็บรวบรวมตัวอย่างปลา *Oryzias* 5 ชนิด จากแหล่งต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ แสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ตัวอย่างปลา *Oryzias* ที่ใช้ในการศึกษา *Oryzias minutillus* (A), *O. mekongensis* (B), *O. javanicus* (C), *O. dancena* (D) และ *O. celebensis* (E)

#### การเพิ่มจำนวนชิ้น DNA บริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียของ *Oryzias* 5 ชนิด และบางส่วนของบริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียของ *O. minutillus* ด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบ PCR product ของบริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียที่ได้จากคู่ primer L15923 และ Cont-42Re ของ *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด พบว่า *O. minutillus*, *O. javanicus* และ *O. dancena* มีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส ส่วน *O. celebensis* มีขนาดประมาณ 1000 คู่เบส และ *O. mekongensis* มีขนาดประมาณ 950 คู่เบส

สำหรับ PCR product ที่ได้จากบางส่วนของบริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียจากคู่ primer L15923 และ H16498 ของ *O. minutillus* ทั้ง 12 แหล่ง มีขนาดประมาณ 1000 คู่เบส

#### การศึกษาบริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียของ *Oryzias* 5 ชนิด

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของบริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียของปลา *O. minutillus*, *O. javanicus*, *O. dancena*, *O. celebensis* และ *O. mekongensis* พบว่ามีขนาด 1340, 1290, 1261, 886 และ 830 คู่เบส ตามลำดับ หลังจากการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด พบว่าบริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียมี 3 domain ดังต่อไปนี้ domain I พบบริเวณ TAS (TACAT), palindromic motif (ATGTA) และ ETAS domain II พบ CSB-F, CSB-E และ CSB-D และ domain III พบ CSB1, CSB2 และ CSB3 (รูปที่ 5)



<b>ETAS</b>	
<i>O. minutillus</i>	TTTTTTTATGCAAGTACATATATGTATATAGGGCATAAATTGAATGAGGC-ACATCCTC
<i>O. javanicus</i>	TTTTATGTCAATTACGACATATATGTATAATCCGCATACGTTCAATGAGGGAGCATCCGC
<i>O. dancena</i>	TTTTATGTCAATTTCGACATATATGTATAATCCACATACGTTCAATGAGGGGACATCCGC
<i>O. mekongensis</i>	-----TACTTATATGTAAATATCACCATTAATAGAWYTAA--ACCAT----
<i>O. celebensis</i>	-----TACTTGTATGTAAATATAACCATTAATTTAATTAA--ACCAT----
<i>O. minutillus</i>	GATTGCCTCATAAAGTTAATGGTTGACAAGACTTCAAG-GAAGTATTGCACACGGTTATG
<i>O. javanicus</i>	GATTGGCACAAAACTTAACGGTTTGCG-CACTTCATTAGAAGAGTTTCATTCAATCAA-
<i>O. dancena</i>	RATTGGCACAAAAAGTTAACGGTTTGCGAAACTTAATT-GAAGAGTTTCATTCAATTTAA-
<i>O. mekongensis</i>	TTTTGCCTAGTATAYAMGTCCATGCAT-CCAAA--TTATTTTTACCATA-----
<i>O. celebensis</i>	TAATGCCTAGTACACTTTAATTAATGATGTTAAA-TAAAAAATGAATAATAAACTATAAC
<i>O. minutillus</i>	CTCAAATGCACTCTCTTAATTAAGCATAGATCGGTGTAATGTTTTGTTTCCATGATCGA
<i>O. javanicus</i>	AT-AAATACACTCTCTTAGTCTGGCTTAGATCGTGAAATCCAA-----
<i>O. dancena</i>	CT-AAATACACTCTCTTAGTCTGGCAAAGATCGTTAGCTCCAA-----
<i>O. mekongensis</i>	---GGGTACATACACCTACGATTTGGTTTTAATCGGCACAAGTGTGCC-----
<i>O. celebensis</i>	TT-AAATAAATACATATGTATAAAACCCATAAAAAATAATGAAATGCTAAGAGATTTATAT
<i>O. minutillus</i>	TAGAAATCAATAGAAGAAAATCATTTCAGTCAAACAAGCACTTCCATAATAATCTGGCATA
<i>O. javanicus</i>	-----
<i>O. dancena</i>	-----
<i>O. mekongensis</i>	-----
<i>O. celebensis</i>	ATAACCTATAACTTGTTT-----
<i>O. minutillus</i>	CTAAAATGTAAGCATCCTTTCCACAAGTCTCCTCATCATTCAAAGTTGTACTTATTTGTA
<i>O. javanicus</i>	-----ATCCTTTCCACAAGTATCAACATTCACAAAATAACCACCCAAC-TA
<i>O. dancena</i>	-----ATCCTTTCCACAARAATCAACATCATTCAAATAAACACCCAAC-TA
<i>O. mekongensis</i>	-----
<i>O. celebensis</i>	-----
<i>O. minutillus</i>	TCCTTGTT--TTGAGCCCAAT-RACAGTAGATAAGACATAAGGTGAGATAAGTAC----A
<i>O. javanicus</i>	TCCTTGATAATCAGGGACAGA-AACTGTGGGGATTCCACAAGGTGAAATAT-TACTGGCA
<i>O. dancena</i>	TCCTTGATARTCAGGGACAAT-AACCGTGGGGATATCACAGGGTGAACAT-TACTGACA
<i>O. mekongensis</i>	-----ACAGCTAGTTTCAAGTCATCCACATCCTTCCTTCGATTGT--TACT---T
<i>O. celebensis</i>	-----AAACTAGTTTCAAGTCACCCACATCCTTCCTTCAATGAT--TACT---T
<b>CSB-F</b>	
<i>O. minutillus</i>	TATTCGGTC-GAGA-CACCGTCATCAGTT-ATAACTTAAGGTTAACTCCTTATTGAAAGG
<i>O. javanicus</i>	TATTCGCAAGAGCCCACC---ATCA-GTTGATAACTTAATGTTAACAGACCTTGTAAGG
<i>O. dancena</i>	TATTCGGTAAGAGCCCACC---ATCA-GTTGATAACTTAATGTTAACAGTCCTTGTAARG
<i>O. mekongensis</i>	AATGTAGTAAGAGACCACC---ATCA-GTTGATTTCTTAATGCTAACGTTTCTTG-ATGG
<i>O. celebensis</i>	AATGTAGTAAGAGACCACC---ATCA-GTTGATTACTTAATGCCAACGGTTCTTG-ATGG
<b>CSB-E</b>	
<i>O. minutillus</i>	TCAGGGTCCACATC-TTGGGGTGYGCACACCAGTGAAC
<i>O. javanicus</i>	TCAGGGACCCACATC-TTGGGGTTTCACACCAGTGAAC
<i>O. dancena</i>	TCAGG-ACCCACATC-TTGGGGTTGTACACCAGTGAAC
<i>O. mekongensis</i>	TCAGGGACAGAAATY-GTGGGGTTTCAC-CTAGTGAAC
<i>O. celebensis</i>	TCAGGGACAGTTATTTGTGGGGTTTCACAGT-GTGAAC
<b>CSB-D</b>	
<i>O. minutillus</i>	TATTACTGGCATCTGGTTCCCT
<i>O. javanicus</i>	TATTCTGGCATCTGGTTCCCT
<i>O. dancena</i>	TATTCTGGCATCTGGTTCCCT
<i>O. mekongensis</i>	TATTCTGGCATCTGGTTCCCT
<i>O. celebensis</i>	TATTCTGGCATCTGGTTCCCT

**รูปที่ 5** ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *O. minutillus*, *O. javanicus*, *O. dancena*, *O. mekongensis* และ *O. celebensis* ส่วนที่แรเงาประกอบด้วย extended termination-associated sequence (ETAS), central conserved sequence block (CSB-F, CSB-E, CSB-D) และ conserved sequence block (CSB1, CSB2, CSB3) บริเวณที่ขีดเส้นใต้แสดง termination-associated sequence (TAS; TACAT) และบริเวณที่ขีดเส้นคู่แสดง palindromic motif (ATGTA) ตัวอักษร R = A/G, Y = C/T, K = G/T และ W = A/T

*O. minutillus* AT TTCAGGTCCATTYRTCCATTAATACTCATTTCGTTCCCTTGAACCTGACATAAGTTAATG  
*O. javanicus* ACTTCAGGGCCATACGTTTATTAACCCTCATACGTTCAAGTAACCTGACATAAGTTATTG  
*O. dancena* AT TTCAGGTTCACAAATTTATTAATACTCATTTCATTCCTCTAACCTGACATAAGTTATTG  
*O. mekongensis* AT TTCAGGKCCATAWTRACCTTATTACCACATACGTTCCCTTGAAGCTTGCATAAGTTAATG  
*O. celebensis* AT TTCAGGGCCATACGTTTCATTATTACTCACACGTTCCCTTGAAGCTTGCATAAGTTAATG

*O. minutillus* GTGGAGTACATATTTCTGAAGTTACCCACCATGCCGAGCATTCTTTCCATAGGGCTATGGG  
*O. javanicus* GTGGAGTTCATACTCCGATGTTACCCACCATGCCGGGCGTTCTTTCCATCGGGCTACTGG  
*O. dancena* GTGGAGTTCATACTCCTC-GTTACCCACCATGCCGGGCGTTCTTTCCATCGGGCTACTGG  
*O. mekongensis* GTGGAGTACATAYTCCTC-GTTACCCACCATGCCGGGCGTTCTTTCTAATGGGCAACGGG  
*O. celebensis* GTGGAGTACATATGACGGGAGCACCCCATGCCGGGCGTTCTTTCTAATGGGCAACTGG

*O. minutillus* TTTTTTTTTTATCTAAA--TTTCACCTGGCATCTCACAGTGCAGCGCTAAGGCTAACTAA  
*O. javanicus* TTCTTTTTTTTTATTT-CCTTTCACCTGGCATTACAGAGTGAAGT-CTAAGGTTAACTAA  
*O. dancena* TTCTTTTTTTTTATTT-CCTTTCACCTGGCATTACAGAGTGAAGT-CTAAGGTTAACTAA  
*O. mekongensis* TTTTTTTTTTCKATTT-CCTTTCACCTTGCATTTACAGAGTGCACA-C-GGTATRAACARA  
*O. celebensis* TATTTTTTTTTTTTC--CTTTCACCTTGGCATTTCACAGTGCACA-CTAAGTTAGCTGA

*O. minutillus* CAAGGCTGTACATCTAGACAATCTGCCGCTAATAATATGGTGATAGTTAATGAAAGATAT  
*O. javanicus* CAAGGCTGTACATTTAGAGATCGGCCCGCAAAGAATATAGTGGAAATTA--TTTTATGATAT  
*O. dancena* CAAGGCTGTACATTTAGAGATCGGCCCGCAAATAATATAGTGGAGATA--TTGAAAGATAT  
*O. mekongensis* CAAGGKTGARCATTTAGAAATCGGCCCGCAAAGAATATGGTGAAWTG--TTATATGACTT  
*O. celebensis* CAAGGTTGAACATTTAGAAATCGGCCCGCAAATAATATGGTGAGTTA--TTGAAAGATAT

**CSB1**

*O. minutillus* TCGTTTTTTAAATTGCATAACTGATATCTAGAGCATAAAATCATAAAATGAAACTCTTAAA  
*O. javanicus* TCCTTTTTTTAATT-GCTTAACTGATATCAAGAGCATAAAATCAACAAGTGAAGTCTTAAAG  
*O. dancena* TCCTTTTTTTAATTGCAATAACTGATATCAAGAGCATAAAATCATCAAATGAAACTCTTAAA  
*O. mekongensis* TGATAGAAWCATA-GCATAACTGATATCATGAGCATAAARGAGTAGTTTGAATCTAGAAGA  
*O. celebensis* TAATAGATAACTT-ACATAACTGATATCAAGAGCATAAAATAACCAAATGAAACTACTAAA

**CSB2**

*O. minutillus* ATTTCTATGATTTTTTCCCCCGGCTTTTGCGGGTCAAACCCCCCTACCCCCCAACT  
*O. javanicus* AAATCCCTGTGATTTCCCCCGGCTTTTGCGGGTCAAACCCCCCTACCCCCCAACT  
*O. dancena* GTTTCTATGATTTATTTCCCCCGGCTTTTGCGGGTCAAACCCCCCTACCCCCCAACT  
*O. mekongensis* AYCTCTATGAAATTCYWCCCCGGCTTTTGCGGGTCAAACCCCCCTACCCCCCAACT  
*O. celebensis* GTTTCTATGATTTATTTCCCCCGGCTTTTGCGGGTCAAACCCCCCTACCCCCCAACT

**CSB3**

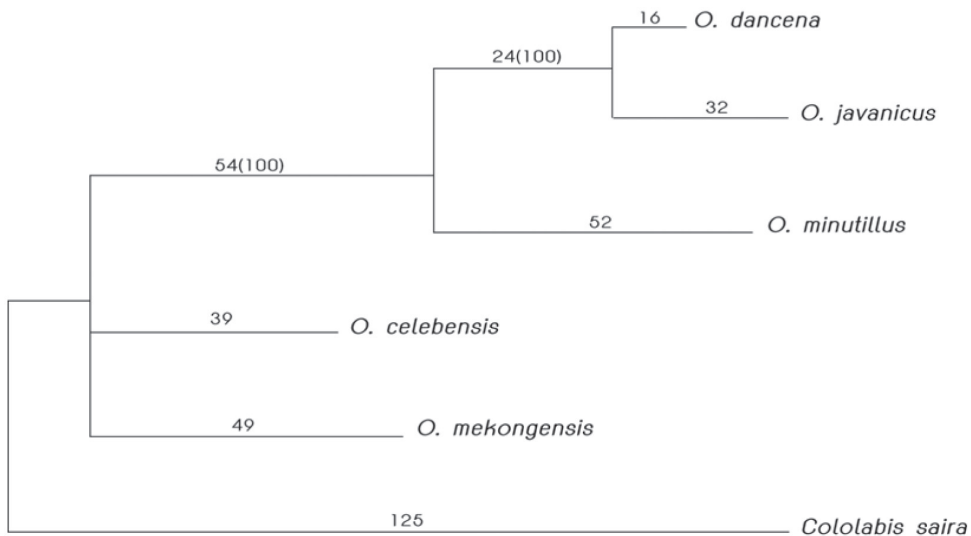
*O. minutillus* CGAGAGATGACTATGACTCTTGCAAACCCCCGGAAACAGGAAAATCCCTACTAGTATTT  
*O. javanicus* AGAGAGATTTCCAACACTTCTGCAAACCCCCGGAAACAGGAAAATCCCTACTAATATTT  
*O. dancena* AGAGAGATTTCTATCACTCTTGCAAACCCCCGGAAACAGGAAAATCCCTACTAATATTT  
*O. mekongensis* AGTGAGATATCTGTCACTCTTGCAAACCCCCGGAAACAGGAAAATCCCTACTTGTATTT  
*O. celebensis* AGTAAGATTTCTATCACTCTTGCAAACCCCCGGAAACAGGAAAATCCCTACTAATATTT

*O. minutillus* TTTGATGCCCCCTTTGTAAAATTTTTGCGT  
*O. javanicus* TTTTTCCCAATTTGTAAAATTTTTGCGT  
*O. dancena* TTTTTCCCAATTTGTAAAATTTTTGCGT  
*O. mekongensis* TTGTTTTCCCTTGTGTGTATTTACAT  
*O. celebensis* TTTTTTCGCTTGTGTGTATTTACAT

รูปที่ 5 (ต่อ)

### การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Oryzias* 5 ชนิด

จากการวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Clustal X และ PAUP\* ของนิวคลีโอไทด์บริเวณ domain II และ domain III พบว่ามีความยาวเท่ากับ 575 คู่เบส ซึ่งจำแนกเป็นประเภทของลักษณะ (character) ได้ดังนี้: constant character = 315 คู่เบส (54.78%), parsimony-uninformative character = 141 คู่เบส (24.52%), และ parsimony-informative character = 119 คู่เบส (20.70%) ผลจากการสร้าง phylogenetic tree ได้ strict consensus tree (รูปที่ 6) จาก 2 equally parsimonious tree ที่มีความยาว 391 step ซึ่งแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลของ *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด โดยพบว่า *O. dancena* และ *O. javanicus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (BS = 100%) และมี *O. minutillus* เป็น sister group

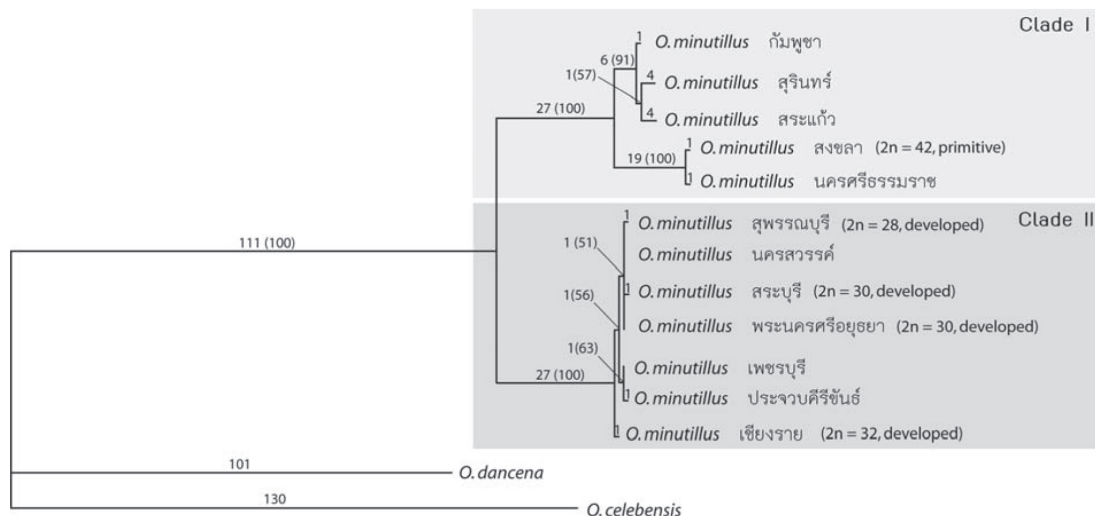


**รูปที่ 6** Strict consensus tree (ความยาว 391 step) ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย (domain II และ III) ของ *Oryzias dancena*, *O. javanicus*, *O. minutillus*, *O. celebensis* และ *O. mekongensis* โดยมี *Cololabis saira* เป็น outgroup โดยใช้วิธี parsimony (branch-and-bound search) ข้อมูลทางสถิติเกี่ยวกับ tree มีดังนี้: CI = 0.844, RI = 0.604 และ RC = 0.510 ตัวเลขที่อยู่บนกิ่งแสดงความยาวของกิ่ง (branch length) และตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บแสดง bootstrap value (%) จาก 1000 ซ้ำ

### การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *O. minutillus*

จากการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ใน domain I ของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียใน *O. minutillus* จาก 12 แหล่ง พบว่ามีความยาวเท่ากับ 879 คู่เบส ที่สามารถจัดเรียงเข้ากันได้ดี (ไม่มี ambiguous site) ซึ่งจำแนกเป็นประเภทของลักษณะได้ดังนี้: constant character = 504 คู่เบส (57.34%), parsimony-uninformative character = 273 คู่เบส (31.06%) และ parsimony-informative character = 102 คู่เบส (11.60%) ในการสร้าง phylogenetic tree ผลที่ได้คือ พบ 1 most parsimonious tree (รูปที่ 7)

ที่มีความยาว 440 step และแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลของ *O. minutillus* จาก 12 แหล่ง โดยพบ 2 clade ที่สำคัญคือ clade I (BS = 100%) ประกอบด้วย *O. minutillus* 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มแรก (BS = 91%) ประกอบด้วย *O. minutillus* จากจังหวัดสุรินทร์ สระแก้ว และประเทศกัมพูชา โดยที่ *O. minutillus* จากจังหวัดสุรินทร์ และสระแก้วมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่า (BS = 57%) และกลุ่มที่ 2 (BS = 100%) ประกอบด้วย *O. minutillus* จากจังหวัดสงขลา และนครศรีธรรมราช ใน clade II (BS = 100%) ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อยเช่นกัน คือ กลุ่มแรก (BS = 51%) ประกอบด้วย *O. minutillus* จากจังหวัดสุพรรณบุรี นครสวรรค์ สระบุรี และพระนครศรีอยุธยา และกลุ่มที่ 2 (BS = 63%) ประกอบด้วย *O. minutillus* จากจังหวัดเพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งมี *O. minutillus* จากจังหวัดเชียงราย เป็น sister group ของทั้ง 2 กลุ่ม



**รูปที่ 7** Single most parsimonious tree (ความยาว 440 step) ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน domain I ของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *O. minutillus* 12 แหล่ง โดยมี *O. dancena* และ *O. celebensis* เป็น outgroup โดยใช้วิธี parsimony (branch-and-bound search) ข้อมูลทางสถิติเกี่ยวกับ tree มีดังนี้: CI = 0.977, RI = 0.966 และ RC = 0.944 ตัวเลขที่อยู่บนกิ่ง แสดงความยาวของกิ่ง และตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บแสดง bootstrap value (%) จาก 1000 ซ้ำ

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียของ *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิด มีขนาดที่แตกต่างกันตั้งแต่ 830-1340 คู่เบส ซึ่งขนาดที่ต่างกันนี้เกิดจากการเพิ่ม (insertion) การขาดหายไป (deletion) หรือการเกิดจำนวนซ้ำ (tandem duplication) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากบริเวณนี้เป็นส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส (non-coding region) ส่งผลให้มีอัตราการกลายสูงกว่าบริเวณอื่นในไมโทคอนเดรีย การศึกษาครั้งนี้พบบริเวณ TAS และ ETAS ใน domain I ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับของปลาชนิดอื่น เช่น ปลาในกลุ่มปลาแก้ว [23] และกลุ่ม

ปลาการ์พ [32] เป็นต้น ในส่วนของ domain II ซึ่งในสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปจะพบบริเวณ CSB-F, CSB-E, CSB-D, CSB-C และ CSB-B [24] แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบเพียง CSB-F, CSB-E และ CSB-D และใน domain III พบบริเวณ CSB1, CSB2 และ CSB3 ซึ่งสอดคล้องกับที่พบในปลาหลายชนิด [23, 32, 33]

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลา *Oryzias* ทั้ง 5 ชนิดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ domain II และ III พบว่า *O. dancena* และ *O. javanicus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน โดยมี *O. minutillus* เป็น sister group ซึ่งสอดคล้องกับผลของคาร์โบไฮโปยีเนื่องจาก *O. dancena* และ *O. javanicus* มีโครโมโซมจัดอยู่ในกลุ่ม monoarmed [12] ส่วน *O. minutillus* มีโครโมโซมจัดอยู่ทั้งในกลุ่ม monoarmed และกลุ่ม fused [11] อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันของ *O. celebensis* และ *O. mekongensis* กับ *Oryzias* ชนิดอื่นๆ แต่ให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณยีน tyrosinase [35], cytochrome *b* และ 12S rDNA [36] ดังนั้น ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ domain II และ III จึงสามารถใช้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของ *Oryzias* ชนิดต่างๆ ได้ (inter-specific variation)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรีย (domain I) พบว่าเป็นบริเวณที่มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงกว่า domain อื่น จึงเหมาะสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตภายในชนิดเดียวกัน (intra-specific) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้สามารถแบ่ง *O. minutillus* จากทั้ง 12 แหล่งเป็น 2 clade ภายในแต่ละ clade แสดงการแพร่กระจายของ *O. minutillus* เป็นกลุ่มย่อยที่สอดคล้องกับระบบลุ่มน้ำของประเทศไทย [37] โดยใน clade I ประกอบด้วย *O. minutillus* จากจังหวัดสุรินทร์ สระแก้ว และประเทศกัมพูชา (ระบบลุ่มน้ำโตนเลสาบ) และ *O. minutillus* จากจังหวัดสงขลา และนครศรีธรรมราช (ระบบลุ่มน้ำภาคใต้ฝั่งตะวันออก) ส่วน clade II ประกอบด้วย *O. minutillus* จากจังหวัดสุพรรณบุรี นครสวรรค์ สระบุรี และพระนครศรีอยุธยา (ระบบลุ่มน้ำเจ้าพระยา) และ *O. minutillus* จากจังหวัดเพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ (ระบบลุ่มน้ำเพชรบุรี) โดยมี *O. minutillus* จากจังหวัดเชียงราย ซึ่งจัดอยู่ในลุ่มน้ำโขงตอนบนเป็น sister group

จากรายงานคาร์โบไฮโปยีของ *O. minutillus* ในประเทศไทย พบว่ามีจำนวนโครโมโซมที่เป็นดิพลอยด์ ( $2n$ ) ตั้งแต่ 28 ถึง 42 โดยแบ่งรูปแบบของโครโมโซมเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม primitive type ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม  $2n = 40-42$  มีโครโมโซมขนาดใหญ่ (LM) 0-2 คู่ และกลุ่ม developed type ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม  $2n = 28-34$  มีโครโมโซมขนาดใหญ่ 8-14 คู่ ในการศึกษาคาร์โบไฮโปยีของ *O. minutillus* จากจังหวัดสงขลา พบว่ามีจำนวนโครโมโซม  $2n = 42$  จัดอยู่ในกลุ่ม primitive type และ *O. minutillus* จากจังหวัดสุพรรณบุรี สระบุรี พระนครศรีอยุธยา และเชียงราย มีจำนวนโครโมโซม  $2n = 28, 30, 30$  และ 32 ตามลำดับ จัดอยู่ในกลุ่ม developed type [13] ซึ่งผลจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในครั้งนี้แสดงแนวโน้มในการจัดกลุ่ม *O. minutillus* ที่สอดคล้องกับรูปแบบของโครโมโซมกลุ่ม primitive type (clade I) และกลุ่ม developed type (clade II)

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนหนึ่งจากทุนอุดหนุนการทำปริญญาโทสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี พ.ศ. 2552 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

## เอกสารอ้างอิง

1. Berra, T. M. 2001. Freshwater Fish Distribution. California. Academic Press. p. 211-313.
2. Yamamoto, T. 1975. Systematics and Zoogeography: Medaka (Killifish): Biology and Strains. Tokyo. Keigaku Publishing Company. p. 17-29.
3. Nelson, J. S. 2006. Fishes of the World. 4<sup>th</sup> Edition. New Jersey. John Wiley and Sons, Inc. p. 276.
4. Parenti, L. R. 2008. A Phylogenetic Analysis and Taxonomic Revision of Ricefishes, *Oryzias* and Relatives (Beloniformes, Adrianichthyidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 154: 494-610.
5. Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Shimizu, N., Hashimoto, S., Yang, J., Lee, Y.-J., Matsushima, K., Sugano, S., Sakaizumi, M., Narita, T., Ohishi, K., Haga, S., Ohta, F., Nomoto, H., Nogata, K., Morishita, T., Endo, T., Shin-I, T., Takeda, H., Morishita, S., and Kohara, Y. 2007. The Medaka Draft Genome and Insights into Vertebrate Genome Evolution. *Nature* 447: 714-719.
6. Smith, H. M. 1945. The Fresh-Water Fishes of Siam, or Thailand. Washington. Bulletin of United States National Museum. p. 424.
7. Uwa, H., and Magtoon, W. 1986. Description and Karyotype of a New Ricefishes, *Oryzias mekongensis* from Thailand. *Copeia* 2: 473-478.
8. Magtoon, W. 1986. Distribution and Phyletic Relationships of *Oryzias* Fishes in Thailand. In: Uyeno, T., Arai, R., Taniuchi, T. and Matsuura, K., Editors. Indo-Pacific Fish Biology: Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fishes. Tokyo. The Ichthyological Society of Japan. p. 859-866.
9. วิเชียร มากตุ่น และ ฮิโรชิ อุวะ. 2531. รายงานครั้งแรกเกี่ยวกับปลา *Oryzias melastigma* ในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 26. 3-5 กุมภาพันธ์ 2531. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ หน้า 229-233.
10. Uwa, H., and Parenti, L. R. 1988. Morphometric and Meristic Variation in Ricefish, Genus *Oryzias*: a Comparison with Cytogenetic Data. *Japanese Journal of Ichthyology* 35(2): 159-166.

11. Magtoon, W., and Uwa, H. 1985. Karyotype Evolution and Relationship of a Small Ricefish, *Oryzias minutillus*, from Thailand. *Proceedings of the Japan Academy* 61(4): 157-160.
12. Uwa, H. 1986. Karyotype Evolution and Geographical Distribution in the Ricefish, Genus *Oryzias* (Oryziidae). In: Uyeno, T., Arai, R., Taniuchi, T. and Matsuura, K., Editors. Indo-Pacific Fish Biology: Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fishes. Tokyo. The Ichthyological Society of Japan. p. 867-876.
13. Magtoon, W., Nadee, N., Higashitani, T., Takata, K., and Uwa, H. 1992. Karyotype Evolution and Geographical Distribution of the Thai-Medaka, *Oryzias minutillus*, in Thailand. *Journal of Fish Biology* 41: 489-497.
14. Takata, K., Hoshino, M., Magtoon, W., Nadee, N., and Uwa, H. 1993. Genetic Differentiation of *Oryzias minutillus* in Thailand. *Japanese Journal of Ichthyology* 39: 319-327.
15. Meyer, A. 1994. DNA Technology and Phylogeny of Fish. In: Beaumont, A. R., Editor. Genetics and Evolution of Aquatic Organisms. London. Chapman & Hall. p. 219-249.
16. Noack, K., Zardoya, R., and Meyer, A. 1996. The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Bichir (*Polypterus ornatipinnis*), a Basal Ray-Finned Fish: Ancient Establishment of the Consensus Vertebrate Gene Order. *Genetics* 144(3): 1165-1180.
17. Yamanoue, Y., Miya, M., Inoue, J. G., Matsuura, K., and Nishida, M. 2006. The Mitochondrial Genome of Spotted Green Pufferfish *Tetraodon nigroviridis* (Teleostei: Tetraodontiformes) and Divergence Time Estimation among Model Organisms in Fishes. *Genes and Genetic Systems* 81: 29-39.
18. Ishikawa, S., Tsukamoto, K., and Nishida, M. 2004. Genetic Evidence for Multiple Geographic Populations of the Giant Mottled Eel *Anguilla marmorata* in the Pacific and Indian Oceans. *Ichthyological Research* 51(4): 343-353.
19. Cosmesaña, A. S., Martínez-Areal, M. T., and Sanjuan, A. 2008. Genetic Variation in the Mitochondrial DNA Control Region among Horse Mackerel (*Trachurus trachurus*) from the Atlantic and Mediterranean Areas. *Fisheries Research* 89: 122-131.
20. Sakai, T., Mihara, M., Shitara, H., Yonekawa, H., Hosoya, K., and Miyazaki, J. 2003. Phylogenetic Relationships and Intraspecific Variations of Loaches of the Genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes). *Zoological Science* 20(4): 501-514.
21. Thai, B. T., Pham, T. A., and Austin, C. M. 2006. Genetic Diversity of Common Carp in Vietnam Using Direct Sequencing and SSCP Analysis of the Mitochondrial DNA Control Region. *Aquaculture* 258: 228-240.
22. Kang, T. W., Lee, E. H., Kim, M. S., Paik, S. G., Kim, S., and Kim, C. B. 2005. Molecular Phylogeny and Geography of Korean Medaka Fish (*Oryzias latipes*). *Molecules and Cells* 20(1): 151-156.

23. Zhao, J.-L., Wang, W.-W., Li, S.-F. and Cai, W.-Q. 2006. Structure of the Mitochondrial DNA Control Region of the Sinipercline Fishes and Their Phylogenetic Relationship. *Acta Genetica Sinica* 33(9): 793-799.
24. Brown, G. G., Gadaleta, G., Pepe, G., Saccone, C. and Sbisà, E. 1986. Structural Conservation and Variation in the D-Loop-Containing Region of Vertebrate Mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology* 192: 503-511.
25. Doda, J. N., Wright, C. T., and Clayton, D. A. 1981. Elongation of Displacement-Loop Strands in Human and Mouse Mitochondrial DNA Is Arrested Near Specific Template Sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(10): 6116-6120.
26. Bennet, J. L., and Clayton, D. A. 1990. Efficient Site-Specific Cleavage by RNase MRP Requires Interaction with Two Evolutionarily Conserved Mitochondrial RNA Sequences. *Molecular and Cellular Biology* 10(5): 2191-2201.
27. Ruokonen, M. 2001 Phylogeography and Conservation Genetics of the Lesser White Fronted Goose (*Anser erythropus*). Department of Biology, University of Oulu, Finland. p. 18.
28. Magtoon, W. and Termvidchakorn, A. 2009. A Revised Taxonomic Account of Ricefish *Oryzias* (Belontiiformes; Adrianichthyidae), in Thailand, Indonesia and Japan. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University* 9: 35-68.
29. Iguchi, K., and Nishida, M. 2000. Genetic Biogeography among Insular Populations of the Amphidromous Fish *Plecoglossus altivelis* Assessed from Mitochondrial DNA Analysis. *Conservation Genetics* 1: 147-156.
30. Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1998. Multiple Sequence Alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences* 23: 403-405.
31. Swofford, D. L. 1998. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates. Sunderland, MA.
32. Guo, X. H., Liu, S. J., and Liu, Y. 2003. Comparative Analysis of the Mitochondrial DNA Control Region in Cyprinids with Different Ploidy Level. *Aquaculture* 224: 25-38.
33. Broughton, R. E., and Dowling, T. E. 1994. Length Variation in Mitochondrial DNA of the Minnow *Cyprinella spiloptera*. *Genetics* 138(1): 179-190.
34. Sbisà, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G., and Saccone, C. 1997. Mammalian Mitochondrial D-Loop Region Structural Analysis: Identification of New Conserved Sequences and Their Functional and Evolutionary Implications. *Gene* 205(1-2): 125-140.



35. Takehana, Y., Naruse, K., and Sakaizumi, M. 2005. Molecular Phylogeny of the Medaka Fishes Genus *Oryzias* (Belontiiformes: Adrianichthyidae) Based on Nuclear and Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 417-428.
36. Naruse, K. 1996. Classification and Phylogeny of Fishes of Genus *Oryzias* and Its Relatives. *The Fish Biology Journal Medaka* 8: 1-9.
37. ราชบัณฑิตยสถาน. 2545. ลุ่มน้ำและแหล่งน้ำ: อักษรานุกรมภูมิศาสตร์ไทย เล่ม 1 ฉบับราชบัณฑิตยสถาน. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ ราชบัณฑิตยสถาน. หน้า 105-133.

ได้รับบทความวันที่ 17 สิงหาคม 2552

ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 31 สิงหาคม 2552

