สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
วิทยานิพนธ์ งานวิจัย
M2x 128357

พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลากระทิง (Family Mastacembelidae) ในจังหวัดมหาสารคาม

นายปริญญาศักดิ์ เจียระแม

สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
วันรับ.....
เลขทะเบียน.....
เลขเรียกหนังสือ.....
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
พ.ศ. 2563

สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ใบอนุมัติวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

เรื่อง : พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลากระทิง (Family Mastacembelidae) ในจังหวัดมหาสารคาม

ผู้วิจัย : นายปริญญาศักดิ์ เจียระแม

ได้รับอนุมัติเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มานิตย์ อัญญะโพธิ์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล วรคำ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ ประมวล) ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี อินสำราญ) กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์) กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พันธิวา แก้วมาตย์) กรรมการ

Title : Cytogenetics of Fish (Family Mastacembelidae) in Mahasarakham Province.

Author : Mr. Parinyasak Jiaramae

Degree : Master Degree (Biology Education)
RajabhatMahaSarakham University

Advisors : Assistant Professor Dr. Pornarong Siripiyasing
Assistant Professor Dr. Puntivar Keawmad

Year : 2020

ABSTRACT

Cytogeneticsstudy of 2 specics of fish (Family Mastacembelidae) in Mahasarakham Province, such as *Macrognathus siamensis* and *Mastacembelus armatus* were studied. 30 specimens of east species in standard length of 15.2 to 20.0 cm and 24.0 to 35.0 cm respectively, were investigated. Chromosome was prepared from kidney and gill tissues by conventional staining and NOR banding techniques. Method of chromosome preparation was modified form Chen and Ebeling (1968) and Nanda *et al*. (1995).The results showed that the diploid chromosome number of *Macrognathus siamensis* was 2n=48. The chromosome types were of 4 pairs of metacentric, 1 pair of subtelocentric and 19 pairs of telocentric chromosomes. The karyotype formula was 2n (48) = $L^{m}_{8} + L^{st}_{2} + M^{t}_{38}$. The diploid chromosome number of *Mastacembelus armatus* was 2n=48. The chromosome types were of 6 pairs of metacentric, 1 pair of submetacentric 2 pairs of subtelocentric and 15 pairs of telocentric chromosomes. The karyotype formula was 2n (48) = $L^{m}_{12} + L^{sm}_{2} + M^{st}_{4} + M^{t}_{30}$.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Keywords: Chromosome, Karyotype, and Cytogenetics

_____ Major Advisor

ชื่อเรื่อง : พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลากระทิง (Family Mastacembelidae) ในจังหวัดมหาสารคาม

ผู้วิจัย : นายปริญญาศักดิ์ เจียระแม

ปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยาศึกษา)
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พันธิวา แก้วมาตย์

ปีการศึกษา : 2563

บทคัดย่อ

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลากระทิง ในจังหวัดมหาสารคาม 2 ชนิด ได้แก่ ปลาหลดจุด (*Macrognathus siamensis*) ปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*) ชนิดละ 30 ตัว ที่นำมาใช้ในการศึกษามีความยาวมาตรฐาน 15.2 – 20.0 ซม. และ 24.0 – 35.0 ซม. โดยเตรียมโครโมโซมวิธีตรงจากเนื้อเยื่อไตและเหงือก ย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแบบนอร์ (NOR banding) การเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาดัดแปลงจากวิธีของ Chen and Ebeling (1968) และ Nanda *et al*. (1995) ผลการศึกษาพบว่า ปลาหลดจุด มีโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n=48 ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 4 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก1 คู่ และแบบทีโลเซนตริก 19 คู่ สูตรคาริโอไทป์คือ 2n (48) = $L^{m}_{8} + L^{st}_{2} + M^{t}_{38}$ ปลากระทิง มีโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n=48 ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 6 คู่ แบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 2 คู่ และแบบทีโลเซนตริก 15 คู่ สูตรคาริโอไทป์ คือ 2n (48) = $L^{m}_{12} + L^{sm}_{2} + M^{st}_{4} + M^{t}_{30}$

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

คำสำคัญ : โครโมโซม, คาริโอไทป์, และอิดิโอแกรม

_____ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พันธิวา แก้วมาตย์ กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ ประมวล ประธานกรรมการสอบ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี อินสำราญ กรรมการสอบ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พันธิวา แก้วมาตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำจนงานครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ที่ให้การสนับสนุนทุนในการศึกษาต่อในครั้งนี้ ตลอดจนศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำงานวิจัย และบิดา มารดา ครู อาจารย์ ญาติพี่น้อง และเพื่อน ที่สนับสนุนให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา

นายปริญญาศักดิ์ เจียระแม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญ

หัวเรื่อง **หน้า**

บทคัดย่อ ..... ค
ABSTRACT ..... ง
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ง
สารบัญภาพ ..... จ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย 3
1.3 ขอบเขตการวิจัย 3
1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ 3
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ 4
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม 5
2.1 ลักษณะทั่วไปของปลาวงศ์ปลากระทิง 5
2.2 การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ 7
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 18
3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก 18
3.2 การศึกษาโครโมโซม 20
3.3 การตรวจสอบโครโมโซม จัดทำคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม 21
บทที่ 4 ผลการวิจัย 23
4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกปลาบางชนิดในวงศ์ Mastacembelidae 23
4.2 ผลการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาหลดและปลากระทิง โดยวิธีการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแบบนอร์ 28
4.3 ผลการศึกษาคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานของปลาหลดจุดและปลากระทิง 32

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

หัวเรื่อง **หน้า**

บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 41
5.1 สรุปผล 41
5.2 อภิปรายผล 43
5.3 ข้อเสนอแนะ 45
บรรณานุกรม 46
ภาคผนวก 49
ภาคผนวก ก การเตรียมอุปกรณ์และสารเคมี 50
ภาคผนวก ข ภาพเมทาเฟสโครโมโซมของ ปลาหลดและปลากระทิง ชนิดละ 10 เซลล์ 52
ประวัติผู้วิจัย 56

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 ความถี่ในการกระจายตัวของโครโมโซมระยะเมตาเฟสของปลาหลดจุด 28

4.2 ความถี่ในการกระจายตัวของโครโมโซมระยะเมตาเฟสของปลากระทิง 31

4.3 ค่าเฉลี่ยความยาวแขนของโครโมโซมข้างยาว (Ll) แขนของโครโมโซมข้างสั้น (Ls) ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (Lt) ค่า centromeric index (CI) และค่า Relative Length (RL) ของปลาหลด (*Macrognathus siamensis*, 2n = 48) ทั้งหมด 10 เซลล์..... 33

4.4 ค่าเฉลี่ยความยาวแขนของโครโมโซมข้างยาว (Ll) แขนของโครโมโซมข้างสั้น (Ls) ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (Lt) ค่า centromeric index (CI) และค่า relative length (RL) ของปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*, 2n = 48) ทั้งหมด 10 เซลล์ 37

5.1 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของปลาหลดจุดและปลากระทิง 41

5.2 จำนวน ชนิด และขนาดโครโมโซมของปลาวงศ์ปลากระทิง..... 43

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะภายนอกของปลาหลดจุด 5
2.2 ลักษณะภายนอกของปลากระทิง 6
3.1 การวัดสัดส่วนภายนอกของปลาวงศ์กระทิง 19
4.1 ภาพปลาหลด (*Macrognathus siamensis*) 25
4.2 ภาพปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*) 26
4.3 ภาพที่ 1 – 10 เซลล์ในระยะเมตาเฟสโครโมโซมของปลาหลด ด้วยวิธีการ
ย้อมสีแบบธรรมดาและแบบนอร์ที่มีการกระจายตัวดี จำนวน 10 เซลล์ 29
4.4 ภาพที่ 1 – 10 เซลล์ในระยะเมตาเฟสโครโมโซมของปลากระทิง ด้วยวิธีการย้อมสี
แบบธรรมดาและแบบนอร์ที่มีการกระจายตัวดี จำนวน 10 เซลล์ 31
4.5 เซลล์ระยะเมทาเฟส และคาริโอไทป์ของปลาหลดจุด (*Macrognathus siamensis*)
2n = 48 โดยวิธีการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา 35
4.6 อิดิโอแกรมของปลาหลดจุด (*Macrognathus siamensis*) 36
4.7 เซลล์ระยะเมทาเฟส และคาริโอไทป์ของปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*)
2n = 48 โดยวิธีการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา 39
4.8 อิดิโอแกรมของปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*) 40

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

แม่น้ำชี เป็นแม่น้ำที่ยาวที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ความยาวประมาณ 765 กิโลเมตร มีต้นกำเนิดจากภูเขาพญาฝ่อ ในเขตอำเภอหนองบัวแดง จังหวัดชัยภูมิ ไหลผ่านพื้นที่จังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม ร้อยเอ็ด ยโสธร และไหลลงสู่แม่น้ำมูล ที่อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี วิถีชีวิตของประชาชนที่อาศัยอยู่ริมฝั่ง ได้ใช้ประโยชน์จากแหล่งน้ำสายนี้นานัปการ เช่น การทำประมงพื้นบ้าน การเป็นแหล่งน้ำดิบผลิตน้ำประปา การเพาะปลูกพืชผลการเกษตร เลี้ยงสัตว์ รวมไปถึงเพื่อการท่องเที่ยว สำหรับประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปลาถือว่าเป็นวัตถุดิบชั้นเลิศในการประกอบอาหารสามารถแปรรูปได้หลายอย่าง เช่นการนำมาหมักเป็นปลาร้า การทำปลาแดดเดียว ทำปลาส้ม ปลาจึงมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจอีกด้วย ในชุมชนของคนลุ่มแม่น้ำการหาปลาไม่เพียงแต่เป็นการหากินไปวันๆเท่านั้นการจับปลาหรือหาปลายังแสดงให้เห็นถึงการพึ่งพาอาศัยธรรมชาติและการเรียนรู้พฤติกรรมของปลาอีกด้วย วิธีการหาปลานั้นมีอยู่หลายวิธี เช่น การทอดแห ลอบ ไซ เบ็ด วางตาข่ายเป็นต้น แต่ละวิธีจะใช้แตกต่างกันตามพื้นที่และชนิดของปลาเช่นการทอดแหในแม่น้ำหรือหนองบึง การดัก ลอบและไซในที่น้ำไหลเล็กน้อยหรือน้ำคลองที่ขนาดไม่ใหญ่ ในลุ่มแม่น้ำชีการหาปลาก็เหมือนกับอาชีพหลักของชาวบ้านเช่นกันโดยปลาที่ได้นั้นอาจจะประกอบอาหารในครัวเรือน หรือถ้าได้ปลาปริมาณมาก อาจจะนำไปขาย หรือทำปลาร้า ปลาส้ม ปลาแห้ง ปลาย่าง พันธุ์ปลาในลุ่มน้ำชีมีอยู่หลากหลาย เช่น ปลาขาว ปลากด ปลาแขยง ปลาเนื้ออ่อน ส่วนปลาที่เป็นปลาเลี้ยงเชิงพาณิชย์ที่เลี้ยงในลำน้ำชีเช่น ปลานิล ปลาดุก ปัจจุบันจำนวนปลาในธรรมชาติได้ลดจำนวนลงอย่างเห็นได้ชัดซึ่งปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้เกิดปัญหานั้นส่วนมากก็เกิดมาจากมนุษย์ เช่น การสร้างเขื่อนหรือฝายกั้นทางน้ำ การใช้ยาฆ่าแมลงในการเกษตรกรรมทำให้เกิดมลพิษ การเกิดขึ้นของโรงงานอุตสาหกรรมการเปลี่ยนวิธีการจับปลาเพื่อให้ได้ปลาในปริมาณมากและนำไปจำหน่ายในระบบเงินตรา จากการศึกษาโครงสร้างและการแพร่กระจายของประชากรปลาในแม่น้ำชี ได้ทำการสุ่มตัวอย่างด้วยอวนลากทับตลิ่ง กระแสไฟฟ้า และตาข่ายขนาดต่าง ๆ (20, 30, 40, 55, 70 และ 100 มิลลิเมตร)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ผลจากการศึกษาพบพันธุ์ปลาในแม่น้ำชีรวม 24 วงศ์ 88 ชนิด พบวงศ์ปลาตะเพียนมากที่สุด 42 ชนิด (จารึก นาชัยเพิ่ม, 2549)

การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมโดยเฉพาะการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์นั้นเป็นการศึกษาจำนวน รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของโครโมโซมหรือคาริโอไทป์ ซึ่งข้อมูลการศึกษาทางด้านพันธุกรรมนี้ สามารถนำไปใช้ในการจำแนกชนิดของปลาได้ งานทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์มีความสำคัญ ในแง่ของนักพัฒนาพันธุ์พืชและสัตว์ และศึกษาถึงความผิดปกติของสิ่งมีชีวิตได้ ตัวอย่างที่สำคัญของงานที่ขาดความรู้ทางพันธุศาสตร์เซลล์ไม่ได้เลย คือการศึกษาตำแหน่งจากยีนบนโครโมโซม ซึ่งความรู้นี้จะเป็นพื้นฐานการปรับปรุงพันธุกรรมโดยเฉพาะด้านที่กำลังอยู่ในความสนใจมากในปัจจุบันคืองานของพันธุวิศวกรรม สำหรับประโยชน์ในการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ในปลานั้นมีประโยชน์ในแง่ของการจัดจำแนก เพราะปลาบางชนิดมีลักษณะคล้ายกันแต่เมื่อศึกษาคาริโอไทป์แล้วมีความแตกต่างกัน ทำให้ทราบว่าไม่ใช่ปลาชนิดเดียวกัน การนับจำนวนโครโมโซมเพียงอย่างเดียวก็อาจมีข้อผิดพลาดได้เพราะปลาชนิดเดียวกันที่อาศัยในสภาพแวดล้อม ที่แตกต่างกันทางภูมิศาสตร์ อาจมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน (สุภาพร สุกสีเหลือง, 2542)

ปลาหลด และปลากระทิง เป็นชื่อปลาน้ำจืดในสกุลปลากระดูกแข็งจำพวกหนึ่ง ซึ่งจัดอยู่ในอันดับปลาไหลนา เป็นปลาที่คนไทยรู้จักกันมานาน สามารถจับได้ทั่วไปในแม่น้ำ อ่างเก็บน้ำ บึง หรือตามทุ่งนา ซึ่งเป็นปลาที่นิยมนำมาประกอบอาหารในรูปปลาสด ปลาตากแห้ง หรือทำปลาเค็ม เนื่องจากเนื้อลำตัวด้านข้างจะให้เนื้อแน่น ไม่มีก้าง เนื้อนุ่ม มีรสมัน โดยในช่วงฤดูฝนถึงปลายฤดูหนาวจะเป็นช่วงที่จับปลาหลดได้มาก บางพื้นที่มีชาวบ้านนำมาขายตามตลาดสด ตลาดหมู่บ้าน ซึ่งมีราคาแพงพอสมควร (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดร้อยเอ็ด)

เนื่องจากปลาวงศ์ปลากระทิง (Family Mastacembelidae) ได้ลดปริมาณลงเป็นอย่างมาก และมีผู้ทำการศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของปลาวงศ์ปลากระทิง (Family Mastacembelidae) ค่อนข้างน้อย ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาปลาที่อยู่ในวงศ์ วงศ์ปลากระทิง (Family Mastacembelidae) คือ ปลาหลด ปลากระทิง ในจังหวัดมหาสารคาม เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับโครโมโซมและเปรียบเทียบนำไปใช้ร่วมกับการศึกษาอนุกรมวิธาน ด้วยการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (Convertional Stain) จะได้ภาพที่ติดสีเข้มตลอดทั้งแท่งทำให้สามารถบอกจำนวนและชนิดของโครโมโซมประจำชนิด (Species) นั้นได้ และศึกษาการย้อมสีแบบนอร์ (NOR banding) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำให้ส่วนของ Nucleolar Organizer Regions (NORs) ติดสีเข้มโดยการใช้สารละลาย

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ซิลเวอร์ไนเตรต (Silver Nitrate) เพื่อตรวจสอบโครโมโซม เครื่องหมายและเอกลักษณ์ของปลาวงศ์ปลากระทิง ในจังหวัดมหาสารคาม และใช้รูปแบบของคาริโอไทป์ที่ได้ (Karyotype) มาจัดอิดิโอแกรมมาตรฐาน (Idiogram) และเปรียบเทียบนำไปใช้ร่วมกับการศึกษาอนุกรมวิธาน นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านการศึกษาพันธุศาสตร์ทางด้านอื่นๆ ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาชนิดของปลาวงศ์ปลากระทิงที่พบ ในจังหวัดมหาสารคาม

1.2.2 เพื่อศึกษาจำนวน รูปร่างของโครโมโซม การจัดคาริโอไทป์ (Karyotype) และสร้างอิดิโอแกรม (Idiogram) มาตรฐานของปลาวงศ์ปลากระทิงบางชนิด

1.2.3 เพื่อศึกษาการย้อมสีโครโมโซม แบบมาตรฐาน แถบสีแบบนอร์ (NOR Banding)

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือ ปลาวงศ์ปลากระทิงที่พบ ในจังหวัดมหาสาคาม

1.3.2 เตรียมโครโมโซมด้วยการเตรียมโดยตรง (Direct Chromosome Preparation) จากเหงือกและไต

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1.3.3 ย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (Conventional Staining) ศึกษาเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบมาตรฐาน และแบบนอร์ (NOR - banding)

1.3.4 ศึกษาจำนวน รูปร่าง ของโครโมโซม การจัดคาริโอไทป์ (Karyotype) และสร้างอิดิโอแกรม (Idiogram)

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ

“โครโมโซม” หมายถึง ที่อยู่ของสารพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอ (DNA) รวมถึงหน่วยพันธุกรรมหรือยีน (Gene) ก็อยู่ใน ดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมและถ่ายทอดข้อมูล เกี่ยวกับ ลักษณะทางพันธุกรรมต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต เช่น ลักษณะดวงตา เพศ และผิว เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์มองโครโมโซม

(Chromosome) จะเห็นมีลักษณะคล้าย ๆ เส้นด้ายบาง ๆ เรียกว่า โครมาติน (Chromatin) หรือเส้นใยโครมาติน (Chromatin Fiber) ขดตัวอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ เมื่อมีการแบ่งเซลล์จะมีการแบ่งโครโมโซม เกิดขึ้น ซึ่งเมื่อเซลล์เริ่มมีการแบ่งตัว เส้นใยโครมาติน จะหดและขดตัวจนมีลักษณะเป็นแท่ง เรียกว่า โครโมโซม แต่ละโครโมโซมประกอบด้วยแขนสองข้างที่เรียกว่า โครมาทิด (Chromatid) ซึ่งแขนทั้งสองข้างจะมีจุดเชื่อมกัน เรียกว่า เซนโทรเมียร์ (Centromere)

“คาริโอไทป์” หมายถึง การจัดลำดับโครโมโซมตามขนาดและรูปร่างโดยอาศัยตำแหน่งต่างๆ บนโครโมโซมเพื่อช่วย ศึกษารายละเอียดของโครโมโซมแต่ละแท่ง นักวิทยาศาสตร์สามารถแยกประเภทคาริโอไทป์ได้หลายวิธี แต่ที่ทำ การศึกษาครั้งนี้คือ การจำแนกประเภทคาริโอไทป์ โดยดูจากขนาดของโครโมโซมและชนิดของโครโมโซมเป็นหลัก ซึ่ง Stebbins (1950) ได้จำแนกคาริโอไทป์ออกเป็นสองประเภท คือ Symmetrical และ Asymmetrical Karyotype

“อิดิโอแกรม” หมายถึง การเขียนภาพโครโมโซมแต่ละแท่งแล้วนำมาจัดเรียงเป็นหมวดหมู่ โดยโครโมโซมเหล่านี้ถูกวาดมาจากหลายๆเซลล์เมทาเฟส ทั้งนี้เพื่อให้ภาพเขียนของโครโมโซมมีลักษณะถูกต้องได้สัดส่วนเหมือนจริงมากที่สุด อิดิโอแกรมนิยมนำมาใช้ในการเปรียบเทียบโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์ เพื่อการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องวิวัฒนาการ แต่แนวทางด้านการแพทย์เพื่อตรวจดูความผิดปกติของโครโมโซมแล้วนิยมนำมาจากคาริโอไทป์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.5.1 จำนวนชนิด ของปลาวงศ์ปลากระทิง (Family Mastacembelidae) ในจังหวัดมหาสารคาม

1.5.2 ได้สูตรคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม การจัดคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม (Idiogram) มาตรฐานของปลาวงศ์ปลากระทิง ในจังหวัดมหาสารคาม

1.5.3 สามารถนำเทคนิค การย้อมสีโครโมโซม แบบธรรมดา และแบบนอร์ไปใช้ในการศึกษาปลาชนิดอื่นได้

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

ปลาเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศ ในการวิจัยเรื่อง พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลากระทิง *(Mastacembelidae)* ในจังหวัดมหาสารคาม ผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาค้นคว้าเอกสาร ทฤษฎี หลักการ และผลการวิจัยต่าง ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการวิจัยในครั้งนี้ และได้จำแนกทางอนุกรมวิธานของ Mastacembelidae โดยได้นำมาจัดจำแนกอนุกรมวิธานตาม ชวลิต วิทยานนท์ (2544) ดังนี้ 1) Kingdom Animalia 2) Phylum Chordata 3) Class Actinopterygii 4) Order Synbranchiformes 5) Family Mastacembelidae 6) Genus Macrognathus 7) Species *Macrognathus siamensis* 8) Genus Mastaembelus และ 9) Species *Mastaembelus armatus* โดยการวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้กล่าวถึงเอกสารที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

1. ลักษณะทั่วไปของปลาวงศ์ปลากระทิง
2. การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์
3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.1 ลักษณะทั่วไปของปลาวงศ์ปลากระทิง

2.1.1 ปลาหลดจุด (*Macrognathus siamensis*)

ภาพที่ 2.1 ลักษณะภายนอกของปลาหลดจุด

ชื่อสามัญ Peacock eel, Spotted Spiny Eel

ชื่อท้องถิ่น หลด หลดจุด

ชื่อวิทยาศาสตร์ *(Macrognathus siamensis)* (Gunther, 1861)

2.1.1.1 ลักษณะชีววิทยาทั่วไป ปลาหลดจุดเป็นปลาน้ำจืดอยู่ในวงศ์เดียวกับปลากระทิง แต่มีขนาดเล็กกว่าปลากระทิง ลักษณะลำตัวยาวเรียว แบนข้าง จะงอยปากเรียวแหลมที่ปลายมีหนวดสั้นๆ อยู่ 1 คู่ ปากเล็กอยู่ใต้ตา ครีบหลังและครีบท้องไม่มีลายหรือจุด แต่จะมีจุดสีดำคล้ายดวงตาที่โคนครีบหลังประมาณ 1 -5 จุด ขนาดโตเต็มที่มีความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ผสมพันธุ์ ได้ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม

2.1.1.2 ลักษณะการกระจายตัว ปลาหลดจุดเป็นปลาที่พบมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ชอบอาศัยอยู่ตามพื้นหน้าดินบริเวณน้ำไหลช้า ๆ หรือน้ำนิ่ง เช่น แม่น้ำ ลำคลอง หนอง และบึง มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย อินเดีย พม่า และเวียดนาม สำหรับในประเทศไทยพบแพร่กระจายไปทั่วประเทศ ส่วนในจังหวัดร้อยเอ็ดพบในบริเวณทุ่งกุลาร้องไห้ แม่น้ำมูล และแม่น้ำชี รวมถึงลำน้ำสาขา (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดร้อยเอ็ด)

2.1.2 ปลากระทิง (*Mastaembelus armatus*)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 2.2 ลักษณะภายนอกของปลากระทิง

ชื่อสามัญ Armed Spiny Eel

ชื่อท้องถิ่น ปลากระทิง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Mastaembelus armatus* (Lacepede, 1800)

2.1.2.1 ลักษณะชีววิทยาทั่วไป รูปร่างคล้ายปลาไหลแต่ลำตัวแบนข้าง มีเกล็ดเล็กละเอียด บนลำตัวและหัวด้านบนมีสีน้ำตาลเข้มมีแถบสีดำเป็นเส้นคดเคี้ยวตั้งแต่บริเวณนัยน์ตาจนถึงฐานครีบหาง เส้นแถบนี้จะประแต้มไปจนถึงครีบหลังและครีบก้น ปากเล็ก ฟันซี่เล็ก ลักษณะของจะงอยปากยาวดูคล้ายงวง ช่องเหงือกแคบเล็ก อยู่ค่อนไปทางตอนใต้ของส่วนหัว ครีบหลัง ครีบหาง และครีบก้นเชื่อมติดกัน บริเวณหน้าครีบหลังและครีบท้องมีก้านครีบเดี่ยว ที่เป็นหนามแข็งปลายแหลม ไม่มีครีบท้อง

2.1.2.2 ลักษณะการกระจายตัว พบในแม่น้ำ หนองบึงและอ่างเก็บน้ำทั่วทุกภาค กินแมลง ลูกกุ้ง ลูกกบและปลาอื่น ๆ ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า (กรมประมง, 2535)

2.2 การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์

พันธุศาสตร์เซลล์ (Cytogenetics) เป็นการศึกษาโครโมโซม (Chromosome) ซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างที่สำคัญในการถ่ายทอดพันธุกรรมของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมย่อมมีผลโดยตรงต่อการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ทำให้เกิดการแสดงออกในสิ่งมีชีวิตในรูปแบบที่จำเพาะตัว และแตกต่างกัน มีผลต่อการเจริญพัฒนา และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับพันธุศาสตร์เซลล์จะทำให้ทราบถึงความแตกต่างผันแปรทางพันธุกรรมในระดับโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดตลอดจนทราบถึงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาด้านอื่นๆ เช่น การปรับปรุงพันธุ์ การจัดจำแนกชนิด การบริหารจัดการ และอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อก่อให้เกิดความมั่นคงของฐานความหลากหลายทางชีวภาพ และนำไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนจากต้นทุนความหลากหลายทางชีวภาพในที่สุด

กล่าวได้ว่าพันธุศาสตร์ของเซลล์ เริ่มต้นในปี ค.ศ. 1902 โดยมีกำเนิดมาจากการศึกษาทางพันธุศาสตร์เซลล์ ได้เริ่มในศตวรรษที่ 19 มีการศึกษาพฤติกรรมของโครโมโซมทั้งจากการแบ่งเซลล์ชนิดไมโทซิส และไมโอซิส ทราบระบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต และความเข้าใจทางด้านวิทยาเอ็มบริโอ และสรีรวิทยาของเซลล์ เป็นเวลาใกล้เคียงกันกับงานของเมนเดล (Mende) ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยศึกษาจากลักษณะที่ปรากฏจากคู่ผสมพ่อแม่ที่กำหนดเป็นความรู้ Genetics ความรู้นี้ช่วยอธิบายหน่วยควบคุมพันธุกรรมและแบบแผนการถ่ายทอดของหน่วยดังกล่าว

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เมื่อความรู้ทั้ง Cytology และ Genetics ถูกนำมาศึกษาร่วมกันมีผลทำให้เข้าใจองค์ประกอบ และพฤติกรรมของโครโมโซมซึ่งมีผลต่อไปจนเกิดความเข้าใจในระดับการทำงานของยีน

การศึกษาโครโมโซมเพื่อตรวจสอบจำนวน และรูปร่างของโครโมโซมมีหลายวิธีจะเลือกเอาเซลล์ระยะเมทาเฟส (Metaphase) เพราะเป็นระยะที่มีการหดสั้นมากที่สุดเห็นลักษณะได้ชัดเจน เพื่อที่จะเก็บเกี่ยวเซลล์ในระยะเมทาเฟส ได้นำสารโคลซิซิน (Colchicine) ซึ่งเป็นสารสกัดจากพืชสกุล Colchicum มาใช้เพื่อยับยั้งการสร้างสายสปินเดิล ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวไม่สามารถเข้าสู่ระยะแอนนาเฟส (Anaphase) ได้ ซึ่งวิธีการเตรียมโคโมโซมแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีโดยตรง (Direct Chromosome Preparation) เป็นวิธีที่เลือกเอาเซลล์ในร่างกายที่กำลังแบ่งตัวมาศึกษาโครโมโซม เป็นเซลล์ที่ยังอ่อนและยังมีการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลา เช่น เซลล์เม็ดเลือดจากไขกระดูก (bone Morrow) อีกวิธีคือ วิธีโดยอ้อม (Indirect Chromosome Preparation) จะเลือกเซลล์ในร่างกายชนิดที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย (In Vitro) ให้เซลล์มีการแบ่งตัว (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

การศึกษาจำนวน รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของโครโมโซมเป็นข้อกำหนดที่ดีในการช่วยจำแนกชนิดของปลา เพราะปลาบางชนิดมีลักษณะคล้ายกันแต่เมื่อศึกษาคาริโอไทป์แล้วมีความแตกต่างกัน ทำให้ทราบว่าเป็นปลาต่างชนิดกัน การนับแต่จำนวนโครโมโซมอย่างเดียวก็อาจมีข้อผิดพลาด เพราะปลาชนิดเดียวกันที่มีถิ่นอาศัยต่างกัน สภาพแวดล้อมทางภูมิศาสตร์ต่างกันอาจมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน แต่มีจำนวนแขนโครโมโซมเท่ากัน เพราะความแตกต่างทางภูมิศาสตร์ และกระบวนการทางวิวัฒนาการ สาเหตุนี้อาจเกิดจากแขนของ Acrocentric Chromosome 2 แท่ง มารวมกันกลายเป็นโครโมโซมชนิด Metacentric Chromosome 1 แท่งได้ ตามทฤษฎีของ โรเบิร์ต โซเนียนที่เรียกว่า Robertsonian Fusion เป็นสาเหตุที่ทำให้จำนวนโครโมโซมลดลง อีกเหตุการณ์หนึ่งจะเกิดในทิศทางที่สวนทางกันคือ โครโมโซมชนิด Metacentric Chromosome 1 แท่ง เกิดการหักออกกลายเป็น Acrocentric Chromosome 2 แท่ง ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า Robertsonian Fission เป็นผลจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น (สุภาพร สุกสีเหลือง, 2542)

2.2.1 เทคนิคการศึกษาโครโมโซม

เนื่องจากโครโมโซมเป็นตำแหน่งที่อยู่ของยีนซึ่งเป็นตัวควบคุมพฤติกรรมต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต การเจริญเติบโตอย่างปกติย่อมเกิดจากการควบคุมของยีนในสภาพสมดุล ถ้าสิ่งมีชีวิตใดมีจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนไปจากเดิมย่อมก่อให้เกิดผลต่างๆ ตามมา การศึกษารูปร่างและลักษณะของ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

โครโมโซมจึงจำเป็นอย่างยิ่ง สิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์มีจำนวนโครโมโซม และลักษณะคงที่ สิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์โดยใช้เพศมีจำนวนโครโมโซม 2 แบบในเซลล์ต่างชนิดกัน เซลล์ร่างกาย เซลล์ร่างกายมีเป็นแบบดิพลอยด์ (2n) และเซลล์สืบพันธุ์เป็นแบบแฮพลอยด์ (n) สิ่งมีชีวิตสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศมีเพียงแบบเดียว คืออาจเป็นแบบดิพลอยด์หรือแฮพลอยด์ขึ้นกับการกำเนิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

2.2.2 การเตรียมโครโมโซมโดยวิธีทางตรง (Direct Method)

อวัยวะที่ใช้ คือ ไต เนื่องจากเป็นอวัยวะที่มีการแบ่งเซลล์ตลอดเวลา วิธีการเตรียมดัดแปลงจากวิธีของ Chen and Ebeling (1968) และ Nanda et al. (1995) โดยสังเขป คือ ชั่งน้ำหนักปลา จากนั้นฉีดสารโคลชิซิน (Colchicine) เข้มข้น 0.05% (ฉีด 1 มิลลิลิตร/น้ำหนักปลา 100 กรัม) ปล่อยปลาให้ว่ายน้ำปกติ 1 ชั่วโมง จากนั้นสลบปลาด้วยน้ำแข็ง และผ่าเอาไตโดยนำมาสับให้ละเอียดในสารละลาย KCl เข้มข้น 0.075 M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใน Petri dish ภายใน 10 นาที ย้ายเซลล์ใส่หลอดน้ำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปั่นเสร็จเทส่วนใสทิ้งแล้วเติมน้ำยาคงสภาพ (Canoy’s fixative) ทีละน้อยจนได้ปริมาตร 8 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว และเวลาเท่าเดิม จากนั้นเทสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วเติมน้ำยาคงสภาพอีกในปริมาตรเท่าเดิม ทำซ้ำจนกว่าสารละลายจะใส (ประมาณ 3 รอบ) ทำการเจือจางตะกอนเซลล์ในปริมาตรพอเหมาะโดยเติมน้ำยาคงสภาพลงไปในปริมาตร 3 เท่าของปริมาณตะกอนเซลล์ (วรรณภา กสิฤกษ์ และคณะ, 2557)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.2.3 การย้อมแถบสีบนโครโมโซม

การย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดา (Convertional Stain) โดยใช้สีประเภทย้อมติดกรดนิวคลีอิก เช่น สี Orcein, Camine และ Giemsa ภาพโครโมโซมจะติดเป็นสีเข้มตลอดแท่ง จากการย้อมเช่นนี้สามารถบอกจำนวน และชนิดของโครโมโซมประจำสปีชีส์นั้น ๆ ได้ และอาจบอกลักษณะพิเศษบางอย่างของโครโมโซมได้ เช่น Primary Constriction, Secondary Constriction และ Satellite อย่างไรก็ตามการติดสีโครโมโซมดังกล่าวบางครั้งอาจพบว่ามีการติดสีได้ไม่เท่ากัน เช่น ในขณะที่โครโมโซมผ่านเข้าในวัฏจักรของเซลล์จะมีการยืดหดไม่เท่ากัน ระยะใดที่หดมากจะติดสีเข้มมาก แต่ถ้าหดน้อยจะติดสีที่จางกว่า อีกทั้งภายในแท่งโครโมโซมเดียวกันยังติดสีไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของ Heterochromatin และ Euchromatin ดังนั้นการย้อมด้วยสีธรรมดา และโดยเฉพาะใช้สีเจือจางแล้วบางครั้งอาจตรวจพบการติดสีชนิดเข้มและจางบนโครโมโซมได้บ้าง แต่ถ้าย้อมโดยใช้สีเข้มข้นจะไม่สามารถสังเกตความเข้มและจางบนโครโมโซมได้เลย Heitz ได้เป็นบุคคล

แรกที่รายงานการติดสีไม่เท่ากันของโครโมโซมแมลงหวี่อันเนื่องมาจากการโครมาทิดดังกล่าว (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

ในปี ค.ศ. 1940 Darlington และ La cour ได้ใช้วิธีเหนี่ยวนำโดยใช้ความเย็นจัดเพื่อช่วยให้เกิดแถบสีเข้มจางบนโครโมโซม เขาทดลองกับรากพืชตระกูล *Trillium* และพบว่าสามารถตรวจพบโครโมโซมที่ติดสีเข้ม และจางไม่เท่ากัน จากการศึกษาโครโมโซมโดยการย้อมให้ติดสีเข้มตลอดทั้งแท่งของโครโมโซมให้คุณค่าที่น้อยเกินไป โดยเฉพาะการแยกชนิดของโครโมโซมคน เนื่องจากรูปร่างโครโมโซมคนในกลุ่ม B, C, D, F และ G มีลักษณะที่เหมือนกันมาก ปัจจุบันได้ค้นพบวิธีการเหนี่ยวนำโครโมโซมเพื่อการติดสีหรือแถบขวาง (Band) ทำให้สามารถวิเคราะห์หรือกำหนดได้ว่าโครโมโซมที่สังเกตเห็นว่าเป็นโครโมโซมแท่งที่เท่าใด เพื่อช่วยในการตรวจสอบโรคทางพันธุกรรมของมนุษย์ และสาเหตุของโรคมะเร็งหลายชนิดยังมีผลเนื่องจากความผิดปกติของโครโมโซม นอกจากนั้นยังเป็นประโยชน์ในการจำแนกสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้องยิ่งขึ้นและช่วยอธิบายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตด้วย (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

2.2.4 การศึกษาการย้อมแถบสีบนโครโมโซม

การย้อมสีให้เห็นเป็นแถบขวาง (Band) บนโครโมโซมนั้น เป็นวิธีการที่เริ่มเมื่อประมาณ 10 กว่าปีที่ผ่านมาก่อนจะมีการย้อมสีที่เป็นแบบขวางนี้ นักพันธุศาสตร์ได้อาศัยวิธีการอื่น ๆ ในการช่วยวิเคราะห์หรือกำหนดว่าโครโมโซมที่สังเกตนั้นเป็นแท่งเท่าใด วิธีการดังกล่าวได้แก่ ความยาวของโครโมโซม สัดส่วนของแขนโครโมโซม (Arm Ratio) การปรากฏรอยคอดของโครโมโซม (Secodary Cnostriction) และการใช้วิธีติดฉลาก (Label) โครโมโซมโดยอาศัย เทคนิค Autoradiograph อย่างไรก็ตามไม่มี Parameter ใดที่กล่าวมาข้างต้นจะสามารถใช้บอกโครโมโซมใดได้แน่นอน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

รายงานครั้งแรกของการย้อมสี Band กับโครโมโซมได้เริ่มในปี ค.ศ.1968 โดย Gaspersson และเพื่อนร่วมรายงานของเขาที่ Karolinska Institute ณ กรุงสต็อกโฮม ประเทศสวีเดน เขาได้ใช้สีย้อมชนิด Quinacrine musyanrd (QM) และตรวจดูโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์แต่ละโครโมโซมจะมีรอยแถบขวางเล็ก ๆ เป็นสีดำมืด และสีเขียวสว่างไสวง่ายต่อการจดจำ และสามารถ จำแนกโครโมโซมออกจากกันได้ทุกโครโมโซม โดยที่โครโมโซมเป็นคู่ Homologous จะมีรูปแบบ ของแถบที่เหมือนกันด้วย ต่อมาปี ค.ศ. 1970-1972 จึงได้มีเทคนิคในการย้อม band แบบต่าง ๆ เกิดมากมาย แต่ละวิธีการปรับปรุงให้เหมาะสมกับชนิดของเซลล์ที่ใช้ โดยเฉพาะโครโมโซมของคนนั่นได้มีการประชุมนานาชาติครั้งแรกที่กรุงปารีสในปี ค.ศ. 1971 ได้ตั้งคณะกรรมการในการ

กำหนดมาตรฐานของคาริโอไทป์คนจากการประชุมครั้งนี้จึงตั้งชื่อให้เกิด Band ซึ่งเกิดจากการย้อมที่แตกต่างกันด้วยเป็น 4 วิธี คือ Q-band, C-band, G-band, และ R-band และให้กำหนดเลขลำดับที่ให้โครโมโซมของคนในแต่ละแท่งด้วย นอกจากนี้ยังมีแบบ NOR-band ที่ใช้ในการศึกษาด้วย ดังนี้

2.2.4.1 C-band (Centromeric Band) Pardue และ Gall ได้ศึกษาในหนู (*mus musculus*) ใช้เทคนิคของการทำ Nucleic Acid Hybridization ด้วยการย้อมสี Giemsa พบว่าส่วนของเซนโทรเมียร์ ของออโทโซม และโครโมโซม X ทั้งหมดติดสีโครโมโซมเข้ม ซึ่งภายหลังได้รับทราบว่าส่วนติดสีนี้เป็นตำแหน่งของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของเบสที่ซ้ำกัน (Repeated sequence ชนิด Satellite DNA) เป็นดีเอ็นเอที่มีการจำลองตัวเองสิ้นสุดช้าที่สุด (Late Duplicating at S Phase) ต่อมา Arrighi และเพื่อนร่วมงานได้ทำการทดลองโดยใช้เทคนิคที่คล้ายกันกับของ Pardue และ Gall ทดลองกับโครโมโซมคนจึงพบว่าส่วนที่ติดสีเข้มคือ Constitutive Heterochromatin เทคนิคนี้ทำโดยผ่านเซลล์เมทาเฟส (ที่เตรียมบนสไลด์แล้วใน HClและNaOH และตามด้วยการอบเซลล์ในเกลือโซเดียมที่ 60-65 องศาเซลเซียส) ย้อมด้วยสี Giemsa ส่วนของ Euchromatin เป็นส่วนไม่ติดสี แต่ Heterochromatin จะติดสีเข้ม วิธีการนี้ใช้ด่าง NaOH เป็นตัวช่วยให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวออกจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว (Denature) และใช้เกลือโซเดียมในการจับคู่พันเกลียวจากสายเดี่ยวมาเป็นสายคู่ (Reassociate) เรียกว่า เป็นเทคนิค C-band

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.2.4.2 G-band (Standard Giemsa Band) เป็นแถบขวางของโครโมโซม ที่เกิดจากการย้อมด้วยสี Giemsa แถบที่เกิดขึ้นของ G นี้มีลักษณะเช่นเดียวกับ Q-band ส่วนที่ติดสี C-band บางแถบก็พบว่าเป็น G-band หรือ Q-band ด้วย เช่น ในโครโมโซมคนคู่ที่ 1 ส่วน ปลายของ C-band จะติดสีเข้มใน G-band ส่วนติดสีเข้มบน C-band ของโครโมโซมคู่ที่ 1 ส่วนปลายของ G-band ด้วย ส่วนติดสีเข้มบน C-band นั้นอาจใช้สารเคมีที่ต่างชนิดกัน เช่น Trypsin, Urea เป็นต้น สารเคมีบางอย่างยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด Band ได้ เช่น Actinomycin D, Ethidium Bromide เป็นต้น

2.2.4.3 Q-band (Quinacrine Band) การใช้สี Quinacrinemustand ย้อมโครโมโซมแล้วพบแถบดำมืด และสีเขียวสว่างภายใต้การตรวจดูจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ มีลักษณะแถบที่เหมือนกันกับ G-band และสามารถบอกโครโมโซมทุกแท่งในจีโนมได้ โดยเฉพาะเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟสของคนนั้นเมื่อย้อมด้วยสีชนิดนี้จะทำให้โครโมโซม Y ติดสีเขียวสว่างมาก เรียก Y ที่ติดสีเรืองแสงสีเข้มนี้ว่า Y-chromosome หรือ Y-body เป็นการช่วยตรวจโครโมโซม Y ของคนได้อีกด้วย นอกจากนี้สี Quinacrinemustand ใช้ในการย้อมแล้ว ยังปรากฏสีอื่นๆที่ใช้ย้อม Q-band ได้เช่นกัน

คือ Benzimidazole Derivative ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า 33258 Hoechst และพบส่วนติดสี Q-band เข้มเป็นบริเวณที่มี A-T rich (มียีนทำงานน้อย) ส่วนติดสี Q-band จาง เป็นบริเวณที่มี G-C rich (มียีนทำงาน)

2.2.4.4 R-band (Reverse Band) เป็นการนำเอาสไลด์ไปอบใน Phosephase buffer pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จึงย้อมด้วยสี Giemsa แถบที่ปรากฏจะมีสีเข้มและจางสลับกับของ G-band หมายถึง band ที่มีสีเข้มของ R-band จะปรากฏเป็นสีจางของ G-band ถึงแม้ว่าการรายงานของ R-band นี้มักติดสีบริเวณ Telomere เข้มมาก ดังนั้นบางครั้งอาจเรียกการย้อมนี้ว่า T-band มีการศึกษาพบว่าบริเวณติดสีเข้มของ R-band เป็นบริเวณที่มีเบส G-C มาก (G-C rich) และบริเวณที่ติดสีเข้มของ G และQ-band เป็นบริเวณที่มีเบส A-T มาก (A-T rich) ในบางครั้งการศึกษาโรคบางชนิดของคนที่มีการขาดหรือเกินมาเล็กน้อยในบริเวณปลายแขนของโครโมโซมนั้นการย้อม band หลายๆแบบช่วยในการยืนยันผลงานที่ถูกต้องยิ่งขึ้น

2.2.4.5 NOR-band ด้วยวิธีการศึกษา in Situ Hybridization พบว่าโครโมโซมคนที่มี Satellite (ปลายติ่งโครโมโซมที่พบปลายแขนด้านสั้น) จะเป็นโครโมโซมที่มีตำแหน่งของ Ribosomal Gene (rDNA) ปรากฏอยู่ โดยที่ (rDNA) จะอยู่บริเวณใกล้ Satellite ซึ่งเป็นตำแหน่งของ Nucleolus Organizer Region (NOR) Bloom และ Goodpasture ในปี ค.ศ.1976 ได้ประดิษฐ์เทคนิคในการย้อมติดส่วนของ Nucleolus organizer นี้โดยการใช้สารละลาย Silver Nitrate เป็นสารย้อมโครโมโซม แถบที่ปรากฏเรียก NOR-band เรียกเทคนิคนี้ว่า Silver (NOR) staining ในคนพบว่าโครโมโซมชนิด Acrocentric 5 คู่ คือ คู่ ที่ 13, 14, 15, 21 และ 22 มียีน rDNA ปรากฏโดยติดสี NOR-band (อรรา คัมภิรานนท์, 2546)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.2.5 การตรวจสอบโครโมโซม

ตรวจสอบโครโมโซม โดยดัดแปลงจากวิธีการของ กันยารัตน์ ไชยสุต (2532) ทำการเลือกเซลล์ที่ต้องการนำมาศึกษาซึ่งโครโมโซมระยะเมทาเฟส กระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน มีจำนวนโครโมโซมครบ ถ่ายภาพโครโมโซมโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X จำนวน 10 เซลล์ นำฟิล์มที่ได้ไปล้างแล้วอัดภาพ นำภาพไปขยายตามขนาดที่สามารถวัดความยาวของโครโมโซมอย่างชัดเจนหรือใช้ภาพถ่ายจากกล้องดิจิตอล (Digital) ใช้รูปถ่ายนี้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน และจำแนกชนิดโครโมโซมโดยการหาค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Length Long; Ll) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (length Short; Ls) และคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (length Total; LT, LT = Ll+ Ls)

จากนั้นคำนวณหาค่า Relative Length (RL) และ Centromeric Index (CI) เพื่อหาชนิดของโครโมโซม นำค่าที่หาได้ทั้งหมดไปใช้ประกอบในการจัดทำคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม การหาค่า Fundmental Number (NF) ซึ่งเป็นตัวเลขที่เกิดจากผลรวมของจำนวนแขนของโครโมโซมทุกแท่งใน 1 เซลล์ เช่น โครโมโซมชนิด เมทาเซนทริก 1 แท่ง จะมี NF เป็น 2 และโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก 1 แท่ง จะมี NF เป็น 1 ส่วนค่า Autosomal Fundamental Number (NFa) นั้นจะเป็นผลรวมของจำนวนแขนของโครโมโซม ที่เป็นโครโมโซมร่างกายไม่รวมโครโมโซมเพศ นิยมศึกษาไว้เป็นคุณสมบัติของแต่ละชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

2.2.6 การจัดทำคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม

คาริโอไทป์เป็นการศึกษารายละเอียดของโครโมโซม โดยดูจากลักษณะที่มองเห็นจากโครโมโซมเครื่องหมายต่าง ๆ เช่น เซนโทรเมียร์ หรือรอดคอดที่หนึ่ง รอยคอดที่สองบนโครโมโซม และแถบสีบนโครโมโซม (Band) ประกอบค่า RL และค่า CI ซึ่งบ่งบอกขนาด และรูปร่างโครโมโซมว่าเป็นชนิดเมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก อะโครเซนทริก หรือเทโลเซนทริก ถ้ามีโครโมโซมเพียงสองชนิด คือ เมทาเซนทริก และซับเมทาเซนทริกจัดเป็นคาริโอไทป์แบบสมมาตร (Symmetric Karyotype) ถ้ามีโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกหรือเทโลเซนทริกอยู่ด้วยจัดเป็นคาริโอไทป์แบบไม่สมมาตร (Asymetric Karyotype) (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1. เลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟสที่ขนาดของโครโมโซม ไม่ยาวหรือสั้นเกินไปมีการกระจายที่ดีไม่ซ้อนทับกัน และนับจำนวนโครโมโซมได้ครบเท่ากับจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุที่มีกำลังขยาย 100X

2. ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมคู่เหมือน (Homologouschromosome) โครโมโซมคู่เหมือนนี้ แท่งหนึ่งมาจากพ่อ และอีกแท่งหนึ่งมาจากแม่ มีความคล้ายคลึงกันมากจึงสามารถจับคู่โครโมโซมได้ โดยการกำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์

3. ค่า RL

$$\text{ค่า} \qquad \frac{RL = LT}{\sum LT}$$

การใช้ค่า RL นี้สามารถช่วยในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซม เพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ ในทุก ๆ เซลล์ ส่วนค่าความยาวของโครโมโซมจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละเซลล์

4. คำนวณหาค่า CI

ค่า $CI = \frac{Ll}{LT}$

ค่า CI ที่ได้นำมาใช้จัดชนิดของโครโมโซม

5. การจัดขนาดของโครโมโซม แบ่งออกเป็น 3 ขนาด โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุดเป็นโครโมโซมคู่สุดท้าย โครโมโซมขนาดกลาง (medium = M) ได้แก่ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุดรวมกับโครโมโซมคู่ที่เล็กที่สุด

6. จัดเรียงคาริโอไทป์ ให้เรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายเสมอ ต้องบอกหมายเลข ของโครโมโซมแต่ละคู่ ด้านล่างวางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง และวางแท่งโครโมโซมให้เซนโทรเมียร์ตรงกัน (อมรา คัมภิรานน์, 2546)

อิดิโอแกรม คือ ไดอะแกรมแสดงคาริโอไทป์ของโครโมโซม 1 ชุดแฮพลอยด์ ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ (โครโมโซมเอ็กซ์ และวาย) โดยใช้ข้อมูลค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซม รูปร่างของโครโมโซม และตำแหน่งเซนโทรเมียร์ จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ จัดทำอิดิโอแกรมจากเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาแถบสีแบบจี และแถบสีแบบจีที่ให้รายละเอียดสูง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ธวัช ดอนสกุล และคณะ (2535) ศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของปลาหลดจุด ปลาหลดภูเขา ปลาหลด และปลากระทิงดำที่พบในประเทศไทย ปลาแต่ละชนิดจำนวนชนิดละ 15 ตัวที่นำมาใช้ในการศึกษามีความยาวมาตรฐาน 15.3-19.7 ซม. 11.2-14.5 ซม. 11.7-17.3 ซม. และ 22.5-30.0 ซม. ตามลำดับ การเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาดัดแปลงมาจากวิธีของ (Ida and Kyo, 1980) วิธีของ (Uwa and Ojima, 1981) การจำแนกโครโมโซมถือเอาตามวิธีของ (Levan, et al. 1964) ผลการทดลองพบว่า 1) ปลาหลดจุดมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n=48 คาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 4 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 1 คู่ และแบบอะโครเซนตริก 19 คู่

จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 56 2) ปลาหลดภูเขามีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n=48 คาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก7 คู่ แบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ และแบบอะโครเซนตริก 16 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 64 3) ปลาหลดมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n=48 คาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 7 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 2 คู่ และแบบอะโครเซนตริก 15 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 62 4) ปลากระทิงดำมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n=48 คาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 6 คู่ แบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 2 คู่ และแบบอะโครเซนตริก15 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 62 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปลาทั้ง 4 ชนิด มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน (2n=48) แต่มีคาริโอไทป์ต่างกัน ผลที่ได้จากการศึกษามีประโยชน์ทางด้านเซลล์อนุกรมวิธานของปลา

วีระยุทธ สุภิวงค์ (2553) ศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาช่อนจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 4 ชนิด ได้แก่ ปลาช่อน (Channastriata) ปลาชะโด (C. micropeltes) ปลากระสง (C. lucius) และปลาก้าง (C. Gachua) โดยเตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อไต และการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว และย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์ (NOR banding) ผลการศึกษาพบว่าจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ในปลาช่อน ปลาชะโด ปลากะสง และปลาก้าง เท่ากับ 42, 44, 48, และ 104 แท่ง ตามลำดับ จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน หรือจำนวนแขนของโครโมโซมเท่ากับ 50, 46, 54, และ 112 ตามลำดับ ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่สามารถจำแนกโครโมโซมเพศได้ โครโมโซมเครื่องหมาย คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ พบจำนวน 1 คู่ ตำแหน่งนอร์จะอยู่บริเวณตอนปลายของโครโมโซมใกล้เทโลเมียร์หรือเซนโทรเมียร์ โดยในปลาช่อน ปลาชะโด และปลาก้าง พบนอร์ที่ตำแหน่งใกล้เซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 14, 3 และ 3 ตามลำดับ ส่วนปลากะสง พบนอร์ที่แขนข้างสั้นใกล้ตำแหน่งเทโลเมียร์ของโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกคู่ที่ 2 สูตรคาริโอไทป์ของปลาทั้ง 4 ชนิด ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก – ซับเมทาเซนทริก – อะโครเซนทริก และเทโลเซนทริก ในปลาช่อนเท่ากับ 6 – 0 – 2 – 34 แท่ง ปลาชะโดเท่ากับ 2 – 0 – 0 – 42 แท่ง ปลากะสงเท่ากับ 2 – 0 – 4 – 42 แท่ง และปลาก้างเท่ากับ 0 – 6 – 2 – 96 แท่ง ตามลำดับ จากข้อมูลเบื้องต้นนำมาสร้างแบบจำลองสมมติฐานสายวิวัฒนาการของโครโมโซม ทำให้สันนิษฐานได้ว่าปลาสกุลปลาช่อนทั้ง 4 ชนิดมาจากบรรพบุรุษร่วมที่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 48 แท่ง และเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด โดยในสายวิวัฒนาการของปลาช่อน คาดว่าเกิดกระบวนการเชื่อมกันตรงเซนโทรเมียร์ และการต่อสลับแบบรวมเซนโทรเมียร์ ส่งผลให้จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ลดลง และเพิ่ม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

โครโมโซม ที่มีสองแขนขึ้น สำหรับสายของปลาชะโด คาดว่าเกิดผ่านกระบวนการเชื่อมกันตรง เซนโทรเมียร์ และการหักของโครโมโซมพร้อมทั้งมีการสูญหายของชิ้นส่วนโครโมโซม ส่วนในสายวิวัฒนาการของปลากะสง คาดว่าเกิดผ่านกระบวนการต่อสลับแบบรวมเซนโทรเมียร์ ทำให้มีโครโมโซมที่มีสองแขนเพิ่มแต่จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ยังเท่ากับบรรพบุรุษ และในสายวิวัฒนาการของปลาก้าง ได้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซม แล้วเกิดการต่อสลับแบบรวมเซนโทรเมียร์ และการหักของโครโมโซมที่มีสองแขนตรงเซนโทรเมียร์

กิติยา ศิลาวงศ์ (2554) ศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลากรายจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 2 ชนิด ได้แก่ ปลากราย *(Chitala ornata)* และปลาสลาด *(Notopterus notopterus)* โดยเตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อไต และย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและย้อมแถบสีแบบนอร์ (NOR Banding) ผลกาศึกษาพบว่าปลากรายและปลาฉลาดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (Diploid) เท่ากับ 42 จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน หรือจำนวนแขนของโครโมโซมเท่ากับ 44 และ 42 ตามลำดับ ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ไม่สามารถจำแนกโครโมโซมเพศได้ โครโมโซมเครื่องหมาย คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ พบจำนวน 1 คู่ ตำแหน่งนอร์จะอยู่บริเวณตอนปลายของโครโมโซมใกล้เซนโทรเมียร์ โดยในปลากรายและปลาสลาด พบนอร์ที่ตำแหน่งใกล้เซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 11 สูตรคาริโอไทป์ของปลาทั้ง 2 ชนิด ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด อะโครเซนทริก (Acrocentrics chromosome) และเทโลเซนทริก (Telocentrics Chromosome) ในปลากรายเท่ากับ 0-0-2-40 หรือ 2n (42) = L^t_8 + M^a_2 +M^t_{14} +S^t_{18} และในปลาสลาดเท่ากับ 0-0-0-42 หรือ 2n (42) = L^t_8 + M^t_{16} + S^t_{18} ตามลำดับจากข้อมูลเบื้องต้นนำมาสร้างแบบจำลองสมมติฐานสายวิวัฒนาการของโครโมโซม ทำให้สันนิษฐานได้ว่า ปลาวงศ์ปลากรายทั้ง 2 ชนิด มาจากบรรพบุรุษร่วมที่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 42 แท่ง และเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด โดยในสายวิวัฒนาการของปลากรายคาดว่าเกิดกระบวนการหักแล้วหมุนกลับทิศทางมาเชื่อมต่อกับปลายหัวท้ายที่หักจากเดิม ทำให้มีโครโมโซมที่มีสองแขนเพิ่มขึ้นมา

วรรณภา กสิฤกษ์ (2559) ศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์โดยเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์ และศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์รัดับโมเลกุลด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อินซิทไบริไดเซชั่น โดยใช้โพรบเทโลเมียร์และโพรบไรโบโซมอลอาร์ดีเอ็นเอ 18S ของปลาวงศ์อมไข่ 4 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ตาดำ *(Fibramin lateralis)* (Valenciennes, 1832) ปลาอมไข่ตาฟ้า *(Sphaeramia orbicularis)* Cuvier, 1828) ปลาอมไข่ตาแดง (*S. nematoptera*) (Bleeker, 1856) และปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

(Kaumans, 1933) โดยการเตรียมโครโมโซมจากอวัยวะส่วนไตของตัวอย่างปลาชนิดละ 20 ตัว (เพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว) นำโครโมโซมที่เตรียมได้ไปย้อมสีด้วยเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา แบบนอร์และเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชั่น เพื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน ชนิด ขนาด และโครโมโซมเครื่องหมาย

ผลการศึกษาพบว่าจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ในปลาทั้ง 4 ชนิด เท่ากัน คือ 46 แท่ง และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 54, 68, 74 และ 92 ตามลำดับ ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ไม่สามารถระบุโครโมโซมเพศในปลาทั้ง 4 ชนิดได้ โครโมโซมเครื่องหมายพบโครโมโซมที่มีนอร์ชนิดละ 1 คู่ ตำแหน่งของนอร์อยู่บริเวณใกล้เทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 2, 7, 10, และ 13 ในปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาฟ้า ปลาอมไข่ตาแดง และปละอมไข่ครีบยาว ตามลำดับ ผลจากการศึกษาด้วยเทคนิคฟิชโดยใช้โพรบเทโลเมียพบว่าสัญญาณปลากฏตรงตำแหน่งของเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกแท่ง และไม่พบตรงแหน่งอื่นของโครโมโซมในปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิดสำหรับโพรบไรโบโซมอลอาร์ดีเอ็นเอ 18S พบสัญญาณปรากฏจำนวน 2 แท่ง ตรงกับโครโมโซมที่มีนอร์ในปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด สามารถจัดสูตรแคริโอไทป์ได้ดังนี้

ปลาอมไข่ตาดำ 2n (diploid) 46 = $L^{a}_{8} + L^{t}_{12} + M^{t}_{24} + S^{t}_{2}$

ปลาอมไข่ตาฟ้า 2n (diploid) 46 = $L^{sm}_{8} + L^{a}_{12} + L^{t}_{12} + M^{a}_{2} + M^{t}_{10} + S^{t}_{2}$

ปลาอมไข่ตาแดง 2n (diploid) 46 = $L^{sm}_{10} + L^{a}_{10} + L^{t}_{4} + M^{sm}_{4} + M^{a}_{4} + M^{t}_{12} + S^{t}_{2}$

ปลาอมไข่ครีบยาว 2n (diploid) 46 =$L^{a}_{6} + M^{m}_{4} + M^{sm}_{14} + M^{a}_{22}$

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

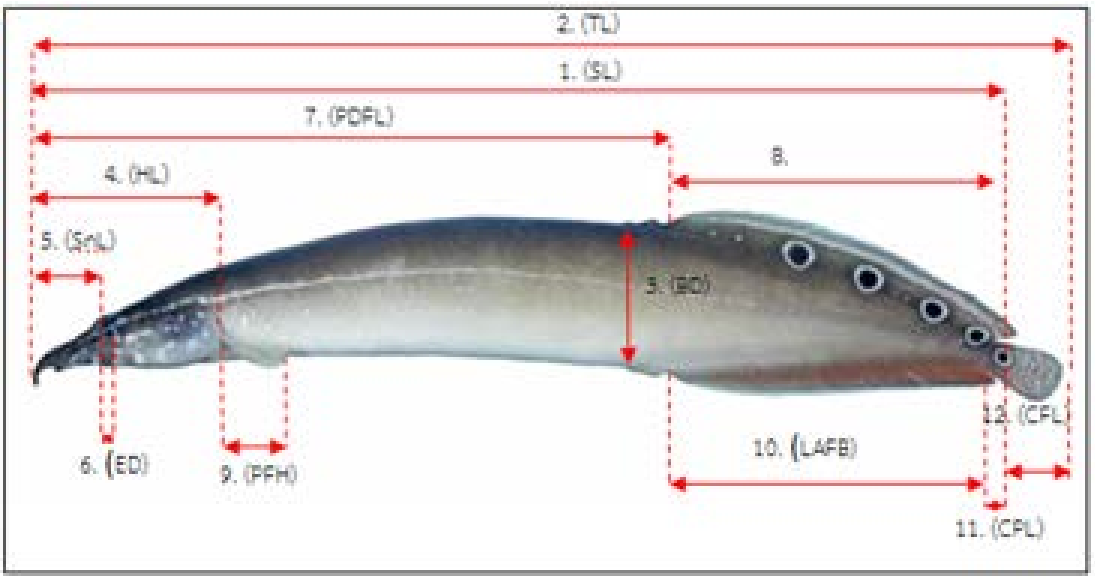
บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างปลาวงศ์ปลากระทิง (Family Mastacembelidae) ทั้ง 2 ชนิด ชนิดละ 30 ตัว โดยทำการเก็บตัวอย่างจาก ลำห้วย หนองน้ำ แม่น้ำชี และลำน้ำสาขาในจังหวัดมหาสารคาม ทำการรวบรวมข้อมูลทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์ปลาวงศ์ปลากระทิง ในจังหวัดมหาสารคาม จากเอกสาร และงานวิจัยที่เผยแพร่ในฐานข้อมูลงานวิจัย และจากการสอบถามชาวบ้าน และชาวประมงในพื้นที่ โดยระยะเวลาในการทำวิจัยตั้งแต่ เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2559– กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561

3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก (External Mophology)

ตัวอย่างปลาชนิดละ 30 ตัว ที่จับได้นำมาเลี้ยงไว้ในตู้ปลาขนาด 40×70 ×50 ซม. ทำการให้ออกซิเจนตลอดเวลาจนบาดแผลตามลำตัว และครีบหางเป็นปกติ ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก เพื่อใช้ในการระบุชนิดของปลาหลดและปลากระทิงจาก (ชวลิต วิทยานนท์, 2547; กลุ่มอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ, 2553 และกรมประมง, 2535) ทำการวัดค่ามาตรฐานความยาวตามส่วนต่าง ๆ ของตัวปลา โดยดัดแปลงการวัดจาก (Fischer and Whitehead, 1974)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ 3.1 การวัดสัดส่วนภายนอกของปลาวงศ์กระทิง, ปรับปรุงจาก Fischer and Whitehead, (1974), Rome : Eastern Indian Ocean and Western Central Pacific.

ค่ามาตรฐานความยาวส่วนต่างๆ 12 ค่าดังนี้

1. ความยาวมาตรฐาน (Standard Length, SL) เป็นการวัดจากปลายสุดของจะงอยปากบน ไปจนถึงฐานครีบหางบริเวณตอนปลายของกระดูก

2. ความยาวเหยียด (Total Length, TL) เป็นการวัดจากปลายสุดของจะงอยปากบน ไปจนถึงปลายสุดของครีบหางลำตัวปลาต้องอยู่ในลักษณะตรงขณะทำการวัด

3. ความลึก (Body Depth, BD) เป็นการวัดช่วงที่ลึกหรือสูงที่สุดของตัวปลา โดยทั่วไปแล้วมักจะเป็นบริเวณหน้าครีบหลังเป็นแนวดิ่งลงไปบริเวณส่วนท้องของปลา

4. ความยาวหัว (Head Length, HL) เป็นการวัดจากปลายสุดของจะงอยปาก ไปจนถึงปลายสุดของแผ่นปิดเหงือกซึ่งเป็นเนื้อเยื่อบางๆ

5. ความยาวจะงอยปาก (Snouth Length, SnL) เป็นการวัดจากปลายสุดของจะงอยปากบนไปจนถึงขอบหน้าสุดของเบ้าตา

6. ความกว้างของตา (Eyediameter, ED) วัดขอบหน้าสุดของเบ้าตาถึงขอบหลังสุดของเบ้าตา

7. ความยาวส่วนหน้าของครีบหลัง (Predorsal Fin Length, PDFL) เป็นการวัดจากปลายสุดของจะงอยปากบน ไปจนถึงฐานครีบหลังด้านหน้าสุด

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

8. ความยาวของฐานครีบหลัง (Length of dorsal fin base, LDFB) วัดจากฐานครีบหลังด้านหน้าสุดไปจนถึงครีบหลังด้านท้ายสุด

9. ความยาวครีบอก (Pectoral fin height, PFH) วัดจากฐานก้านครีบอกจนถึงปลายสุดของครีบอก

10. ความยาวของฐานครีบก้น (Length of anal fin base, LAFB) วัดจากฐานก้านครีบก้นด้านหน้าสุดจนถึงฐานครีบก้นด้านท้ายสุด

11. ความยาวระหว่างจุดเริ่มต้นของครีบก้นถึงฐานของครีบหาง (Caudal peduncle length, CPL) วัดจากฐานครีบก้นด้านท้ายสุดไปจนถึงฐานครีบหาง

12. ความยาวของครีบหาง (Caudal fin length, CFL) วัดจากฐานครีบหางจนถึงปลายสุดของครีบหาง

3.2 การศึกษาโครโมโซม

การศึกษาโครโมโซมเพื่อตรวจจำนวน และรูปร่างของโครโมโซมมีหลายวิธีแต่ละวิธีจะเลือกเอาเซลล์ระยะเมทาเฟส (Metaphase) เพราะเป็นระยะที่มีโครโมโซมหดสั้นมากที่สุดเห็นลักษณะได้ชัดเจน เพื่อที่จะเก็บเกี่ยวเซลล์ในระยะเมทาเฟส ได้นำสารโคลชิซิน (Colchicine) ซึ่งเป็นสารสกัดจากพืชสกุล *Colchicum* มาใช้เพื่อยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิล (Spindle Fiber)ทำให้เซลล์ที่มีการแบ่งตัวไม่สามารถเข้าสู่ระยะแอนาเฟส (Anaphase) ได้ วิธีการเตรียมโครโมโซม แบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีโดยตรง (Direct Chromosome Preparation) เป็นวิธีที่เลือกเอาเซลล์ในร่างกายที่กำลังมีการแบ่งตัวมาศึกษาโครโมโซม เป็นเซลล์ที่ยังอ่อน และยังมีการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลา เช่น เซลล์เม็ดเลือดจากไขกระดูก (Bone Marrow) อีกวิธี คือ วิธีโดยอ้อม (Indirect Chromosome Preparation) จะเลือกเซลล์ในร่างกายชนิดที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย (in vitro) ให้เซลล์มีการแบ่งตัว (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

3.2.1 การเตรียมโครโมโซม

เตรียมโดยวิธีทางตรง (Direct Method)

การเตรียมโครโมโซมโดยตรงจากอวัยวะส่วนที่เลือกคือ ไต และเหงือก เนื่องจากเป็นอวัยวะที่มีการแบ่งเซลล์ตลอดเวลา ดัดแปลงจากวิธีของ Chen and Ebeling (1968) และ Nanda et al. (1995) ดังนี้

ชั่งน้ำหนักตัวปลาเพื่อทำการฉีดโคลซิซินความเข้มข้น 0.05% ปริมาณ 1 มล. ต่อ 100 กรัม ของน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองฉีดโคลซิซินความเข้มข้น 0.05% เพื่อยับยั้งการทำงานของ Spindle Fiber ฉีดเข้าที่บริเวณช่องท้องของปลาทิ้งไว้ 1.30 ชั่วโมง จากนั้นผ่าปลาแล้วนำไต และเหงือกมาสับให้ละเอียดร่วมกับ 0.075 M KCl ซึ่งทำให้เซลล์พองตัว (Hypotonic Solution) เพื่อที่โครโมโซมจะมีการกระจายตัวดี โดยการเติมสารละลาย จำนวน 6-8 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixture) เมื่อครบกำหนดทำการแยกเอา KCl ออก โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,250 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการดูดส่วนใสทิ้ง ทำการตรึงเซลล์ (fixative) ที่มีอัตราส่วนของ Methanol : Glacial Acetic Acid เป็น 3 : 1 ใช้หลอดหยด โดยหยดน้ำยาตรึงเซลล์ทีละหยด พร้อมกับผสมเซลล์ให้เข้ากับสารละลายเติมจนได้ปริมาตรประมาณ 8 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการดูดส่วนน้ำยาตรึงเซลล์ด้านบนทิ้งไป ทำซ้ำ 2-3 รอบ จนได้สารละลายที่ใสและมีตะกอนขาวของเซลล์ที่ก้นหลอด ดูดสารละลายตะกอนเซลล์ หยดลงสไลด์ที่สะอาดและเย็น โดยให้หยดสูงจากสไลด์ 2-3 ฟุต เพื่อให้เซลล์แตก และโครโมโซมแผ่กระจายดี ทำการผึ่งสไลด์ให้แห้งนำไปย้อมด้วยสีจิมซ่า 20% แช่สไลด์นาน 20-45 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปาปล่อยไว้ให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาโครโมโซมต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.3 การตรวจสอบโครโมโซม จัดทำคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม

ประกอบด้วยขั้นตอนการตรวจสอบโครโมโซม จัดคาริโอไทป์ และสร้างอิดิโอแกรมมาตรฐาน ดัดแปลงจากวิธีการของ กันยารัตน์ ไชยสุต (2532) และ Turpin and Lejeune (1965)

3.3.1 การตรวจสอบโครโมโซม

เลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมระยะเมทาเฟส มีโครโมโซมไม่สั้นหรือยาวเกินไป และมีการกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน มีจำนวนโครโมโซมครบ นำมาถ่ายภาพโครโมโซมโดยใช้เลนส์วัตถุ (Objective Lens)

กำลังขยาย 100X โดยใช้ชุดถ่ายภาพที่ต่อกับกล้องจุลทรรศน์ หรือใช้กล้องดิจิตอล เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากภาพถ่ายโครโมโซมชนิดละ 50 เซลล์ ความถี่ของจำนวนโครโมโซมที่พบมากที่สุด จะเป็นค่าของจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จากนั้นจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน (Homologous Chromosome) และศึกษาโครโมโซมโดยการหาค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Long Arm; Ll) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls) และคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (Total Length; LT, LT = Ll+ Ls) คำนวณค่า Relative Length (RL) และ Centromeric Index (CI) เพื่อระบุชนิดของโครโมโซม และนำค่าที่ได้ไปใช้ประกอบในการจัดทำคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม

3.3.2 การจัดทำคาริโอไทป์โดยใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน

ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ วัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง จัดเรียงคาริโอไทป์ ให้เรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้ายเสมอ ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่าง วางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง

3.3.3 การจัดทำคาริโอไทป์มาตรฐาน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

คาริโอไทป์เป็นการศึกษารายละเอียดของโครโมโซม โดยดูจากลักษณะที่มองเห็นจากโครโมโซมเครื่องหมายต่าง ๆ เช่น เซนโทรเมียร์ หรือรอยคอดที่หนึ่ง รอยคอดที่สองบนโครโมโซม และแถบสีบนโครโมโซม (Band) ประกอบด้วยค่า RL และค่า CI ซึ่งบ่งบอกขนาด และรูปร่างโครโมโซมว่าเป็นชนิดเมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก อะโครเซนทริก หรือเทโลเซนทริก ถ้ามีโครโมโซมเพียงสองชนิด คือ เมทาเซนทริก และซับเมทาเซนทริก จัดเป็นคาริโอไทป์แบบสมมาตร (Symmetric Karyotype) ถ้ามีโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกหรือเทโลเซนทริกอยู่ด้วย จัดเป็นคาริโอไทป์แบบไม่สมมาตร (Asymetric Karyotype) (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

3.3.3.1 เลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟส ที่มีขนาดของโครโมโซมไม่ยาวหรือสั้นเกินไป มีการกระจายที่ดีไม่ซ้อนทับกัน และนับจำนวนโครโมโซมได้ครบเท่ากับจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X เลือกมาจัดจำนวน ชนิดละ 10 เซลล์

3.3.3.2 ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยกำหนดตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ จากนั้นวัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาวค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง การวัดค่าความยาวของโครโมโซมอาจจะใช้วิธีการตัดโครโมโซมออกมาจากรูปถ่ายทีละแท่ง กำหนดหมายเลขให้โครโมโซมทุกแท่งก่อนการวัด เมื่อวัดความยาวเสร็จแล้วจึงจับคู่โครโมโซมที่มีความยาวของแขนแต่ละข้าง และความยาวทั้งแท่งที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด

3.3.3.3 การคำนวณหาค่า relative length (RL) คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$\text{ค่า relative length (RL)} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}{\text{ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมทุกแท่ง (}\sum\text{LT)}}$$

การใช้ค่า RL นี้สามารถช่วยในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซมเพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ในทุก ๆ เซลล์ ส่วนค่าความยาวของโครโมโซมจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละเซลล์

3.3.3.4 การคำนวณหาค่า Centromeric Index (CI) คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$\text{ค่า Centromeric Index (CI)} = \frac{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll)}}{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

นำค่า CI ที่ได้นำมาระบุชนิดของโครโมโซม โดยใช้เกณฑ์จำแนกตาม กันยา รัตน์ ไชยสุต (2532) ดังนี้

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.500–0.599 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.600–0.699 จัดเป็นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.700–0.899 จัดเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.900–1.000 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก

3.3.3.5 การกำหนดขนาดของโครโมโซม แบ่งขนาดของโครโมโซมออกเป็น 3 ขนาด โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุดเป็นโครโมโซมคู่สุดท้าย

โครโมโซมขนาดใหญ่ (Large=L) คือ โครโมโซมที่มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

ดังนั้น L >LT เฉลี่ยคู่ที่ 1 + LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย
2

โครโมโซมขนาดกลาง (Medium=M) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

ดังนั้น M < LT เฉลี่ยคู่ที่ 1 + LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย
2

โครโมโซมขนาดเล็ก (Small=S) ได้แก่ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุด

ดังนั้น S < LT เฉลี่ยคู่ที่ 1
2

3.3.3.6 จัดเรียงคาริโอไทป์ ให้เรียงตามชนิดโครโมโซมก่อน แล้วค่อยเรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้าย ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่างวางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง และนิยมวางแท่งโครโมโซมให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ตรงกัน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.3.4 การทำอิดิโอแกรมมาตรฐาน

อิดิโอแกรม คือ ไดอะแกรมแสดงคาริโอไทป์ ของโครโมโซม 1 ชุดแฮพลอยด์ ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ โดยใช้ข้อมูลค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซม รูปร่างของโครโมโซม และตำแหน่งเซนโทรเมียร์การทำอิดิโอแกรมจากเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาใช้เซลล์ระยะเมทาเฟสชนิดละ 10 เซลล์ นำมาจัดคาริโอไทป์ แล้ววัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาวและแขนโครโมโซมข้างสั้นของโครโมโซมทุกคู่ด้วยไม้บรรทัดเวอร์เนียร์ (vernier) จัดทำภาพวาดอิดิโอแกรมด้วยคอมพิวเตอร์ โดยการนำค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่มาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ให้แกนตั้ง (Y) เป็นความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ และแกนนอน (X) เป็นลำดับของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่เล็กที่สุด ยกเว้นโครโมโซมเพศจัดเป็นคู่สุดท้าย แล้วนำมาปรับรูปร่างของโครโมโซมโดยใช้โปรแกรม Microsoft Word หรือ Microsoft PowerPoint

บทที่ 4
ผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างปลา 2 ชนิด ในเขตพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม พบปลาวงศ์ Mastacembelidae 2 สกุล 2 ชนิด คือ ปลาหลดจุด (*Macrognathus siamensis*) และปลากระทิง (*Macrognathus armatus*)

4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกปลาบางชนิดในวงศ์ Mastacembelidae

4.1.1 ปลาหลด (*Macrognathus siamensis*)

ภาพที่ 4.1 ปลาหลด (*Macrognathus siamensis*),

ชื่อวิทยาศาสตร์	*(Macrognathus siamensis*)
วงศ์	Mastacembelidae
สกุล	*Macrognathus*
ชื่อสามัญ	Spiny eel

4.1.1.1 ลักษณะทั่วไป

ปลาหลดมีรูปร่างเพรียวยาว ลำตัวแบนข้าง หัวและตามีขนาดเล็ก มีจุดเด่นคือปากเล็กและมีจะงอยปากแหลมยาว โดยเฉลี่ยมีความยาวไม่เกิน 1 ฟุต และมีครีบหางแยกออกจากครีบหลัง

และครีบท้องชัดเจน ก้านครีบเดี่ยวของครีบหลังเป็นหนามสั้น ๆ ปลายแหลมประมาณ 12-31 ก้าน ปลายจะงอยปากที่จมูกคู่หน้าแยกออกเป็นติ่งเล็ก ๆ 4 หรือ 6 ติ่ง เกล็ดมีขนาดเล็กมาก

การศึกษาค่ามาตรฐานตามสัดส่วนพบว่า ค่าความยาวมาตรฐาน (Standard Length, SL) เฉลี่ยเท่ากับ 19.9±2.83 เซนติเมตร ความยาวเหยียด (Total Length, TL) เฉลี่ยเท่ากับ 20.67±2.12 เซนติเมตร ความลึก (Body depth,BD) เฉลี่ยเท่ากับ 2.67±0.41 เซนติเมตร ความยาวหัว (Head Length, HL) เฉลี่ยเท่ากับ 3.57±0.50 เซนติเมตร ความยาวจะงอยปาก (Snouthlength, SnL) เฉลี่ยเท่ากับ 1.37±0.40 เซนติเมตร ความกว้างของตา (Eydiameter, ED) เฉลี่ยเท่ากับ 0.17±0.08 เซนติเมตร ความยาวส่วนหน้าของครีบหลัง (Predorsal fin Height,PDFL) เฉลี่ยเท่ากับ 12.67±2.09 เซนติเมตร ความยาวของฐานครีบหลัง (Length of Dorsal Fin Base, LDFB) เฉลี่ยเท่ากับ 6.73±1.19 เซนติเมตร ความยาวครีบอก (Pectoral fin height, PFH) เฉลี่ยเท่ากับ 1.23±0.37 เซนติเมตร ความยาวของฐานครีบก้น (Length of Anal Fin Base, LAFB) เฉลี่ยเท่ากับ 7.02±1.61 เซนติเมตร ความยาวระหว่างจุดเริ่มต้นของครีบก้นถึงฐานของครีบหาง (Caudal Peduncle Length, PCL) เฉลี่ยเท่ากับ 0.17±1.61 เซนติเมตร ความยาวของครีบหาง (Caudal Fin Length, CFL) เฉลี่ยเท่ากับ 1.18±0.29 เซนติเมตร

4.1.2 ปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.2 ปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *(Mastacembelus armatus)*

วงศ์ Mastacembelidae

สกุล Mastacembelus

ชื่อสามัญ Zig-zag eel

4.1.2.1 ลักษณะทั่วไป

มีลำตัวเรียวยาว แบนข้างเล็กน้อย ครีบหลัง ครีบหาง และครีบก้นเชื่อมต่อกัน ด้านหลังมีก้านครีบแข็งสั้นหลายอัน ตาเล็กครีบอกใหญ่ หัวมีลายตั้งแต่ปลายจะงอยปากคาดมาที่ตา ถึงช่องปิดเหงือก ตัวมีสีเทาอ่อนหรือน้ำตาลอมเหลือง มีลายสีคล้ำเป็นวงหรือเป็นลายเส้น มีลวดลายหลากหลายแบบ ด้านท้องสีจางครีบคล้ำ มีจุดปะสีเหลืองอ่อน

การศึกษาค่ามาตรฐานตามสัดส่วนพบว่า ค่าความยาวมาตรฐาน (Standard Length, SL) เฉลี่ยเท่ากับ 31.3±5.15 เซนติเมตร ความยาวเหยียด (Total Length, TL) เฉลี่ยเท่ากับ 32.47±5.27 เซนติเมตร ความลึก (Body Depth, BD) เฉลี่ยเท่ากับ 3.33±0.26 เซนติเมตร ความยาวหัว (Head Length, HL) เฉลี่ยเท่ากับ 4.87±0.88 เซนติเมตร ความยาวจะงอยปาก (Snouth Length, SnL) เฉลี่ยเท่ากับ 2.25±0.27 เซนติเมตร ความกว้างของตา (Eydiameter, ED) เฉลี่ยเท่ากับ 0.35±0.16 เซนติเมตร ความยาวส่วนหน้าของครีบหลัง (Predorsal fin height, PDFL) เฉลี่ยเท่ากับ 20.78±3.20 เซนติเมตร ความยาวของฐานครีบหลัง (Length of Dorsal Fin Base, LDFB) เฉลี่ยเท่ากับ 10.67±1.21 เซนติเมตร ความยาวครีบอก (Pectoral Fin Height, PFH) เฉลี่ยเท่ากับ 1.47±0.26 เซนติเมตร ความยาวของฐานครีบก้น (Length of anal fin base, LAFB) เฉลี่ยเท่ากับ 10.75±1.08 เซนติเมตร ความยาวระหว่างจุดเริ่มต้นของครีบก้นถึงฐานของครีบหาง (Caudal Peduncle Length, PCL) เฉลี่ยเท่ากับ 0±0 เซนติเมตร ความยาวของครีบหาง (Caudal Fin Length, CFL) เฉลี่ยเท่ากับ 1.47±0.64 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

4.2 ผลการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาหลดและปลากระทิง โดยวิธีการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแบบนอร์

4.2.1 การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาหลด

จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ระยะเมตาเฟสจำนวน 50 เซลล์ของปลาหลด พบว่ามีโครโมโซมกระจายอยู่ระหว่าง 2n = 45 – 50 แท่ง จำนวนซ้ำของการกระจายตัวของโครโมโซมที่พบมากที่สุด คือ 2n = 48 แท่ง พบจำนวน 38 เซลล์ ดังตารางที่ 4.1

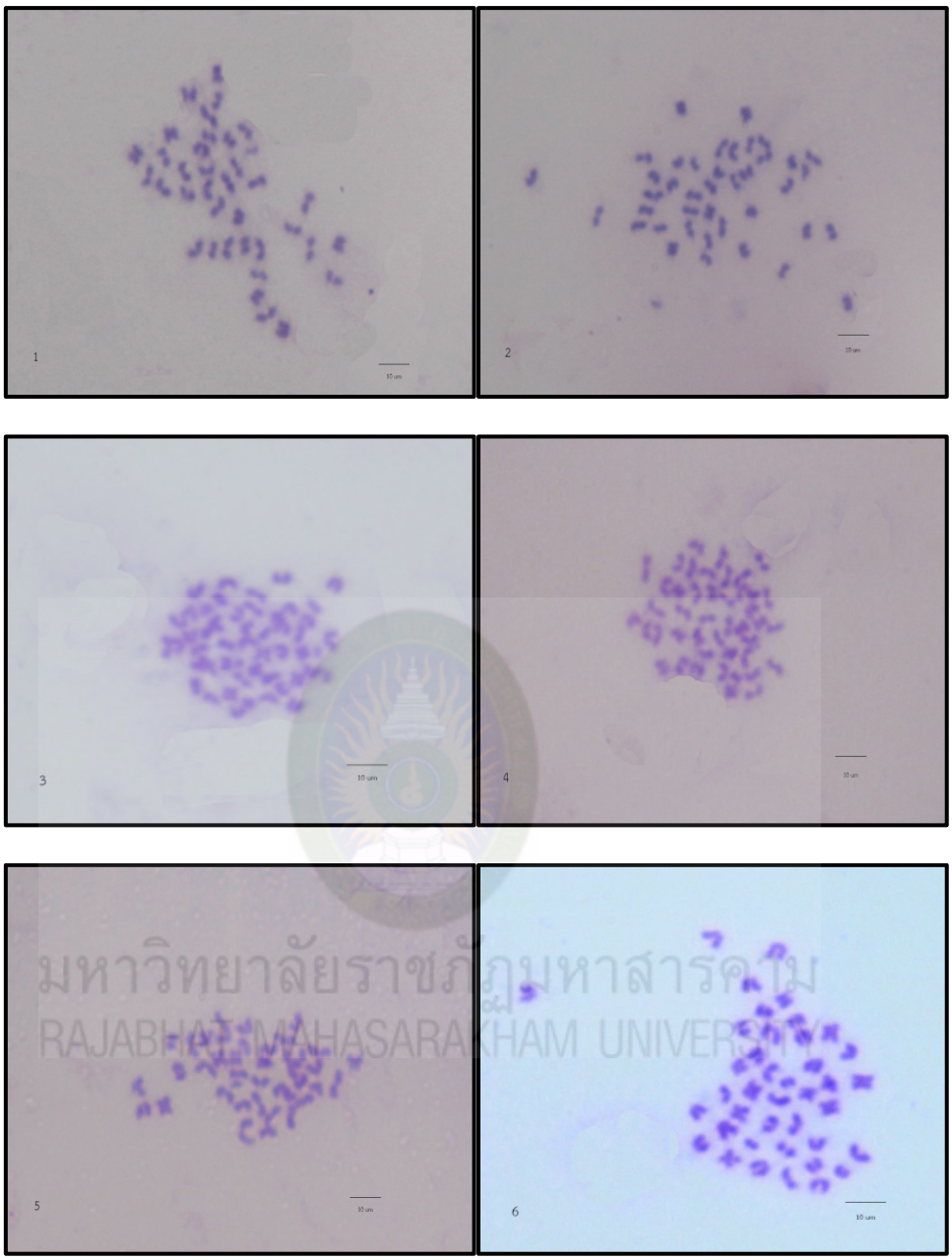
ตารางที่ 4.1

ความถี่ในการกระจายตัวของโครโมโซมระยะเมตาเฟสของปลาหลดจุด Macrognathus siamensis ทั้งหมด 50 เซลล์

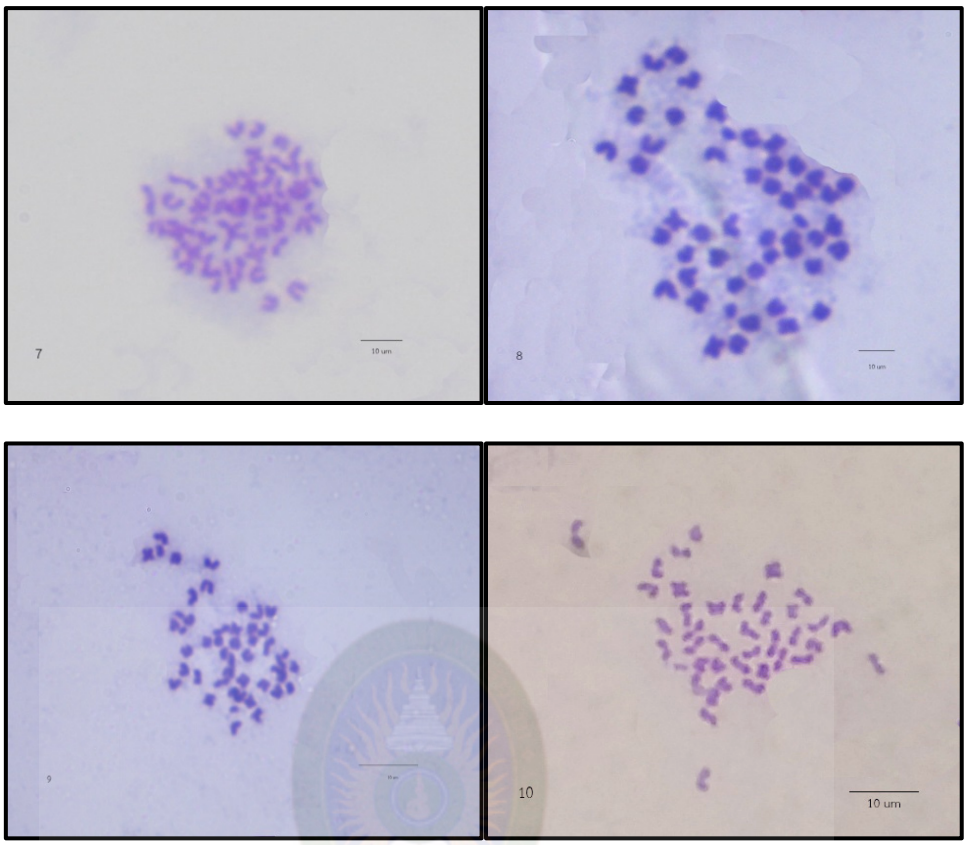
จำนวนโครโมโซม (แท่ง)	จำนวนเซลล์ (เซลล์)
45	1
46	5
47	3
48	38
49	2
50	1

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าโครโมโซมมีการกระจายตัวดี ดังภาพที่ 4.3



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ 4.3 ภาพที่ 1 – 10 เซลล์ในระยะเมตาเฟสโครโมโซมของปลาหลด ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดาและแบบนอร์ที่มีการกระจายตัวดี จำนวน 10 เซลล์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

4.2.2 การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลากระทิง

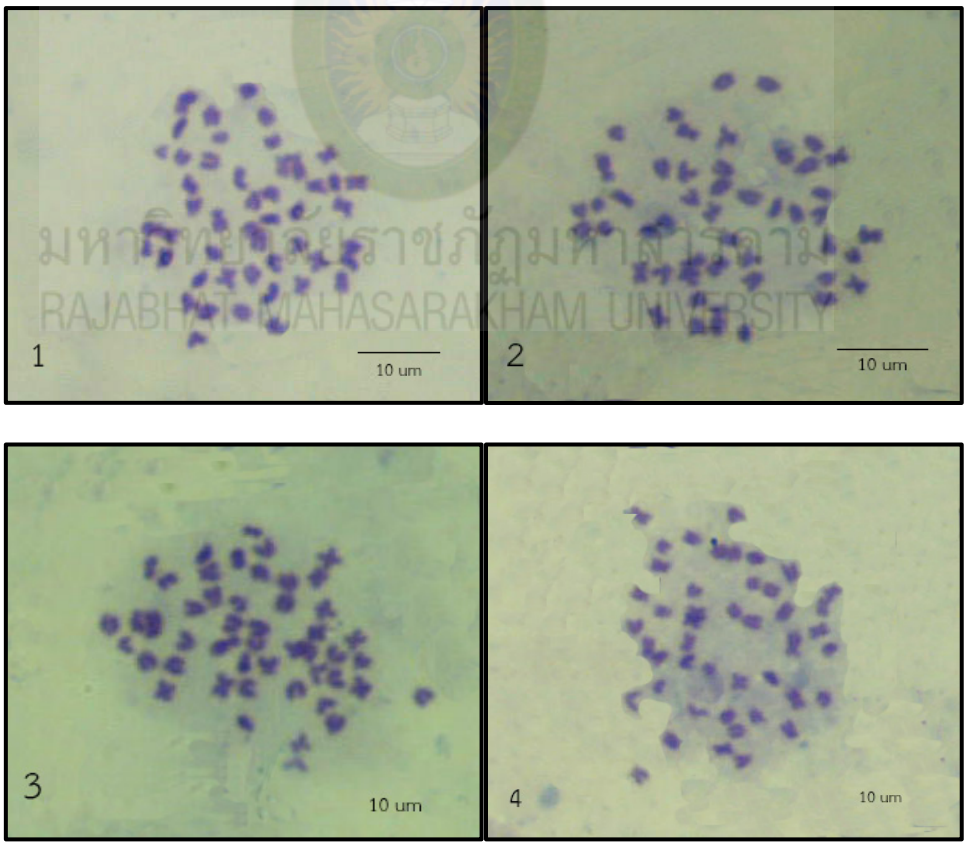
จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ระยะเมตาเฟสจำนวน 50 เซลล์ของปลากระทิง พบว่ามีโครโมโซมกระจายอยู่ระหว่าง 2n = 45 – 50 แท่ง จำนวนซ้ำของการกระจายตัวของโครโมโซมที่พบมากที่สุด คือ 2n = 48 แท่ง พบจำนวน 40 เซลล์ ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2

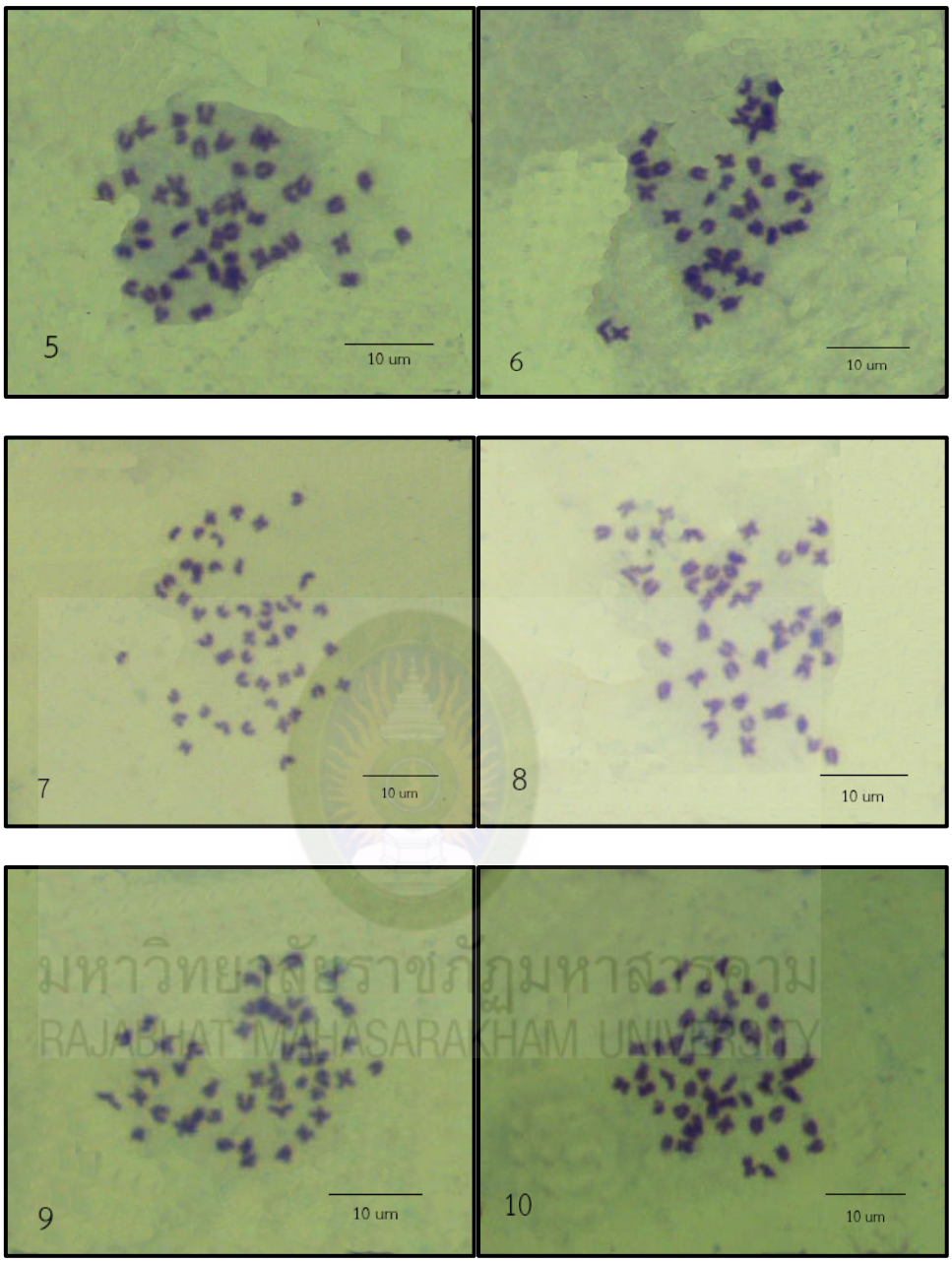
ความถี่ในการกระจายตัวของโครโมโซมระยะเมตาเฟสของปลากระทิง (Mastacembelus armatus) ทั้งหมด 50 เซลล์

จำนวนโครโมโซม (แท่ง)	จำนวนเซลล์ (เซลล์)
45	0
46	3
47	2
48	40
49	3
50	2

เมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าโครโมโซมมีการกระจายตัวดี ดังภาพที่ 4.4



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ 4.4 ภาพที่ 1 – 10 เซลล์ในระยะเมตาเฟสโครโมโซมของปลากระทิง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดาและแบบนอร์ที่มีการกระจายตัวดี จำนวน 10 เซลล์

4.3 ผลการศึกษาคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานของปลาหลดจุด และปลากระทิง

จากการนำค่าที่จากการวัดความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง และการจัดจำแนกชนิดของโครโมโซมโดยยึดค่า Centrometric index (CI) ทำให้สามารถจัดทำคาริโอไทป์ของปลาในวงศ์ปลากระทิง จากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแบบนอร์ ได้ผลการศึกษาดังนี้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.3

ค่าเฉลี่ยความยาวแขนของโครโมโซมข้างยาว (Ll) แขนของโครโมโซมข้างสั้น (Ls) ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (Lt) ค่า centromeric index (CI) และค่า relative length (RL) ของปลาหลด (Macrognathus siamensis, 2n = 48) ทั้งหมด 10 เซลล์

คู่ที่	LS	Ll	LT	RL	CI	ขนาดของโครโมโซม	ชนิดของโครโมโซม
1	0.47	0.50	0.97	0.079	0.515	L	Metacentric
2	0.46	0.50	0.96	0.078	0.520	L	Metacentric
3	0.45	0.49	0.94	0.076	0.521	L	Metacentric
4	0.44	0.48	0.93	0.075	0.516	L	Metacentric
5	0.35	0.46	0.81	0.066	0.567	L	Subtelocentric
6	0	0.44	0.44	0.035	1.000	M	Telocentric
7	0	0.44	0.44	0.035	1.000	M	Telocentric
8	0	0.44	0.44	0.035	1.000	M	Telocentric
9	0	0.43	0.43	0.035	1.000	M	Telocentric
10	0	0.43	0.43	0.035	1.000	M	Telocentric
11	0	0.42	0.42	0.034	1.000	M	Telocentric
12	0	0.42	0.42	0.034	1.000	M	Telocentric
13	0	0.41	0.41	0.033	1.000	M	Telocentric
14	0	0.41	0.41	0.033	1.000	M	Telocentric
15	0	0.41	0.41	0.033	1.000	M	Telocentric
16	0	0.40	0.40	0.032	1.000	M	Telocentric
17	0	0.40	0.40	0.032	1.000	M	Telocentric
18	0	0.39	0.39	0.031	1.000	M	Telocentric
19	0	0.39	0.39	0.031	1.000	M	Telocentric

(ต่อ)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

คู่ที่	LS	Ll	LT	RL	CI	ขนาดของโครโมโซม	ชนิดของโครโมโซม
20	0	0.37	0.37	0.030	1.000	M	Telocentric
21	0	0.37	0.37	0.030	1.000	M	Telocentric
22	0	0.36	0.36	0.029	1.000	M	Telocentric
23	0	0.36	0.36	0.029	1.000	M	Telocentric
24	0	0.36	0.36	0.029	1.000	M	Telocentric

4.3.1 จำนวนโครโมโซมของปลาหลดจุด

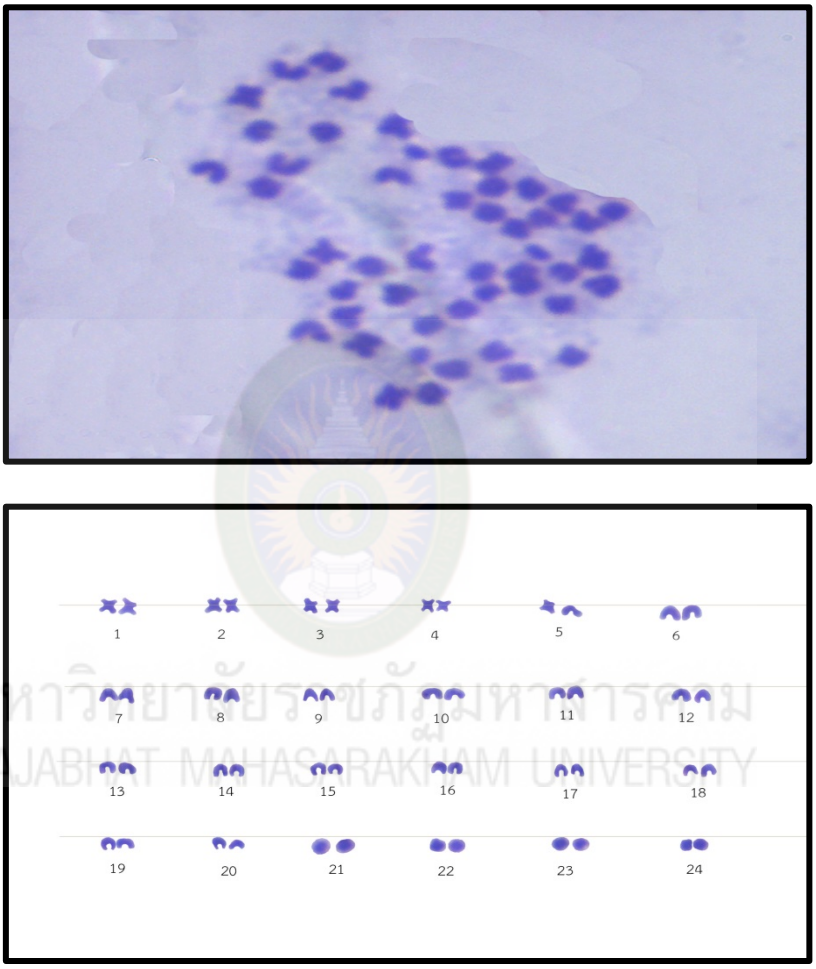
ปลาหลดจุดมีจำนวนโครโมโซม 2n = 48 แท่ง แบ่งเป็น 2 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ (L) ขนาดกลาง (M) ซึ่งโครโมโซมขนาดใหญ่มีค่าความยาวมากกว่า 0.45 โครโมโซมขนาดกลางมีค่าความยาวอยู่ระหว่าง 0.36 – 0.45 ดังตารางที่ 4.3

โครโมโซมดิพลอยด์ (2n) ของปลาหลดจุดประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริก 8 แท่ง สับเทโรเซนตริก 2 แท่ง และแบบอะโครเซนตริก 38 แท่ง คาริโอไทป์ และอิดิโอแกรมของปลาหลดจุดจากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแบบนอร์ ได้ข้อมูลดังภาพที่ 4.5 และภาพที่ 4.6

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สูตรคาริโอไทป์ดังนี้

$$2n\ (48) = L^{M}_{8} + L^{sm}_{2} + M^{t}_{38}$$



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.5 เซลล์ระยะเมทาเฟส และคาริโอไทป์ของปลาหลดจุด (*Macrognathus siamensis*) 2n = 48) โดยวิธีการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.6 อิดิโอแกรมของปลาหลดจุด (*Macrognathus siamensis*)

4.3.2 คาริโอไทป์และอิดิโอแกรมของปลากระทิง

ปลากระทิงมีจำนวนโครโมโซม 2n = 48 แท่ง แบ่งเป็น 2 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ (L) ขนาดกลาง (M) ซึ่งโครโมโซมขนาดใหญ่มีค่าความยาวมากกว่า 0.56 โครโมโซมขนาดกลางมีค่าความยาวอยู่ระหว่าง 0.39 – 0.56 ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4

ค่าเฉลี่ยความยาวแขนของโครโมโซมข้างยาว (Ll) แขนของโครโมโซมข้างสั้น (Ls) ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (Lt) ค่า centromeric index (CI) และค่า relative length (RL) ของปลากระทิง (Mastacembelus armatus, 2n = 48) ทั้งหมด 10 เซลล์

คู่ที่	LS	Ll	LT	RL	CI	ขนาดของโครโมโซม	ชนิดของโครโมโซม
1	0.56	0.59	1.15	0.073	0.513	L	Metacentric
2	0.55	0.59	1.14	0.073	0.517	L	Metacentric
3	053	0.58	1.11	0.071	0.522	L	Metacentric
4	0.50	0.58	1.08	0.069	0.537	L	Metacentric
5	0.48	0.57	1.05	0.067	0.542	L	Metacentric
6	0.45	0.57	1.02	0.065	0.558	L	Metacentric
7	0.36	0.57	0.93	0.059	0.612	L	Submetacentric
8	0.25	0.56	0.86	0.036	0.651	M	SubTelocentric
9	0.21	0.56	0.77	0.036	0.727	M	SubTelocentric
10	0	0.55	0.55	0.035	1	M	Telocentric
11	0	0.55	0.55	0.035	1	M	Telocentric
12	0	0.54	0.54	0.034	1	M	Telocentric
13	0	0.54	0.54	0.034	1	M	Telocentric
14	0	0.53	0.53	0.034	1	M	Telocentric
15	0	0.53	0.53	0.034	1	M	Telocentric

(ต่อ)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

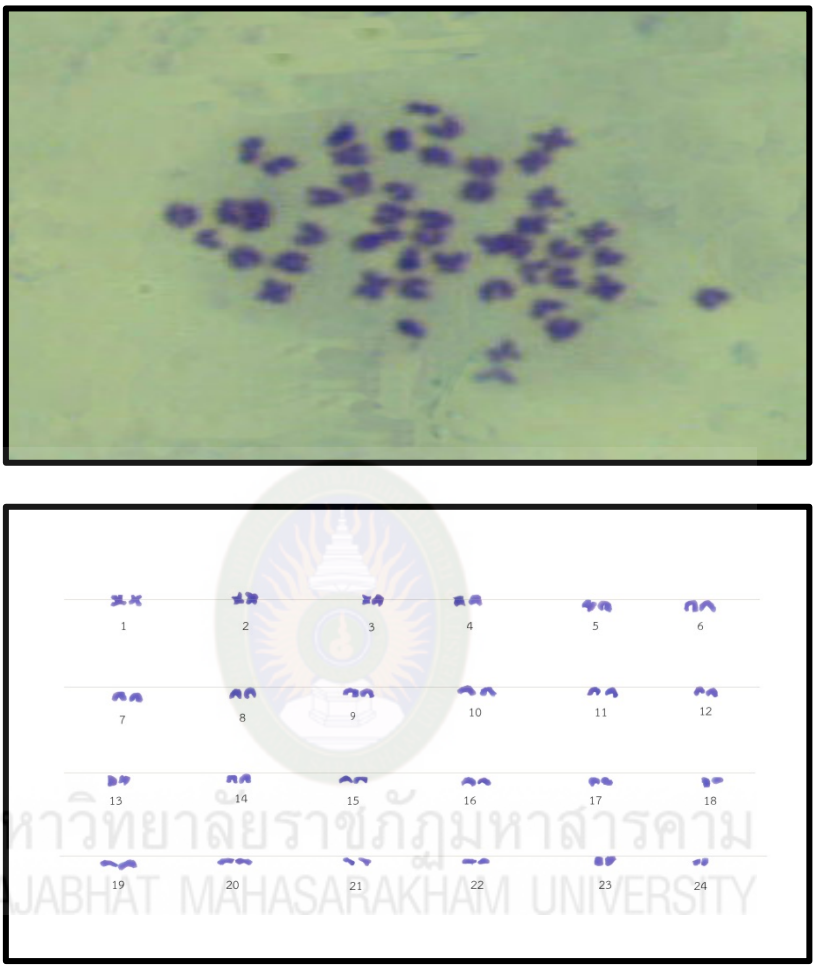
คู่ที่	LS	Ll	LT	RL	CI	ขนาดของโครโมโซม	ชนิดของโครโมโซม
16	0	0.43	0.43	0.027	1	M	Telocentric
17	0	0.43	0.43	0.027	1	M	Telocentric
18	0	0.43	0.43	0.027	1	M	Telocentric
19	0	0.42	0.42	0.027	1	M	Telocentric
20	0	0.42	0.42	0.027	1	M	Telocentric
21	0	0.40	0.40	0.025	1	M	Telocentric
22	0	0.40	0.40	0.025	1	M	Telocentric
23	0	0.39	0.39	0.025	1	M	Telocentric
24	0	0.39	0.39	0.025	1	M	Telocentric

โครโมโซมดิพลอยด์ (2n) ของปลากระทิงประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริก 12 แท่ง สับเมทาเซนตริก 2 แท่ง สับเทโลเซนตริก 4 แท่ง และแบบเทโลเซนตริก 30 แท่ง คาริโอไทป์ และอิดิโอแกรมของปลากระทิง จากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแบบนอร์ ได้ข้อมูลดังภาพที่ 4.7 และภาพที่ 4.8

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

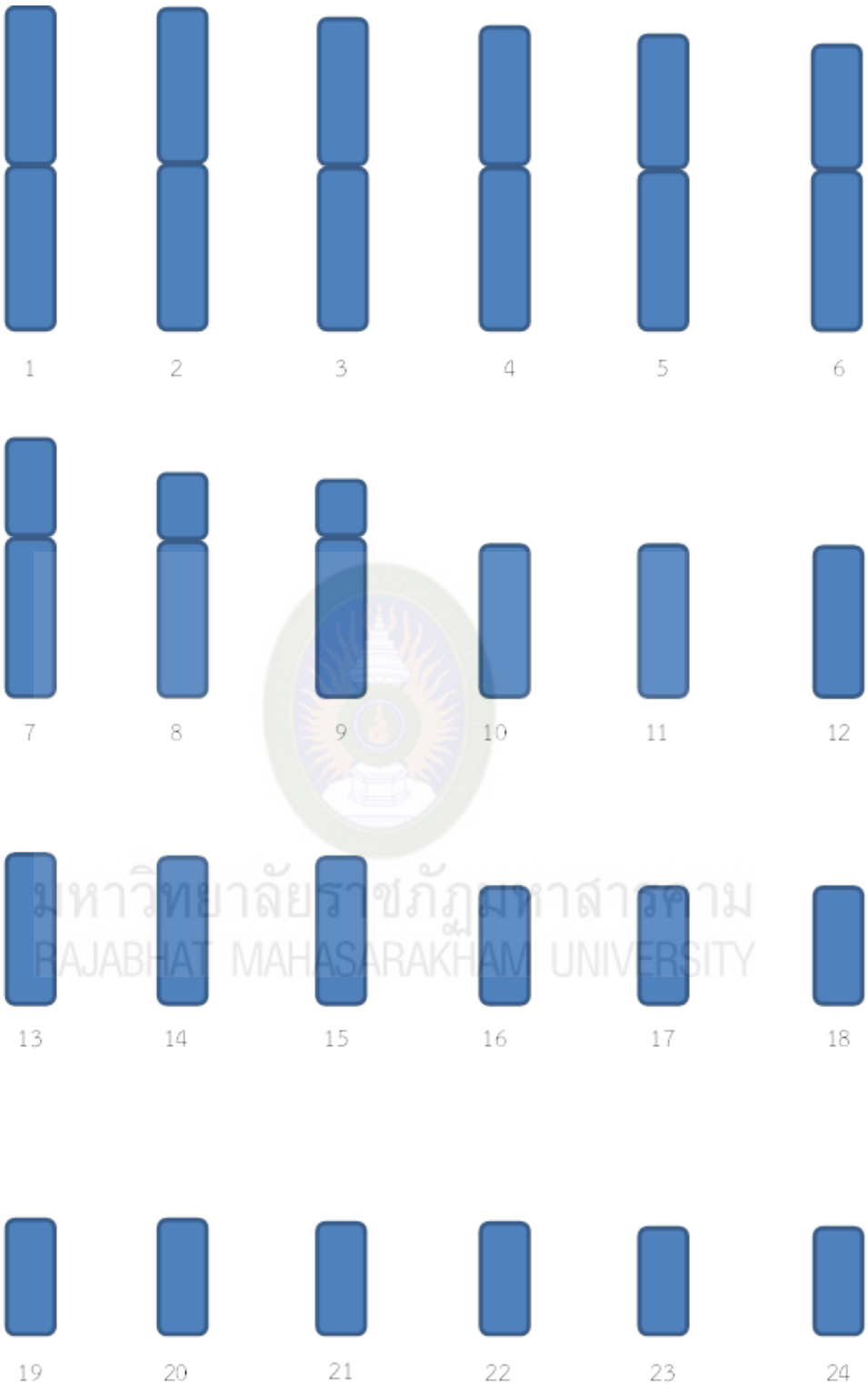
สูตรคาริโอไทป์ดังนี้

$$2n\ (48) = L^{m}_{12} + L^{sm}_{2} + M^{st}_{4} + M^{t}_{30}$$



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.7 เซลล์ระยะเมทาเฟส และคาริโอไทป์ของปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*) 2n = 48) โดยวิธีการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.8 อิดิโอแกรมของปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการเก็บตัวอย่างปลา 2 ชนิดจากในเขตจังหวัดมหาสารคาม ปลาที่เก็บตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาในครั้งนี้ คือ ปลาหลดจุด (*Macrognathus siamensis*) และปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*) ศึกษาลักษณะสัณฐานภายนอก และศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ พบว่า

5.1.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของปลาทั้ง 2 ชนิด พบว่า ปลาหลดจุด มีรูปร่างเพรียวยาว ลำตัวแบนข้าง หัวและตามีขนาดเล็กจุดเด่นคือ ปากเล็กและมีจะงอยปากแหลมยาว มีครีบหางแยกออกจากครีบหลังและครีบท้องอย่างชัดเจน ก้านครีบเดี่ยวของครีบท้องเป็นหนามแหลมสั้นปลายแหลมมีประมาณ 12 - 31 ก้าน และเกล็ดมีขนาดเล็ก ปลากระทิงมีลำตัวเรียวยาว แบนข้างเล็กน้อย ครีบหลัง ครีบหาง และครีบก้นเชื่อมติดกัน ด้านหลังมีก้านครีบแข็งสั้นหลายอัน ตาเล็ก ครีบอกใหญ่ หัวมีลายตั้งแต่ปลายจะงอยปากคาดมาที่ตาถึงช่องปิดเหงือก ตัวมีสีน้ำตาลอมเหลืองหรือสีเทาอ่อน มีลายสีคล้ำเป็นวงศ์หรือเป็นลายเส้น มีลวดลายหลายแบบ ด้านท้องสีจาง ครีบคล้ำมีจุดสีเหลืองอ่อน มีขนาดประมาณ 30-50 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 5.1

ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของปลาหลดจุดและปลากระทิง

ชนิด	ลักษณะสำคัญ	รูปภาพ
1. ปลาหลดจุด (*Macrognathus siamensis*)	ปลาหลดจุด มีรูปร่างเพรียวยาว ลำตัวแบนข้าง หัวและตามีขนาดเล็กจุดเด่นคือ ปากเล็กและมรจะงอยปากแหลมยาว มีครีบหางแยกออกจากครีบหลังและครีบท้องอย่างชัดเจน ก้านครีบเดี่ยวของครีบท้องเป็นหนามแหลมสั้นปลายแหลม และเกล็ดมีขนาดเล็ก	

(ต่อ)

ตารางที่ 5.1 (ต่อ)

ชนิด	ลักษณะสำคัญ	รูปภาพ
2. ปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*)	ปลากระทิงมีลำตัวเรียวยาว แบนข้างเล็กน้อย ครีบหลัง ครีบหาง และครีบก้นเชื่อมติดกัน ด้านหลังมีก้านครีบแข็งสั้นหลายอัน ตาเล็ก ครีบอกใหญ่ หัวมีลายตั้งแต่ปลายจะงอยปากคาดมาที่ตาถึงช่องปิดเหงือก ตัวมีสีน้ำตาลอมเหลืองหรือสีเทาอ่อน มีลายสีคล้ำเป็นวงศ์หรือเป็นลายเส้น มีลวดลายหลายแบบ ด้านท้องสีจาง ครีบคล้ำมีจุดสีเหลืองออ่อน	

5.1.2 การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์

จากการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลากระทิง ในจังหวัดมหาสารคาม 2 ชนิด ได้แก่ ปลาหลดจุด (*Macrognathus siamensis*) ปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*) ชนิดละ 30 ตัวที่ทำมาใช้ในการศึกษามีความยาวมาตรฐาน 15.2 – 20.0 ซม. และ 24.0 – 35.0 ซม. โดยเตรียมโครโมโซมวิธีตรงจากเนื้อเยื่อไตและเหงือก ย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา และแบบนอร์ (NOR Banding) การเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาดัดแปลงจากวิธีของ (Chen and Ebeling, 1968 และ Nanda et al., 1995) พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 48 ดังตารางที่ 5.2

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 5.2

จำนวน ชนิด และขนาดโครโมโซมของปลาวงศ์ปลากระทิง

ชนิดของปลา	2n	NF	โครโมโซม											
			L				M				S			
			m	sm	st	t	m	sm	st	t	m	sm	st	t
ปลาหลดจุด	48		8	-	2	-	-	-	-	38	-	-	-	-
ปลากระทิง	48		12	2	-	-	-	-	4	30	-	-	-	-

หมายเหตุ. NF = fundamental number ; 2n = diploid number ; L = large chromosome ; M = medium chromosome ; S = small chromosome ; m = metacentric chromosome ; sm = submetacentric chromosome ; st = subtelocentric chromosome ; t = telocentric chromosome.

จากการศึกษาคาริโอไทป์ของปลาทั้ง 2 ชนิดพบว่าปลาหลดจุด มีโครโมโซมแบบดิพลอยด์2n=48 ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 4 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 1 คู่ และแบบทีโลเซนตริก 19 คู่ สูตรคาริโอไทป์คือ 2n (48) = $L^{m}_{8} + L^{st}_{2} + M^{t}_{38}$ ปลากระทิง มีโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n=48 ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 6 คู่ แบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 2 คู่ และแบบทีโลเซนตริก 15 คู่ สูตรคาริโอไทป์คือ 2n (48) = $L^{m}_{12} + L^{sm}_{2} + M^{st}_{4} + M^{t}_{30}$

5.2 อภิปรายผล

5.2.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอก

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของปลาวงศ์ปลากระทิง ในจังหวัดมหาสารคาม 2 ชนิด ได้แก่ ปลาหลดจุด (*Macrognathus siamensis*) ปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*) ชนิดละ 30 ตัวที่นำมาใช้ในการศึกษามีความยาวมาตรฐาน 15.2 – 20.0 ซม. และ 24.0 – 35.0 ซม. มีลักษณะโดยรวมดังนี้ ปลาหลดจุด มีรูปร่างเพรียวยาว ลำตัวแบนข้าง หัวและตามีขนาดเล็กจุดเด่นคือ ปากเล็กและมรจะงอยปากแหลมยาว มีครีบหางแยกออกจากครีบหลังและครีบท้องอย่างชัดเจน

ก้านครีบเดี่ยวของครีบท้องเป็นหนามแหลมสั้นปลายแหลม และเกล็ดมีขนาดเล็ก ส่วนปลากระทิงมีลำตัวเรียวยาว แบนข้างเล็กน้อย ครีบหลัง ครีบหาง และครีบก้นเชื่อมติดกัน ด้านหลังมีก้านครีบแข็งสั้นหลายอัน ตาเล็ก ครีบอกใหญ่ หัวมีลายตั้งแต่ปลายจะงอยปากคาดมาที่ตาถึงช่องปิดเหงือก ตัวมีสีน้ำตาลอมเหลืองหรือสีเทาอ่อน มีลายสีคล้ำเป็นวงศ์หรือเป็นลายเส้น มีลวดลายหลายแบบ ด้านท้องสีจาง ครีบคล้ำมีจุดสีเหลืองอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์ (2547) รายงานว่า ปลาในวงศ์ปลากระทิง มีรูปร่างคล้ายปลาไหล ตาเล็กปากเล็ก ครีบอก ครีบหลัง และครีบหางเล็ก ด้านหลังมีก้านครีบแข็งสั้นแหลมคม

5.2.2 การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์

จากการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลากระทิง ในจังหวัดมหาสารคาม 2 ชนิด ได้แก่ ปลาหลดจุด (*Macrognathus siamensis*) ปลากระทิง (*Mastacembelus armatus*) ชนิดละ 30 ตัวที่ทำมาใช้ในการศึกษามีความยาวมาตรฐาน 15.2 – 20.0 ซม. และ 24.0 – 35.0 ซม. โดยเตรียมโครโมโซมวิธีตรงจากเนื้อเยื่อไตกับเหงือก ย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา และแบบนอร์ (NOR Banding) การเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาดัดแปลงจากวิธีของ Chen and Ebeling (1968) และ Nanda, et al. (1995) พบว่าปลาหลดจุด มีจำนวนโครโมโซม 2n = 48 คาริโอไทป์ประกอบด้วย โครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 4 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก1 คู่ และแบบทีโลเซนตริก 19 คู่ และปลากระทิง มีโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n=48 ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 6 คู่ แบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 2 คู่ และแบบทีโลเซนตริก 15 คู่สอดคล้องกับการศึกษาของ ธวัช ดอนสกุล และคณะ (2532) พบว่า ปลากระทิงมีโครโมโซม 2n = 48 คาริโอไทป์ประกอบด้วย โครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 5 คู่ แบบสับเมตาเซนตริก 2 คู่ แบบสับทีโลเซนตริก 2 คู่ และแบบอะโครเซนตริก 15 คู่ และในต่างประเทศมีการศึกษาในปลาหลด *(Rhynchobdella aculeate)* ซึ่งพบว่ามีโครโมโซม 2n = 48 คาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบอะโครเซนตริกทั้ง 24 คู่ (Kaur and Srivastava, 1965) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลทางด้านเซลล์อนุกรมวิธาน (Cytotaxonomy) แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางด้านวิวัฒนาการ เป็นข้อมูลในการปรับปรุง สายพันธุ์ และข้อมูลทางด้านพันธุวิศวกรรมต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของปลาวงศ์ปลากระทิงในครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา

5.3.2 ควรศึกษาวิธีย้อมสีโครโมโซมหลายวิธี เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของโครโมโซมในแต่ละวิธี

5.3.3 สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลทางด้านเซลล์อนุกรมวิธาน (Cytotaxonomy) แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางด้านวิวัฒนาการเป็นข้อมูลในการปรับปรุงสายพันธุ์ และข้อมูลทางด้านพันธุวิศวกรรมต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บรรณานุกรม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บรรณานุกรม

กรมประมง. (2535). *ปลากระทิง.* สืบค้นจาก http://www.fisheries.go.th/if-korat/images/downloads/krating

กันยารัตน์ ไชยสูต. (2532). *เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล Zephyranthes.* กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

กิตติยา ศิลาวงศ์ และคณะ. (2554). พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลากราย (Family Notoperidae) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. *วารสารบัณฑิตวิทยาลัยพิชญทรรศน์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี,* 6(2).

จารึก นาชัยเพิ่ม และคณะ. (2549). *โครงสร้างและการแพร่กระจายของประชาคมปลาในอ่างเก็บน้ำเขื่ออุบลรัตน์.* กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง.

ชวลิต วิทยานนท์. (2544). *คู่มือปลาน้ำจืดไทย.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์สารคดี.

ชวลิต วิทยานนท์. (2548). *คู่มือปลาน้ำจืด.* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สารคดี.

ธวัช ดอนสกุล และคณะ. (2532). *การศึกษาโครโมโซมของปลากระทิง และปลากระทิงไฟ ที่พบในประเทศไทย.* ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 15. (น.356-357). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ธวัช ดอนสกุล และคณะ. (2535). *ศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของปลาหลดจุด ปลาหลดภูเขา ปลาหลด และปลากระทิงดำที่พบในประเทศไทย.* ใน การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 30. (น. 621-630). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธวัช ดอนสกุลและคณะ. (2555). *ศึกษาคาริโอไทป์ของปลาฝักพร้า มอน กาแดงแม่น้ำมูล น้ำหมึก และแตปแก้วที่พบในประเทศไทย.* ใน การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 50. (น. 439-446). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรรณภา กสิฤกษ์. (2559). *พันธุศาสตร์เซลล์และพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาวงศ์อมไข่ (Family Apogonidae).* (ดุษฎีนิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต). ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.

วีระยุทธ สุภิวงค์. (2553). *พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาช่อน (Family Channidae) 4 ชนิด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย.* (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดร้อยเอ็ด. (มมป.) *ปลาหลดจุด.* สืบค้นจาก http://www.fisheries.go.th/if-roiet/images/stories/FishDepartment/datalod.

สุภาพร สุกสีหลือง. (2542). *มีนวิทยา: ICHTHYOLOGY.* กรุงเทพฯ: พิมพ์ดี จำกัด.

อมรา คัมภิรานนท์. (2546). *พันธุศาสตร์ของเซลล์.* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Chen, T. R. and Ehbeling, A. W. (1968). Karyological Evidence of Female Heterogamety in the Mosquito Fish. *Gambusia Affinis Copeia,* 1, 70-75.

Chen, Y.l, Zheng C., Wang, Y.Y., and Wu, W.S. (2007). Karyotype and C-banding of *Trichogastertrichopterus*sumatranus. China: College of Life Sciences, Fujian Normal University.

Fischer, W. and Whitehead, P.J.P. (1974). *FAO species identification sheets for fishery purposes.* Rome: Eastern Indian Ocean and Western Central Pacific.

Kaur, D. and Srivastava, M.D.L. (1965). The structure and behavior of chromosome in five fresh-water teleosts. *Carynologia*, 18 (2), 181.

Nanda, I., Schsrtl, M., Fiechtinger, W., Schlupp, I., Parzefall, J. and Schmid, M. (1995). Chromosomal evidence for laboratory synthesis of triploid hybrid between the gynogenetic teleost Poecilia Formosa and its host species. Journal of Fish Biology, 47, 619-623.

Turpin, R. and Lejeune, J. (1965). *Les chromosome humains.* Gauthier-Villars: Cornell University.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การเตรียมอุปกรณ์และสารเคมี

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือผ่าตัด
2.สไลด์ (Slide)
3.อุปกรณ์เครื่องแก้ว
4.จานเพาะเชื้อ (Petridish)
5.หลอดหยด
6.หลอดเซนตริฟิวซ์(Centrifuge tube)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. เตรียมโคลชิซิน0.05% เตรียมจากโคลชิซินผง 0.005 กรัมละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชา หรือหุ้มด้วยกระดาษอะลูมิเนียม เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน
2. เตรียมโพแทสเซียมคลอไรด์0.075 M โดยชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์0.5588 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สามารถเก็บไว้ใช้งานได้ 1- 2 สัปดาห์
3. น้ำยา Fixative ประกอบด้วย acetic acid เข้มข้น กับ absolute methanol ในอัตราส่วน 1:3 เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้เสมอ และใช้ในขณะที่เย็นจัดเท่านั้น
4. Phosphate buffer (pH 8.4)
   Stock A : KH_2HPO_4 9.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
   Stock B : KH_2HPO_4 9.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
   Working solution :ผสม Stock A : Stock B = 50.8 : 49.2 มิลลิลิตร
5. สี Giemsaเตรียมจากผงสี Giemsa0.75 กรัม ละลายใน Glycerol บริสุทธิ์ 25 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน เติม absolute methanol50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สีย้อม ผสมสีGiemsa: Working solution phosphate buffer 1 : 4 ส่วน ใช้ย้อมโครโมโซม

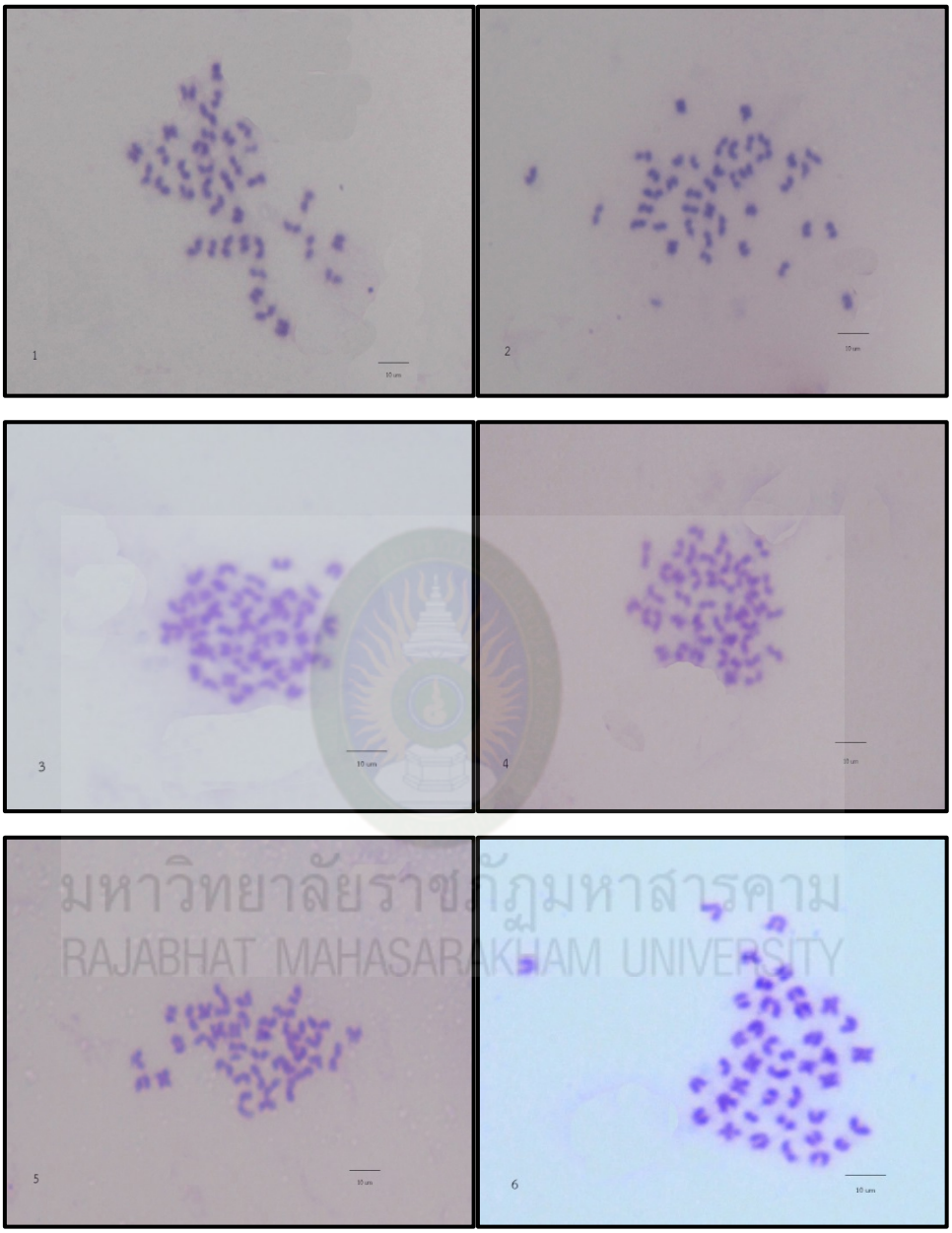
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

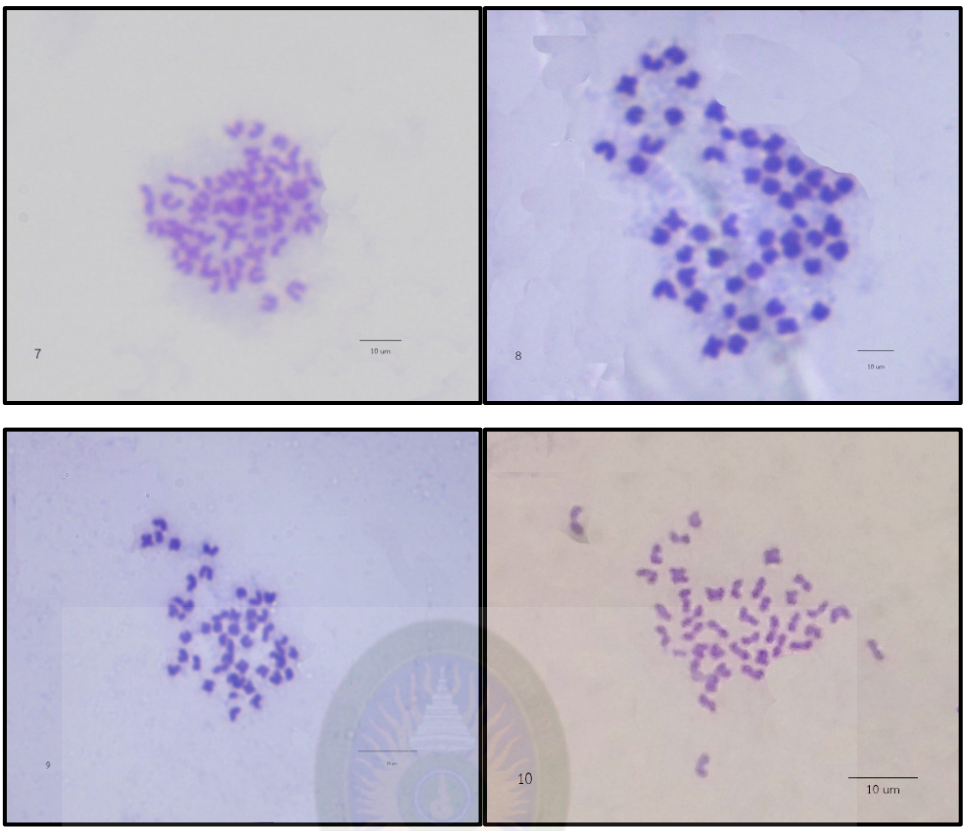
ภาพเมทาเฟสโครโมโซมของ ปลาหลดและปลากระทิง ชนิดละ 10 เซลล์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพเซลล์ระยะเมทาเฟสของปลาหลด *Macrognathus siamensis* ด้วยวิธีการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา

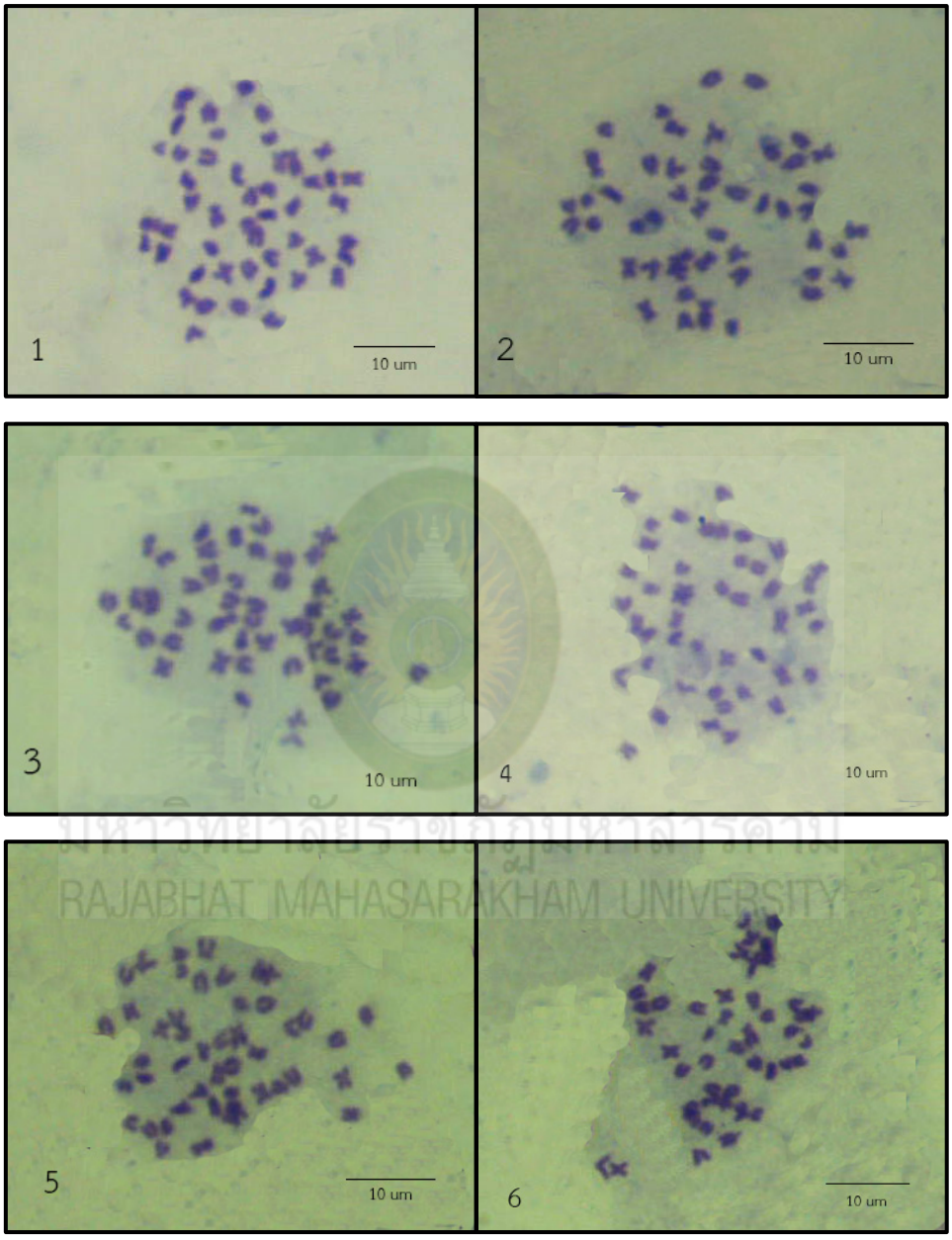


มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

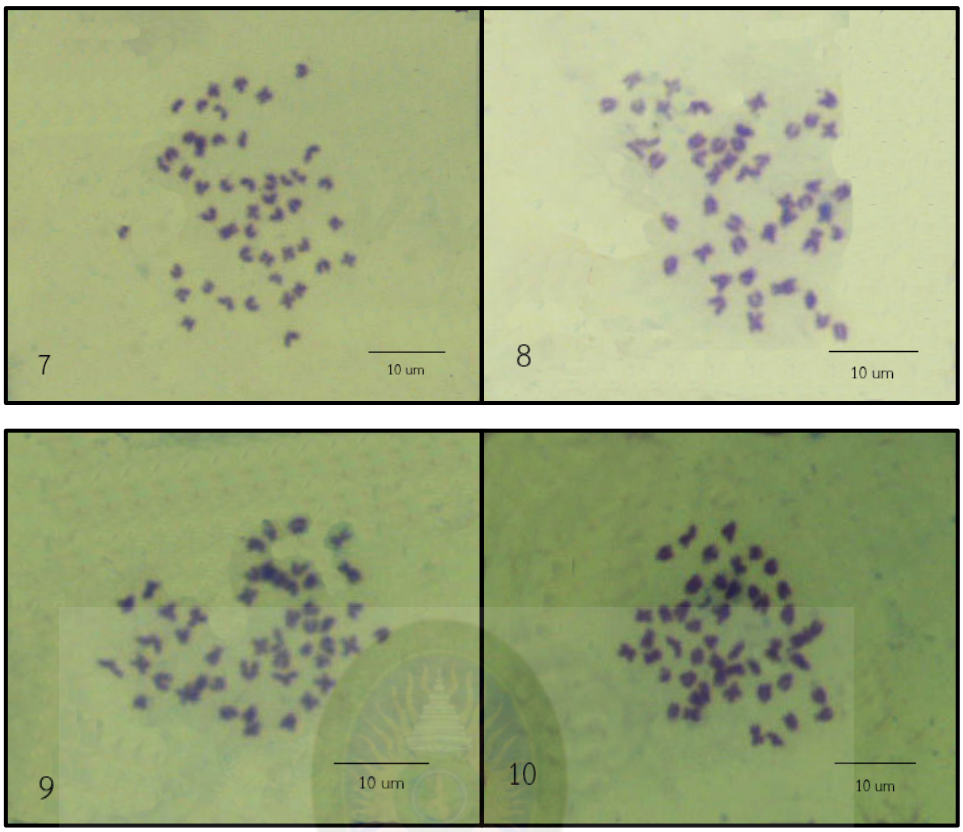


มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพเซลล์ระยะเมทาเฟสของปลากระทิง *Mastacembelus armatus* ด้วยวิธีการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ สกุล นายปริญญาศักดิ์ เจียระแม

วัน เดือน ปี เกิด 1 มีนาคม 2525

ที่อยู่ปัจจุบัน 28 หมู่ 5 บ้านหนองริวหนัง ตำบลลำหนองแสน อำเภอหนองกุงศรี จังหวัดกาฬสินธุ์ 46220

สถานที่ทำงาน สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2549 วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ มหาวิ ทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

พ.ศ. 2552 ประกาศนียบัตรบัณฑิต (ป.บัณฑิต) วิชาชีพครู มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

พ.ศ. 2563 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
วิทยานิพนธ์ งานวิจัย
M2x 128357

พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลากระทิง (Family Mastacembelidae) ในจังหวัดมหาสารคาม

นายปริญญาศักดิ์ เจียระแม

สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
วันรับ.....
เลขทะเบียน.....
เลขเรียกหนังสือ.....
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
พ.ศ. 2563

สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ใบอนุมัติวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

เรื่อง : พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลากระทิง (Family Mastacembelidae) ในจังหวัดมหาสารคาม

ผู้วิจัย : นายปริญญาศักดิ์ เจียระแม

ได้รับอนุมัติเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มานิตย์ อัญญะโพธิ์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล วรคำ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ ประมวล) ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี อินสำราญ) กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์) กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พันธิวา แก้วมาตย์) กรรมการ