รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาแมนดาริน(*Synchiropus* spp.)

Cytogenetics of Madarinfish (*Synchiropus* spp.)

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาววรรณภา กสิฤกษ์

ผู้ร่วมวิจัย

นายณัฐวุฒิ เหลืองอ่อน

รศ. ดร.อลงกลด แทนออมทอง

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินผ่านมหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ 2556

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม 2557

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับการจัดสรรงบประมาณสนับสนุนการวิจัย ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปี 2556 ซึ่งผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณอย่างมาก

ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการ และ เจ้าหน้าที่ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเข้ามาทำงานวิจัย และอนุเคราะห์การใช้สถานที่และเครื่องมือในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณคณะนิสิตนักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือในการทำงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี

คุณประโยชน์ที่มีในรายงานการวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตเวทิตาแก่บิดา มารดา บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน รวมทั้งมหาวิทยาลัยบูรพา และมหาวิทยาลัยขอนแก่น

คณะผู้ทำงานวิจัย
วรรณภา กสิฤกษ์
ณัฐวุฒิ เหลืองอ่อน
อลงกลด แทนออมทอง
สิงหาคม 2557

พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาแมนดาริน(*Synchiropus* spp.)

บทคัดย่อ

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาในวงศ์ปลาแมนดาริน (วงศ์ Callionymidae) 3 ชนิด ได้แก่ ปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropus splendidus*) ปลาแมนดารินจุด (*S. picturatus*) และปลาสกูตเตอร์ (*S. ocellatus*) เตรียมโครโมโซมจากไตด้วยวิธีการบดขยี้เซลล์ และการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวทำการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์ ผลการศึกษาพบว่าจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของปลาแมนดารินเขียวในเพศผู้เท่ากับ 39 แท่ง และในเพศเมีย 40 แท่ง ส่วนปลาแมนดารินจุด และปลาสกูตเตอร์มีทั้งในเพศผู้และเพศเมียเท่ากันคือ 40 แท่ง ปลาทั้งสามชนิดมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 40 โดยสามารถจัดสูตรคาริโอไทป์ได้ดังนี้ ปลาแมนดารินเขียวเพศผู้ $2n\,(39) = L^t_8 + M^t_{28} + X_1X_2Y$ เพศเมีย $2n\,(40) = L^t_8 + M^t_{28} + X_1X_1X_2X_2$ ปลาแมนดารินจุด $2n\,(40) = L^t_{14} + M^t_{24} + S^t_2$ และปลาสกูตเตอร์ $2n\,(40) = L^t_{16} + M^t_{18} + S^t_6$ ปลาแมนดารินเขียวมีการกำหนดเพศระบบ $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ สำหรับปลาแมนดารินจุดและปลาสกูตเตอร์ตรวจไม่พบความแตกต่างของของคาริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมียการย้อมแถบสีแบบนอร์พบนอร์ 3 ตำแหน่งในปลาแมนดารินเขียว สำหรับปลาแมนดารินจุดและปลาสกูตเตอร์พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง จากข้อมูลเบื้องต้นนำมาสร้างแบบจำลองสมมติฐานสายวิวัฒนาการของโครโมโซม ทำให้สันนิษฐานได้ว่าปลาแมนดารินทั้ง 3 ชนิดที่ศึกษาในครั้งนี้มาจากบรรพบุรุษร่วมที่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 48 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 48 และเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด

คำสำคัญ : ปลาแมนดารินวงศ์ Callionymidae, โครโมโซม, คาริโอไทป์

Cytogenetics of Madarinfish (*Synchiropus* spp.)

ABSTRACT

Cytogenetics of three species of the some fishes (family Callionymidae) was studied such as Mandarin fish (*Synchiropus splendidus*), Picturesque dragonet (*S. picturatus*) and Ocellated dragonet (*S. ocellatus*). Chromosomes from kidney tissue and T-lymphocyte cell culture were prepared by breaking cell and followed by conventional staining and NOR-banding techniques. The result showed that diploid chromosome number (2*n*) of Mandarin fish as 39 in male and 40 in female, both male and female of Picturesque dragonet and Ocellated dragonet as 40 in equal. There were 40 fundamental numbers (NF) or chromosome arms in all species. The karyotypic formula of fishes can be shown as following: *S. splendidus* $2n$ (39) = $L^t_8 + M^t_{28} + X_1X_2Y$ in male, $2n$ (40) = $L^t_8 + M^t_{28} + X_1X_1X_2X_2$ in female, *S. picturatus* $2n$ (40) = $L^t_{14} + M^t_{24} + S^t_2$ and *S. ocellatus* $2n$ (40) = $L^t_{16} + M^t_{18} + S^t_6$. The present discovery knowledge, the sex-chromosome system of *S. splendidus* was $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ system, in which the X_1, X_2 and Y classified as large telocentric, medium telocentric and large metacentric chromosomes, respectively. No strange size chromosomes related to sex was observed in *S. picturatus*and *S. ocellatus*. The results showed that there were 3 positions of NORs in *S. splendidus* while *S. picturatus* and *S. splendidus* showed 2 positions with NORs. As a consequence the data above can be used to simulate the evolution hypothesis. The three fish species apparently evolved from a common ancestor of 48 telocentric chromosomes (NF = 48).

Key Words: Family Calloionymidae, chromosome, karyotype

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
สารบัญ	ค
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสารงานวิจัย	
2.1 การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์	3
2.2 อนุกรมวิธาน สัณฐานวิทยา และชนิดพันธุ์ของปลาวงศ์ปลาแมนดาริน	4
2.3 การย้อมแถบสีบนโครโมโซม	4
2.4 การกำหนดเพศในปลา	7
2.5 รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์Calloonymidae	10
บทที่ 3วิธีการวิจัย	
3.1 การเก็บตัวอย่าง	11
3.2 การเตรียมโครโมโซม	11
3.3การเตรียมสไลด์โครโมโซม และการย้อมสีโครโมโซม	13
3.4 การตรวจสอบโครโมโซม การจัดคาริโอไทป์และอิดิโอแกรมมาตรฐาน	13
บทที่ 4ผลการวิจัย	
4.1 ปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropussplendidus*)	16
4.2 ปลาแมนดารินจุด (*Synchiropuspicturatus*)	23
4.3 ปลาสกูตเตอร์ (*Synchiropusocellatus*)	29
บทที่ 5สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	
5.1 สรุปผลการวิจัย	35
5.2 วิจารณ์ผลการวิจัย	36

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	42

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 4.1 ลักษณะปลาแมนดารินเขียว (Mandarin fish, *Synchiropussplendidus*)สเกลบาร์ 3 เซนติเมตร 17

ภาพที่ 4.2 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และคาริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropussplendidus*)เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 39 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร) 18

ภาพที่ 4.3เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และคาริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropussplendidus*)เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร) 19

ภาพที่ 4.4 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซมของปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropussplendidus*)เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์39 แท่ง (ภาพบน) และเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์40 แท่ง (ภาพล่าง) ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร) 20

ภาพที่ 4.5อิดิโอแกรมของปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropussplendidus*) มีระบบการกำหนดเพศแบบ $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$เพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์39 แท่ง และเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา 21

ภาพที่ 4.6 ลักษณะปลาแมนดารินจุด (Picturesque dragonet, *Synchiropuspicturatus*)สเกลบาร์ 3 เซนติเมตร 23

ภาพที่ 4.7เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และคาริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาแมนดารินจุด (*Synchiropuspicturatus*)เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร) 24

ภาพที่ 4.8เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และคาริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาแมนดารินจุด (*Synchiropuspicturatus*)เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร) 25

ภาพที่ 4.9 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซมของปลาแมนดารินจุด (*Synchiropuspicturatus*)เพศผู้ (ภาพบน) และเพศเมีย (ภาพล่าง)มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร) 26

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 4.10 อิดิโอแกรมของปลาแมนดารินจุด (*Synchiropuspicturatus*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา 27

ภาพที่ 4.11 ลักษณะปลาสกูตเตอร์ (Ocellated dragonet, *Synchiropusocellatus*)สเกลบาร์ 1 เซนติเมตร 29

ภาพที่ 4.12เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และคาริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาสกูตเตอร์ (*Synchiropusocellatus*)เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร) 30

ภาพที่ 4.13เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และคาริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาสกูตเตอร์ (*Synchiropusocellatus*)เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร) 31

ภาพที่ 4.14 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซมของปลาสกูตเตอร์ (*Synchiropusocellatus*)เพศผู้ (ภาพบน) และเพศเมีย (ภาพล่าง)มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์(สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร) 32

ภาพที่ 4.15 อิดิโอแกรมของปลาสกูตเตอร์ (*Synchiropusocellatus*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา 33

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 2.1รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของวงศ์ปลาแมนดาริน (Callionymidae) 10

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (total length; LT), ค่า relative length (RL), ค่า centromeric index (CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของค่า RL, CI ขนาดและชนิดของโครโมโซมแต่ละแท่งจากเซลล์ระยะเมทาเฟส ของปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropussplendidus*) เพศผู้และเพศเมียจำนวน 20 เซลล์มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 39 แท่งในเพศผู้ และ 40 แท่งในเพศเมีย 22

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (total length; LT), ค่า relative length (RL), ค่า centromeric index (CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของค่า RL, CI ขนาดและชนิดของโครโมโซมแต่ละแท่งจากเซลล์ระยะเมทาเฟส ของปลาแมนดารินจุด (*Synchiropuspicturatus*) เพศผู้และเพศเมียจำนวน 20 เซลล์มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง 28

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (total length; LT), ค่า relative length (RL), ค่า centromeric index (CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของค่า RL, CI ขนาดและชนิดของโครโมโซมแต่ละแท่งจากเซลล์ระยะเมทาเฟส ของปลาสกูตเตอร์ (*Synchiropusocellatus*) เพศผู้และเพศเมียจำนวน 20 เซลล์มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง 34

ตารางที่ 5.1 ผลการศึกษาลักษณะของคาริโอไทป์ในปลาแมนดาริน (วงศ์Callionymidae) ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ 39

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปลาแมนดารินเป็นปลาที่มีสีสันจัดจ้านและลวดลายที่ซับซ้อน จึงทำให้เป็นปลาที่มีความโดดเด่นสวยงามเป็นที่นิยมเลี้ยงในหมู่นักเลี้ยงปลาสวยงามในประเทศไทย ซึ่งความต้องการดังกล่าวมีผลทำให้มีการจับปลาจากธรรมชาติกันมากขึ้น กอปรกับสภาพธรรมชาติที่เปลี่ยนแปลงไปและการบุกรุกทำลายพื้นที่เป็นถิ่นอาศัย ส่งผลให้จำนวนประชากรของปลาเริ่มลดน้อยลง ถึงแม้ว่าปลาแมนดารินจะไม่จัดอยู่ในกลุ่มสัตว์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ แต่ถ้าไม่มีการอนุรักษ์ไว้ ในอนาคตก็มีโอกาสที่จะสูญพันธุ์ได้ และเนื่องจากปลาแมนดารินไม่มีถิ่นที่อยู่อาศัยในประเทศไทย จึงจำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้ประเทศไทยต้องเสียดุลไม่มากก็น้อย ทางคณะผู้วิจัยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงปลาแมนดารินและพบว่าปลาแมนดารินมีศักยภาพในการที่จะนำมาทำการเพาะเลี้ยงได้ ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นทั้งหมด ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ปลาแมนดารินเพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงอนุรักษ์และเชิงพาณิชย์ต่อไป

มีการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์อย่างกว้างขวางในสัตว์หลายชนิด ทำให้มีการพัฒนาเทคนิคหลาย ๆ อย่างเพื่อให้การวิจัยได้บรรลุผลที่ต้องการ รวมถึงการปรับเทคนิคให้เข้ากับชนิดสัตว์ที่ศึกษา เนื่องจากวิธีการและสารเคมีที่เหมาะสมสำหรับใช้ในสัตว์แต่ละชนิดไม่เหมือนกัน การศึกษา พันธุศาสตร์เซลล์ในกลุ่มปลาทะเลในประเทศไทยยังมีน้อยมาก จำนวนมากชนิดยังไม่มีข้อมูลในระดับสากล ปัจจุบันการศึกษาทางพันธุศาสตร์เซลล์ในปลาทะเลกำลังเป็นที่สนใจของนักพันธุศาสตร์ เนื่องจากข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นเครื่องมือเพิ่มเติมสำหรับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน (taxonomy) ในกรณีที่มีความยุ่งยากในการจัดจำแนก ข้อมูลด้านเหล่านี้ยังช่วยให้เราเข้าใจวิถีการเกิดวิวัฒนาการของกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง เนื่องจากปลาเป็นจุดเริ่มต้นของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ปลาหลายชนิดมีความแตกต่างผันแปรทางด้านพันธุกรรมค่อนข้างมาก การวิเคราะห์ลักษณะโครโมโซมและในระดับยีน สามารถทำให้เราเข้าใจกระบวนการเกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ (speciation) การปรับปรุงสายพันธุ์ และการเพาะเลี้ยงปลาทะเล ยังสามารถใช้ความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์เข้าช่วยการคัดเลือกพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์ปลาทะเล และการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปลาทะเล รวมถึงการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมในธรรมชาติ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อระบุชนิดของปลาแมนดารินที่นำมาจากแหล่งที่มาต่าง ๆ กัน ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และวิธีการทางพันธุศาสตร์เซลล์

1.2.2 เพื่อทำการเปรียบเทียบจำนวน (diploid number, 2*n*) ชนิด (type) ขนาด (size) ของโครโมโซม จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number, NF) และโครโมโซมเครื่องหมาย (chromosome marker) ของปลาแมนดาริน

1.2.3 เพื่อจัดคาริโอไทป์ (karyotype) มาตรฐานของปลาแมนดาริน

1.2.4 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการศึกษาด้านการปรับปรุงสายพันธุ์ การคัดเลือกพ่อ-แม่พันธุ์ปลา เพื่อการเพาะเลี้ยง การอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมในธรรมชาติ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการศึกษาสัณฐานวิทยา และพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาแมนดารินจากแหล่งที่มาต่าง ๆ กัน และจากลูกพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงได้

บทที่ 2
การตรวจสอบเอกสารงานวิจัย

2.1 การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์

พันธุศาสตร์เซลล์ (cytogenetics) เป็นการศึกษาโครโมโซม (chromosomes) ซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างที่สำคัญในการถ่ายทอดพันธุกรรมของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมย่อมมีผลโดยตรงต่อการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ทำให้เกิดการแสดงออกในสิ่งมีชีวิตในรูปแบบที่จำเพาะตัวและแตกต่างกัน มีผลต่อการเจริญพัฒนาและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (อมรา คัมภิรานนท์,2546) ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับพันธุศาสตร์เซลล์จะทำให้ทราบถึงความแตกต่างผันแปรทางพันธุกรรมในระดับโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ตลอดจนทราบถึงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาด้านอื่น ๆ เช่น การปรับปรุงพันธุ์ การจัดจำแนกชนิด และการบริหารจัดการและอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อก่อให้เกิดความมั่นคงของฐานความหลากหลายทางชีวภาพ และนำไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่นยืนจากต้นทุนความหลากหลายทางชีวภาพในที่สุด

การศึกษาโครโมโซมเพื่อตรวจจำนวน และรูปร่างของโครโมโซมมีหลายวิธีแต่ละวิธีจะเลือกเอาเซลล์ระยะเมทาเฟส (metaphase) เพราะเป็นระยะที่มีโครโมโซมหดสั้นมากที่สุดเห็นลักษณะได้ชัดเจน เพื่อที่จะเก็บเกี่ยวเซลล์ในระยะเมทาเฟส ได้นำสารโคลชิซิน(colchicines) ซึ่งเป็นสารสกัดจากพืชสกุล *Colchicum*มาใช้เพื่อยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิล(spindle fiber) ทำให้เซลล์ที่มีการแบ่งตัวไม่สามารถเข้าสู่ระยะแอนาเฟส (anaphase) ได้ วิธีการเตรียมโครโมโซมแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีโดยตรง (direct chromosome preparation) เป็นวิธีที่เลือกเอาเซลล์ในร่างกายที่กำลังมีการแบ่งตัวมาศึกษาโครโมโซม เป็นเซลล์ที่ยังอ่อนและยังมีการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลา เช่น เซลล์เม็ดเลือดจากไขกระดูก (bone marrow) อีกวิธี คือ วิธีโดยอ้อม (indirect chromosome preparation) จะเลือกเซลล์ในร่างกายชนิดที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย (*in vitro*) ให้เซลล์มีการแบ่งตัว (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อเตรียมโครโมโซมเมื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ และหยดเซลล์ลงบนสไลด์แล้ว เพื่อให้สามารถศึกษาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้อย่างชัดเจน โดยเห็นรูปร่างและนับจำนวนโครโมโซมได้อย่างถูกต้อง จำเป็นต้องมีการย้อมสีให้ติดเฉพาะโครโมโซม ซึ่งมีหลายวิธีให้เลือกใช้ตามจุดประสงค์ของการศึกษา (Halnan, 1989) การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining) จะใช้สีย้อมที่ติดกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) โดยสีที่นิยมใช้ในการย้อมโครโมโซมได้แก่ ออร์ซีน(orcein) คาร์มีน (carmine) และจิมซ่า (Giemsa's) ภาพโครโมโซมจะติดสีตลอดแท่งสามารถบอกจำนวน และชนิดของโครโมโซมประจำสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ได้ และอาจบอกลักษณะบางอย่างของโครโมโซม เช่น รอยคอดที่หนึ่ง (primary constriction) รอยคอดที่สอง (secondary constriction) และแซทเทลไลท์(satellite) ปัจจุบันมีการพัฒนาการ

ย้อมแถบสีแบบต่าง ๆ นอกจากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาขึ้นมากมาย แต่ละวิธีปรับปรุงให้เหมาะสมกับตัวอย่างเซลล์ที่ใช้

2.2 อนุกรมวิธาน สัณฐานวิทยา และชนิดพันธุ์ของปลาวงศ์ปลาแมนดาริน

ปลาแมนดารินเดิมมีชื่อเรียกว่า*Callionymussplendidus*ต่อมาภายหลังได้จัดอยู่ในสกุล (genus)*Synchiropus* มีชื่อสามัญหลายชื่อได้แก่ ปลาบู่แมนดาริน (Mandarin goby), ปลาแมนดารินเขียว (green Madarin), ปลาแมนดารินลาย (stripped Mandarin),stripped dragonet และ green dragonetปลาแมนดารินจัดอยู่ในวงศ์ (family)Callionymidaeซึ่งประกอบไปด้วย 10สกุลมีประมาณ182ชนิด (species)ในสกุล *Synchiropus*มีจำนวน51 ชนิดแบ่งเป็น 10 สกุลย่อย (subgenera)ปลาแมนดารินจัดอยู่ในสกุลย่อย *Synchiropus*(*Pterosynchiropus*) การวิจัยในครั้งนี้ทำในวงศ์ปลาแมนดาริน 3 ชนิด ได้แก่ ปลาแมนดารินเขียว (Mandarin fish, *Synchiropussplendidus*)ปลาแมนดารินจุด (picturesque dragonet, *Synchiropuspicturatus*) และปลาสกูตเตอร์ (ocellated dragonet, *Synchiropusocellatus*)

2.3 การย้อมแถบสีบนโครโมโซม

การเตรียมโครโมโซมโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ เก็บเกี่ยวเซลล์และหยดเซลล์ลงบนสไลด์ ทำการย้อมสีโดยเลือกวิธีตามจุดประสงค์ของการศึกษา (Halnan, 1989) ดังนี้

การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining)

ในช่วงเริ่มแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสิ่งมีชีวิต จะใช้วิธีการย้อมสีแบบธรรมดาหรือแบบดั้งเดิม ใช้สีย้อมที่ติดกรดนิวคลีอิกจึงเห็นโครโมโซมติดสีเข้มทั้งแท่ง โดยสีที่นิยมใช้ได้แก่ ออร์ซีน(orcein) คาร์มีน (carmine) และสีที่นิยมมากที่สุด คือ จิมซ่า (Giemsa's) สามารถบอกจำนวน และชนิดของโครโมโซมประจำสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ได้ และอาจบอกลักษณะบางอย่างของโครโมโซม เช่น รอยคอดที่หนึ่ง รอยคอดที่สอง และแซทเทลไลท์ การติดสีของโครโมโซมดังกล่าวบางครั้งอาจพบว่ามีการติดสีได้ไม่เท่ากัน เช่นในขณะที่โครโมโซมผ่านเข้าสู่วงชีพของเซลล์จะมีการยืดหดตัวไม่เท่ากัน ระยะใดที่หดตัวมากจะติดสีเข้มมาก แต่ถ้าหดตัวน้อยก็จะติดสีจางกว่าอีกทั้งในโครโมโซมแท่งเดียวกันยังติดสีได้ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเฮเทอโรโครมาทิน(heterochromatin)และยูโครมาทิน (euchromatin) การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาในบางกรณีนั้นอาจจะไม่สามารถจำแนกโครโมโซมได้เท่าที่ควร คือไม่สามารถระบุแน่ชัดได้ว่าเป็นโครโมโซมแท่งที่เท่าใด และจับคู่ไม่ได้

การย้อมแถบสีแบบคิว (Q-banding หรือ Quinacrine banding)

วิธีนี้ย้อมโครโมโซมให้เกิดแถบมืดและสว่างเป็นช่วง ๆ ตลอดความยาวแท่งโครโมโซมได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์(fluorescence microscope) โดยใช้สีย้อมชนิด Quinacrine mustard มีลักษณะแถบที่เหมือนกับการย้อมแถบสีแบบซี และสามารถจำแนกความแตกต่างของโครโมโซมทุกแท่งได้

โดยเฉพาะเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟสของมนุษย์นั้นเมื่อย้อมด้วยสีชนิดนี้จะทำให้โครโมโซมวายติดสีเขียวสว่างมากเรียกว่า Y-chromatin หรือ Y-body จึงเป็นการตรวจโครโมโซมวายของมนุษย์ได้อีกด้วย นอกจากจะใช้สี Quinacrine mustard ในการย้อมแล้ว ยังปรากฏมีสีอื่น ๆ ที่ย้อม Q-band ได้เช่นกัน คือ beziimidazole derivative และพบว่าส่วนที่ติดสีเข้มเป็นบริเวณที่มีเบส A-T มาก (มียีนทำงานน้อย) ส่วนที่ติดสีจางเป็นบริเวณที่มีเบส G-C มาก (มียีนทำงานมาก)

การย้อมแถบสีแบบซี (C-banding หรือ constitutive heterochromatinbanding หรือ centromeric banding)

เป็นเทคนิคที่ทำให้ติดแถบสีเข้มบริเวณ constitutive heterochromatin ซึ่งเป็นบริเวณที่โครโมโซมขดตัวกันแน่น และเป็นตำแหน่งของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของเบสที่ซ้ำกัน (repeated sequence ชนิด satellite DNA)และมีการจำลองตัวเองช้าที่สุด ซึ่งได้แก่ บริเวณเซนโทรเมียร์ของเกือบทุก ๆ โครโมโซม ยกเว้นโครโมโซมวาย นอกจากนี้ยังพบบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมบางแท่งอีกด้วยเทคนิคนี้ทำได้โดยผ่านเซลล์ระยะเมทาเฟสในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วอบเซลล์ในเกลือโซเดียมที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ย้อมด้วยสีจิมซ่า ส่วนของยูโครมาทินจะไม่ติดสี แต่เฮเทอโรโครมาทินจะติดสีเข้ม โดยโซเดียมไฮดรอกไซด์จะช่วยให้ดีเอ็นเอคลายจากเกลียวคู่เป็นสายเดี่ยว และเกลือโซเดียมจะช่วยในการจับคู่ คือพันเกลียวจากสายเดี่ยวเป็นสายคู่ เทคนิคนี้สามารถใช้ในการศึกษาโครโมโซมเพศ เพราะโครโมโซมวายจะไม่ติดสีเข้มบริเวณเซนโทรเมียร์ หรือบริเวณ constitutive heterochromatin

การย้อมแถบสีแบบอาร์(R-banding หรือ reverse banding)

หลักการคือนำสไลด์ไปอบในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 6.5 ที่อุณหภูมิสูง 80-90 องศาเซลเซียส แล้วตามด้วยการย้อมสีจิมซ่า ก็จะปรากฏแถบสีเข้มและจาง เช่นเดียวกับแถบสีแบบคิว และแถบสีแบบจี แต่แถบสีที่เกิดขึ้นจะตรงข้ามกับแถบสีแบบคิว และแถบสีแบบจี คือ แถบที่ติดสีเข้มในแถบสีแบบคิว และแถบสีแบบจีจะติดสีจางแทนในแถบสีแบบอาร์การย้อมสีแบบอาร์มักจะติดสีเข้มมากบริเวณเซนโทรเมียร์ บางครั้งจึงเรียกการย้อมสีแบบนี้ว่าการย้อมแถบสีแบบที (T-banding) การย้อมสีแบบอาร์จะติดสีเข้มมากบริเวณที่มีเบส G-C มาก (มียีนทำงานมาก) แต่บริเวณที่ย้อมติดสีเข้มของการย้อมสีแบบจีและคิวจะติดบริเวณที่มีเบส A-T มาก (มียีนทำงานน้อย) การย้อมสีแบบอาร์ยังช่วยยืนยันโรคทางพันธุกรรมบางชนิดของมนุษย์ได้ถูกต้องมากขึ้น

การย้อมแถบสีแบบนอร์ (NORs-banding)

เป็นเทคนิคที่ทำให้ส่วนnucleolar organizer regions (NORs) ติดสีเข้ม เรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเทคนิค silver staining เพราะใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต(silver nitrate) ซึ่งจะเลือกติดบริเวณนี้เท่านั้น (Howell and Black, 1980) เทคนิคนี้ใช้ตรวจหา NORs ซึ่งในสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนนี้มียีนสำหรับสังเคราะห์ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอชนิด 18S และ 28S อยู่ ในมนุษย์จะอยู่ในบริเวณรอยคอดที่สองของโครโมโซมคู่ที่ 13, 14, 15, 21 และ 22 ตำแหน่งของ NORs นี้ อยู่บริเวณก้านของแซทเทิลไลท์โครโมโซม หรือบริเวณรอยคอดที่สอง

ของโครโมโซม จึงเรียกโครโมโซมที่มีรอยคอดที่สองนี้ว่าแซทเทลไลท์โครโมโซม NORs มีความหลากหลาย (polymorphism) ได้ในโครโมโซมแท่งเดียวกันของบุคคลต่างกัน ซึ่งใช้เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย (marker chromosome หรือ marked chromosome) ได้และใช้ในการติดตามดูพฤติกรรมการถ่ายทอดบางลักษณะของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ได้ ซึ่งการถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดล

การย้อมแถบสีแบบจี (G-banding)

เป็นเทคนิคที่นิยมทำกันมากที่สุด เพราะเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย และวัสดุที่ใช้ย้อมไม่สิ้นเปลือง เทคนิคนี้เหนี่ยวนำให้เกิดแถบโดยใช้สารเคมีที่สามารถย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของโครโมโซม สารเคมีที่นิยมใช้ คือ เอนไซม์ทริปซิน(trypsin) แล้วจึงย้อมด้วยสีจิมซ่าตามปกติ ซึ่งก่อนย้อมไสด์ต้องเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น เอนไซม์ทริปซิน หรือบ่มสไลด์ใน saline-citrate ที่ร้อน แถบที่เห็นมี 2 แบบ คือ แถบมืด (dark bands) และแถบสว่าง (light bands) หรือแถบสีเข้มสลับกับจางบนแท่งโครโมโซมกลไกการติดสีอาศัยคุณสมบัติของความแตกต่างกันในองค์ประกอบของโปรตีนที่อยู่บนโครโมโซมจะติดสีได้ดีในส่วนของเฮเทอโรโครมาทินที่โปรตีนมีกรดอะมิโนไลซีน (lysine) และอาร์จินีน (arginine) อยู่หนาแน่น สายดีเอ็นเอจะพันกันแน่น เอนไซม์ทริปซินจึงเข้าไปย่อยโปรตีนได้น้อยบริเวณนี้จึงติดสีเข้ม ทำให้เกิดแถบสีมืด ในทางตรงกันข้าม ส่วนที่เป็นยูโครมาทินในแท่งโครโมโซมจะไม่ค่อยติดสี เพราะสายดีเอ็นเออยู่อย่างหลวม ๆ เอนไซม์ทริปซินจึงเข้าไปย่อยโปรตีนได้มากบริเวณจึงติดสีจาง โดยทั่วไปสไลด์ที่จะนำมาย้อมแบบจี ควรทิ้งไว้สัก3-5 วันที่อุณหภูมิห้อง หรือบ่มใน hot plate ที่อุณหภูมิ 56-60 องศาเซลเซียส นาน 16-18ชั่วโมง หลังจากหยดตะกอนบนสไลด์ สไลด์ที่หยดไว้นานต้องใช้เอนไซม์ทริปซินที่เข้มข้นกว่าหรือใช้เวลาในการย่อยนานกว่าเพื่อที่จะให้ได้แถบโครโมโซมที่ชัด ซึ่งในปฏิกิริยานี้ เอนไซม์ทริปซินจะไปสลาย (hydrolizes) สายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) บริเวณที่มีด้านคาร์บอกซิลของกรดอะมิโนอาร์จินีนและไลซีน

การย้อมแถบสีแบบจีที่ให้รายละเอียดสูง (high resolution G-banding)

สำหรับการย้อมแถบสีโดยทั่วไปจะใช้โครโมโซมในระยะเมทาเฟส ซึ่งเป็นระยะที่ดีที่สุดในการย้อมสี ตรวจดูรูปร่าง เนื่องจากโครโมโซมหดสั้นที่สุด แต่มีข้อจำกัดในบางกรณีที่มีความต้องการให้ได้แถบสีจำนวนมาก และมีรายละเอียดเพิ่มขึ้น เพื่อความชัดเจนในการวิเคราะห์โรคทางพันธุกรรมบางโรค หรือตรวจสอบการเกิดการกลาย (mutation) ของชิ้นส่วนเล็ก ๆ บนโครโมโซม ดังนั้น จึงได้มีการปรับปรุงเทคนิคการเพราะเลี้ยงเซลล์ และทำให้เซลล์หยุดการแบ่งเซลล์ในระยะก่อนเมทาเฟส (prometaphase) หรือปลายโพรเฟส (late prophase) ทำให้เซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงเกือบทั้งหมดอยู่ในระยะเดียวกันของวัฏจักรเซลล์ (synchronize)ใช้สารเคมี เช่น เมโทเทรกเซท (methotrexate) ไทมิดีน (thymidine) ฟลูออโรดีออกซียูริดีน (fluorodexyuridine) เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ได้โครโมโซมที่ขนาดไม่หดสั้นมาก และไม่ยืดยาวเกินไป เรียกเทคนิคนี้ว่าการย้อมแถบสีแบบจีที่ให้รายละเอียดสูง ในกรณีของเซลล์เม็ดเลือดขาวจะเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72-96 ชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 72 ใส่สารเมโทเทรกเซทเพื่อหยุดเซลล์ให้อยู่ในระยะ S-phase เป็นเวลา 17 ชั่วโมง ต่อมาจึงใส่ไทมิดีน เพื่อให้เซลล์เข้าสู่วงชีพเซลล์ต่อไป เมื่อเก็บเกี่ยวเซลล์จะได้เซลล์ในระยะปลายโพรเฟส

เท่า ๆ กับระยะเมทาเฟส โดยระยะปลายโพรเฟสให้แถบที่ปรากฏบนโครโมโซมมนุษย์ 843-1,256 แถบ ต่อจำนวนชุดแฮพลอยด์ (haploid set) ส่วนระยะเมทาเฟสให้แถบที่ปรากฏบนโครโมโซมมนุษย์ 320-554 แถบต่อจำนวนชุดแฮพลอยด์ ซึ่งจะให้รายละเอียดสูงกว่าการย้อมแถบสีแบบธรรมดา (Yunis, 1976; อมรา คัมภิรานนท์, 2546; อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

เมโทเทรกเซทเป็นอนุพันธ์ของกรดโฟลิก (folic acid, FA) จัดว่าเป็นแอนติเมทาบอไลท์ (antimetabolite) คือ มีเป้าหมายในการยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทส (dihydrofolatereductase, DHFR) การยับยั้งปฏิกิริยานี้เป็นไปอย่างสมบูรณ์แบบ เมโทเทรกเซทจะยับยั้งการเปลี่ยนไดไฮโดรโฟเลท (dihydrofolate, FH_2) ไปเป็นเตตระไฮโดรโฟเลท (tetrahydrofolate, FH_4) ซึ่งเป็นตัวให้คาร์บอนแก่การสังเคราะห์ dUMPไปเป็น dTMPซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนั้นเซลล์จึงถูกยังยั้งก่อนที่จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอในระยะ G_1/S ของวงชีพเซลล์ เนื่องจากภาวะขาดไทมิดีน การยับยั้งโดยเมโทเทรกเซทจะถูกปลดปล่อยได้โดยการล้างออกและเติมไทมิดีน ซึ่งช่วงเวลาในการปลดปล่อยและเก็บเกี่ยวเซลล์จะต้องมีความเหมาะสม (ชาคริต ดวงใจ, 2534; Rooney and Czepulkowski, 1986; Wike, 1989; Rooney, 2001)

การย้อมแถบสีโครโมโซมแบบต่าง ๆ นี้มีประโยชน์ช่วยในการจับคู่โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) ช่วยตรวจสอบเอกลักษณ์ของโครโมโซม ช่วยตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม ช่วยตรวจสอบพฤติกรรมของโครโมโซม และช่วยในการจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ถูกต้องยิ่งขึ้น การเปรียบเทียบทางพันธุศาสตร์เซลล์ (comparative cytogenetics)ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อช่วยอธิบายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ (Rooney, 2001; อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

2.4 การกำหนดเพศในปลา(Jesus et al.,1999; BornandBertollo,2000;Artoniet al., 2001)

ปลาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มโบราณ (primitive stage)การกำหนดเพศจึงมีหลายแบบแตกต่างกันออกไป โดยหลัก ๆ จะมี 2 แบบ คือ ถูกควบคุมและไม่ถูกควบคุมด้วยพันธุกรรม การพัฒนาอวัยวะเพศในปลามีกระบวนการที่ถูกควบคุมทั้งปัจจัยภายใน (พันธุกรรม) และพัฒนาได้โดยตรงกับปัจจัยภายนอก เช่น ฮอร์โมน เมื่ออวัยวะเพศพัฒนาไปแล้วจะมีความคงที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่มีข้อยกเว้นในกรณีที่ปลามีการสืบพันธุ์แบบกระเทย ที่พบได้ในปลาหลายชนิดในวงศ์เซอรานิดี (Serranidae)และปลาไหลนา (*Monopterusalbus*)

การกำหนดเพศในปลาเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่ซับซ้อนเพื่อนำไปสู่การการกำหนดเซลล์เพศแล้วเกิดการเปลี่ยนสภาพรูปร่างของเซลล์ จากการศึกษาพบว่ายีนบางยีนอาจมีผลโดยตรงต่อการพัฒนาของรังไข่ และบางยีนมีผลต่อการพัฒนาของอัณฑะ เช่น ในกรณีของปลา Medaka(*Oryziaslatipes*)พบว่ายีน *DMY*เป็นยีนที่กำหนดเพศ และมีผลต่อการพัฒนาของอัณฑะ ส่วนในปลานิล (tilapia) ชนิด *Oreochromisniloticus*พบว่ามีทั้งยีนและปัจจัยภายในร่างกาย ที่จะมีผลต่อการกำหนดเพศและการพัฒนาของโกแนด โดยฮอร์โมนเอสโทรเจน (estrogen) ภายในร่างกายเป็นตัวเหนี่ยวนำตามธรรมชาติ สำหรับการ

พัฒนาการของรังไข่ ขณะที่ยีน *DMRT1*จะมีความสำคัญต่อการพัฒนาการของอัณฑะ ในปลาส่วนใหญ่แล้วการกำหนดเพศจะถูกควบคุมโดยพันธุกรรม ดังนี้

แบบที่ไม่มีโครโมโซมเพศ เป็นพันธุกรรมการกำหนดเพศที่โบราณมากที่สุด เพศจะถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ซึ่งจะมีการกระจายตัวอยู่บนโครโมโซมร่างกาย ปลาจะแสดงออกเป็นเพศใดเพศหนึ่งขึ้นกับสมดุลของยีนเหล่านั้น และเนื่องจากถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ยีนแต่ละตำแหน่งจะมีอิทธิพลค่อนข้างน้อย ดังนั้นสิ่งแวดล้อมจึงมีอิทธิพลต่อการแสดงออกเป็นเพศใดเพศหนึ่ง ปลาที่มีการควบคุมเพศแบบนี้จะมีอัตราส่วนเพศในรุ่นลูกที่ไม่แน่นอน เช่นพบได้ในปลาหางดาบ (*Xiphophorushelleri*)

แบบที่มีโครโมโซมเพศ แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ

1. Homomorphic sex chromosome โครโมโซมเพศมีลักษณะไม่แตกต่างกับโครโมโซมร่างกายและไม่แตกต่างระหว่างโครโมโซมที่กำหนดเพศผู้และเพศเมีย ปลาเหล่านี้สัดส่วนเพศในรุ่นลูกค่อนข้างแน่นอน แต่อาจพบว่าสัดส่วนเพศอาจเปลี่ยนแปลงไปบ้าง เนื่องจากอิทธิพลของยีนซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมร่างกาย การควบคุมแบบนี้มักกำหนดสัญลักษณ์ X แทนโครโมโซมเพศเมีย และ Y แทนโครโมโซมเพศผู้ ในกรณีที่ปลาชนิดนั้นมีการควบคุมเพศแบบเฮเทอโรแกมีติกฟีเมล ปลาเพศเมียจะสร้างไข่ที่มีจีโนไทป์ที่เหมือนกันทั้งหมด (มีแต่โครโมโซมเอ็กซ์) ดังนั้นเพศเมียจะมีจีโนไทป์ XX ส่วนเพศผู้มีจีโนไทป์ XY เช่น ในปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) ในทางตรงข้ามถ้าการควบคุมเพศเป็นแบบเฮเทอโรแกมีติกเมล จะใช้สัญลักษณ์ Z แทนโครโมโซมเพศผู้และ W แทนโครโมโซมเพศเมียดังนั้นเพศผู้จะมีจีโนไทป์ ZZ ส่วนเพศเมียมีจีโนไทป์ ZW เช่น ในปลานิลชนิด*O. aureus*และ *O. hornorum*ระบบควบคุมเพศในปลาเหล่านี้ไม่อาจตรวจสอบได้โดยแคริโอไทป์ แต่สามารถตรวจสอบได้โดยการเปลี่ยนแปลงเพศของปลา โดยนำเอาปลาเพศเมียปกติ (XX หรือ ZW) มาผสมพันธุ์กับปลาเพศผู้ที่เกิดจากการเปลี่ยนเพศ (XX หรือ ZW) แล้วศึกษาสัดส่วนเพศที่ได้

เพศผู้ XX (แปลงเพศ) x เพศเมีย XX100% เพศเมีย (XX)

เพศผู้ ZW (แปลงเพศ) x เพศเมีย ZW ⟶ 25% เพศผู้ (ZZ)+50% เพศเมีย (ZW)+25% ตาย (WW)

จากแผนการผสมพันธุ์ ในกรณีได้ลูกเพศเมียทั้งหมดแสดงว่าการควบคุมเพศเป็นระบบ XY และในกรณีได้ลูกทั้ง 2 เพศ แสดงว่าการควบคุมเพศเป็นระบบ ZW

2. Heteromorphic sex chromosome โครโมโซมเพศที่มีลักษณะแตกต่างกันสาเหตุที่ทำให้โครโมโซมเพศของปลามีลักษณะหลายรูปแบบที่แตกต่างกัน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย หรือการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม ความแตกต่างที่ตรวจพบทางพันธุศาสตร์เซลล์ระหว่างโครโมโซมเพศได้แก่ การเพิ่มหรือขาดหายไปของเฮเทอโรโครมาทิน การลดขนาดของโครโมโซม การเพิ่มขนาดของโครโมโซม และการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม ซึ่งความแตกต่างทางโครงสร้างของโครโมโซมที่เกิดขึ้นกับแต่ละประชากร จะจำกัดเพียงเพศเดียวเท่านั้น โครโมโซมเพศในลักษณะเหล่านี้ที่พบได้ในปลาจะจำแนกได้เป็น 2 แบบ (8 ระบบ)คือ

2.1 แบบเฮเทอโรแกมีติกเมล ปลาเพศผู้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ 2 แบบ เพศเมียสร้างได้แบบเดียวดังนี้

ระบบ XX/XY เป็นระบบกำหนดเพศที่เกี่ยวข้องกับโครโมโซม 2 แท่ง โดยที่โครโมโซม X และโครโมโซม Y มีลักษณะแยกจากกันอย่างชัดเจน เมื่อศึกษาทางพันธุศาสตร์เซลล์ปลาเพศผู้มีแคริโอไทป์ XY ส่วนปลาเพศเมียเป็น XX แต่จำนวนโครโมโซมของทั้งสองเพศเท่ากัน เช่น ปลา tiger(*Hopliasmalabaricus*)

ระบบ XX/XOเป็นระบบการกำหนดเพศที่คล้ายกับระบบแรก แตกต่างตรงที่โครโมโซม Y สูญหายไป และเพศผู้มีโครโมโซมน้อยกว่าเพศเมีย 1 แท่ง เช่น ปลา Mediterranean rainbow wrasse (*Corisjulis*)

ระบบ $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$เป็นระบบโครโมโซมเพศหลายแท่ง เกิดจากโครโมโซม Y เกิดการเคลื่อนย้ายไปรวมกับกับโครโมโซมร่างกาย ส่งผลให้ปลาเพศผู้และปลาเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่างกัน เช่น ปลา splendid alfonsino(*Beryxsplendens*)

ระบบ XX/XY_1Y_2เป็นระบบโครโมโซมเพศมีหลายแท่ง โดยที่โครโมโซม X ชนิดอะโครเซนทริก หรือเทโลเซนทริก ได้ไปเชื่อมรวมกับโครโมโซมร่างกาย ทำให้ปลาเพศผู้และปลาเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่างกัน เช่น ปลา wolf fish(*Hopliasmalabaricus*)

2.2แบบเฮเทอโรแกมีติกฟีเมล ปลาเมียเพศสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ 2 แบบ ปลาเพศผู้สร้างได้แบบเดียว

ระบบ ZZ/ZW เป็นระบบการกำหนดเพศที่เกี่ยวข้องกับโครโมโซม 2 แท่ง แต่ตรงข้ามกับระบบ XX/XY โครโมโซม Z และโครโมโซม W มีลักษณะแยกจากกันอย่างชัดเจน เมื่อศึกษาทางพันธุศาสตร์เซลล์ปลาเพศผู้มีแคริโอไทป์เป็น ZZ ส่วนปลาเพศเมียเป็น ZW แต่จำนวนโครโมโซมของปลาทั้งสองเพศเท่ากัน ระบบนี้พบว่ามีรายงานในปลามากที่สุด เช่น ปลา *Triportheusguentheri*

ระบบ ZZ/ZOเป็นระบบการกำหนดเพศที่คล้ายกับระบบแรก มีความแตกต่างกันตรงที่โครโมโซม W สูญหายไป และเพศเมียมีโครโมโซมน้อยกว่าเพศผู้ 1 แท่ง ระบบนี้มีรายงานค่อนข้างน้อย เช่น ปลา *Lepidocephalichthysguntea*

ระบบ $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W$เป็นระบบที่มีโครโมโซมเพศหลายแท่ง โดยโครโมโซม W ไปเชื่อมรวมกับโครโมโซมร่างกาย ส่งผลให้ปลาเพศผู้และปลาเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่างกัน ลักษณะจะตรงข้ามกับระบบ $X_1X_1X_2X_2/ X_1X_2Y$

ระบบ ZZ/ZW_1W_2เป็นระบบที่มีโครโมโซมเพศหลายแท่ง โดยโครโมโซม Z ได้ไปเชื่อมรวมกับโครโมโซมร่างกาย ส่งผลให้ปลาเพศผู้และปลาเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่างกัน ลักษณะจะตรงข้ามกับระบบ XX/XY_1Y_2เช่น ปลา *Apareiodonaffinis*

2.5รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ Callionymidae

จากการตรวจสอบเอกสารงานวิจัย พบว่ามีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาแมนดารินน้อยมาก โดยมีรายงานการศึกษาที่น้อยกว่า 3เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนชนิดพันธุ์ของปลาที่ได้รายงานไว้โดยมีรายงานไว้เพียง 5 ชนิด ดังนี้

ตารางที่ 2.1 รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของวงศ์ปลาแมนดาริน(Callionymidae) (Arai, 2011)

ชนิด	2*n*	NF	NORs	สูตรคาริโอไทป์	แหล่งตัวอย่าง	อ้างอิง
Eleutherochir mirabilis	36	36	-	36a	Japan	Sawada and Sakamoto (1980)
Repomucenusbeniteguri	38	38	-	38st	Japan	Murofushi et al. (1983)
	37	38	2	1m+36st	Japan	Murofushi et al. (1983)
R. huguenini	32	34	2	2m+30a	Japan	Murofushi et al. (1984)
R. ornatipinnis	38	38	-	38st	Japan	Murofushi et al. (1983)
	37	38	2	1m+36st	Japan	Murofushi et al. (1983)
R. richardsonii	38	38	2	38a	Japan	Murofushi et al. (1984)
	38	74	-	36sm+2a	Japan	Ojima and Kikuno (1987)

หมายเหตุ:2*n* = จำนวนดิพพลอยด์โครโมโซม,NF= จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน,NORs=รอยคอร์ดที่สองของโครโมโซม,m=โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก,sm=โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก,t=โครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก, st=โครโมโซมชนิดซับเทโลเซนทริก (เทียบได้กับโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกในการศึกษาครั้งนี้), a=โครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกและ – ไม่มีข้อมูล

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ การเก็บตัวอย่าง การเตรียมโครโมโซม การย้อมสีโครโมโซม การตรวจสอบโครโมโซม และการจัดคาริโอไทป์มาตรฐาน

3.1 การเก็บตัวอย่าง

3.1.1 เก็บตัวอย่างแมนดารินจำนวน 3ชนิด ได้แก่ ปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropussplendidus*)ปลาแมนดารินจุด (*Synchiropuspicturatus*)และปลาสกูตเตอร์ (*Synchiropusocellatus*)ที่มีการเลี้ยงเป็นปลาสวยงามในประเทศไทย จำนวนตัวอย่างปลาแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 3.1(รวมตัวอย่างปลาแมนดารินทั้งหมด 28 ตัว)ตัวอย่างปลาที่เก็บมาได้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือตัวอย่างสำหรับตรวจสอบเอกลักษณ์ปลา และตัวอย่างสำหรับเตรียมโครโมโซม

ตารางที่ 3.1 จำนวนตัวอย่างปลาแมนดารินที่ศึกษาในครั้งนี้

ชนิดปลา	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	รวม (ตัว)
ปลาแมนดารินเขียว	4	4	8
ปลาแมนดารินจุด	5	5	10
ปลาสกูตเตอร์	4	6	10

3.1.2 นำตัวอย่างปลาที่เก็บได้มาเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการเรือนสัตว์ทดลองโดยเลี้ยงในตู้เลี้ยงปลาขนาด 60x120x50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ให้ก๊าซออกซิเจนตลอดเวลา และให้อาหารวันละ 1 ครั้ง เลี้ยงไว้อย่างน้อย 7 วัน

3.1.3 นำตัวอย่างปลามาตรวจสอบและระบุชนิดถ่ายภาพตัวอย่างปลาแมนดารินแต่ละชนิด

3.2 การเตรียมโครโมโซม

3.2.1 เตรียมโดยวิธีทางตรง (direct method)

อวัยวะที่ใช้ คือไต เนื่องจากเป็นอวัยวะที่มีการแบ่งเซลล์ตลอดเวลา โดยเตรียมจากในตัวสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) และภายนอกตัวสิ่งมีชีวิต (*in vitro*)การเตรียมโครโมโซมโดยวิธีทางตรง ในสภาพ *in vivo* ดัดแปลงจากวิธีของ Chen and Ebeling (1968) และ Nanda et al. (1995) ดังนี้

ฉีดสารละลายไฟโตฮีแมกกลูตินิน (Phytohemagglutinin, PHA) เข้มข้น 4% เข้าช่องท้องของปลา (intraperitoneal injection) ขนาด 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ

23 ชั่วโมงฉีดโคลชิซิน0.05% ขนาด 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เข้าไปในกล้ามเนื้อ (intramusculary injection) ของปลา 1 ชั่วโมง สลบปลาโดยใช้น้ำแข็ง นำเฉพาะส่วนของไตมา ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และบดโดยเติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.075 โมลาร์(KCl0.075 M)กรองเศษเซลล์ขนาดใหญ่ออกด้วยตะแกรงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร เทตะกอนเซลล์ขนาดเล็กลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 นาที นำตะกอนเซลล์ไปปั่นที่ 1,200-1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสข้างบน เติมน้ำยาตรึงสภาพ (fixative)ที่มีส่วนผสมของเมทานอล 3 ส่วนต่อกรดอะซิติก1 ส่วน (methanol:acetic acid; 3:1) ที่เตรียมใหม่ ๆ และเย็นจัด นำสารละลายไปปั่นที่ 1,200-1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสข้างบน เติมน้ำยาตรึงสภาพลงไป 7-8 มิลลิลิตร ปั่นอีกครั้ง ทำซ้ำเพื่อล้างตะกอนเซลล์ให้สะอาด เก็บตะกอนเซลล์ในสารละลายตรึงเซลล์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมโครโมโซมโดยวิธีทางตรง ในสภาพ *in vitro* โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Gold et al. (1990) ดังนี้ ฉีดสารละลายไฟโตฮีแมกกลูตินินเข้มข้น 4% เข้าช่องท้องของปลา ขนาด 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สลบปลาด้วยน้ำแข็ง ผ่าเปิดช่องท้อง ตัดเอาส่วนไตใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ในปริมาณพอท่วมเนื้อเยื่อ (ประมาณ 5 มิลลิลิตร) ใช้มีดและกรรไกรสับให้เป็นชิ้นละเอียด เติมสารละลายโคลซิชิน 0.1% จำนวน 2-3 หยด แล้วนำไปบ่มที่ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ย้ายสารละลายที่มีตะกอนเซลล์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200-1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งสารละลายส่วนบนเหลือแต่ตะกอนเซลล์ เติมสารละลายKClเข้มข้น 0.075M 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้การกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง แล้วนำไปบ่มที่ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นอีกรอบ และทิ้งสารละลายส่วนบนเหลือแต่ตะกอนเซลล์ ค่อยๆ เติมน้ำยาตรึงสภาพที่เตรียมใหม่ ๆ และเย็นจัด ทีละหยด นำไปปั่น 3-4 ครั้งจนได้ตะกอนเซลล์สีขาว เก็บตะกอนเซลล์ในสารละลายตรึงเซลล์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2 เตรียมโดยทางอ้อม (indirect method)

โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cell culture) ใช้วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวปริมาณน้อย ดัดแปลงจากวิธีของ Fujiwara et al.(2001) มีวิธีการดังนี้

เก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณใต้เส้นข้างลำตัว หรือจากหัวใจโดยใช้เข็มที่ติดกับกระบอกฉีดยาปลอดเชื้อที่เคลือบสารโซเดียมเฮพาริน เก็บตัวอย่างเลือดในน้ำแข็ง หรือ 4 องศาเซลเซียส เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM media ที่เย็น 5 มิลลิลิตรลงในเลือด 0.1 มิลลิลิตรในหลอดปลอดเชื้อ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นที่ 1,250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เก็บเม็ดเลือดขาวที่อยู่บริเวณชั้นบนของเซลล์เม็ดเลือดแดงใช้ปิเปตดูดวนเบา ๆ โดยแตะปลายปิเปตที่ข้างหลอด และย้ายไปลงในหลอดใหม่ เติมอาหาร DMEM media ไปจนมีปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตรปั่นที่ 1,500 รอบต่อนาที นำตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวมาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM media (Gibco) หรือ m-199 (Gibco) ที่ประกอบด้วย ไฟโตฮีแมกกลูตินิน ความเข้มข้น 4-6%, ฟีทัลโบไวน์ซีรัม (fetal bovine serum: FBS) 10%, ยาปฏิชีวนะ และยาฆ่าเชื้อราซึ่งประกอบด้วย เพนนิซิลินและสเตรบโตไมซิน (penicillin streptomycin)3% และแอมโฟ- เทอริซินบี

(Amphothericin B) 250 นาโนกรัม บ่มที่ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน เขย่าเลือดทุกวันวันละ 2 ครั้ง ก่อนเก็บเกี่ยว 1.5 ชั่วโมง เติมโคลชิซิน0.01% 50 ไมโครลิตร เมื่อครบเวลา นำไปปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย KClความเข้มข้น0.075 Mบ่มที่ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นและดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง เติมน้ำยาตรึงสภาพที่เตรียมใหม่ๆ และเย็นจัดแล้วนำมาปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง เติมน้ำยาตรึงสภาพอีก เพื่อล้างตะกอนเซลล์ 3 ครั้ง หรือจนตะกอนเซลล์สะอาด แล้วเก็บตะกอนเซลล์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.3 การเตรียมสไลด์โครโมโซม และการย้อมสีโครโมโซม

เตรียมสไลด์โครโมโซมโดยนำตะกอนเซลล์ที่เตรียมไว้แล้วมาหยดบนสไลด์ที่สะอาด 2-3 หยด โดยหยดห่างจากสไลด์ 2 เซนติเมตร ปล่อยให้แห้งในอากาศ การเตรียมสไลด์จะเตรียมจากตัวอย่างปลาแมนดารินตัวละ 8 สไลด์ การย้อมสีโครโมโซม โดยเทคนิคการย้อมแบบธรรมดา ดังนี้

ย้อมสไลด์ด้วยสีจิมซ่า 10% ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)pH 7.2 เป็นเวลา 20-30 นาที แล้ว ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.4 การตรวจสอบโครโมโซม การจัดคาริโอไทป์และอิดิโอแกรมมาตรฐาน

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

1) การตรวจสอบโครโมโซมเลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมระยะเมทาเฟสกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน นำมาถ่ายภาพโครโมโซมโดยใช้เลนส์วัตถุ (objective lens) กำลังขยาย 100X โดยใช้ชุดถ่ายภาพที่ต่อกับกล้องจุลทรรศน์ หรือใช้กล้องดิจิตอล เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากภาพถ่ายโครโมโซมจำนวน 100 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) เพื่อระบุชนิดของโครโมโซมและนำค่าที่ได้ไปใช้ประกอบในการจัดทำคาริโอไทป์และอิดิโอแกรม

2) การจัดทำคาริโอไทป์ ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยการกำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ วัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง จัดเรียงคาริโอไทป์ ให้เรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวาง

เป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้ายเสมอ ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่าง วางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง

การจัดทำคาริโอไทป์มาตรฐาน

1) เลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟส ที่มีขนาดของโครโมโซมไม่ยาวหรือสั้นเกินไป มีการกระจายที่ดีไม่ซ้อนทับกัน และนับจำนวนโครโมโซมได้ครบเท่ากับจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X เลือกมาจัดจำนวน ชนิดละ 20 เซลล์

2) ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยกำหนดตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ จากนั้นวัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง การวัดค่าความยาวของโครโมโซมอาจจะใช้วิธีการตัดโครโมโซมออกมาจากรูปถ่ายทีละแท่ง กำหนดหมายเลขให้โครโมโซมทุกแท่งก่อนการวัด เมื่อวัดความยาวเสร็จแล้วจึงจับคู่โครโมโซมที่มีความยาวของแขนแต่ละข้างและความยาวทั้งแท่งใกล้เคียงกันมากที่สุด

3) การคำนวณหาค่า relative length (RL) คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

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

การใช้ค่า RL นี้สามารถช่วยในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซม เพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ในทุก ๆ เซลล์ ส่วนค่าความยาวของโครโมโซมจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละเซลล์

4) การคำนวณหาค่า centromeric index (CI) คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$\text{ค่า centromeric index (CI)} = \frac{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll)}}{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}$$

นำค่า CI ที่ได้นำมาระบุชนิดของโครโมโซม โดยใช้เกณฑ์ 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

5) การกำหนดขนาดของโครโมโซม แบ่งขนาดของโครโมโซมออกเป็น 3 ขนาด โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุดเป็นโครโมโซมคู่สุดท้าย

โครโมโซมขนาดใหญ่ (large=L) คือ โครโมโซมที่มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

ดังนั้น $L > \frac{\text{LT เฉลี่ยคู่ที่ 1 + LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย}}{2}$

โครโมโซมขนาดกลาง (medium=M) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

ดังนั้น $M < \frac{\text{LT เฉลี่ยคู่ที่ 1 + LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย}}{2}$

โครโมโซมขนาดเล็ก (small=S) ได้แก่ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุด

ดังนั้น $S < \frac{\text{LT เฉลี่ยคู่ที่ 1}}{2}$

6) จัดเรียงคาริโอไทป์ ให้เรียงตามชนิดโครโมโซมก่อน แล้วค่อยเรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อยยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้าย ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่างวางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง และนิยมวางแท่งโครโมโซมให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ตรงกัน

การทำอิดิโอแกรมมาตรฐาน

อิดิโอแกรม คือ ไดอะแกรมแสดงคาริโอไทป์ของโครโมโซม 1 ชุดแฮพลอยด์ ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ โดยใช้ข้อมูลค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซม รูปร่างของโครโมโซม และตำแหน่งเซนโทรเมียร์อิดิโอแกรมจากเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาใช้เซลล์ระยะเมทาเฟสชนิดละ 20 เซลล์ นำมาจัดคาริโอไทป์ แล้ววัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว และแขนโครโมโซมข้างสั้นของโครโมโซมทุกคู่ด้วยเวอร์เนียร์(vernier) จัดทำภาพวาดอิดิโอแกรมด้วยคอมพิวเตอร์ โดยการนำค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่มาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel XP/2003 ให้แกนตั้ง (Y) เป็นความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ และแกนนอน (X) เป็นลำดับของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่เล็กที่สุด ยกเว้นโครโมโซมเพศจัดเป็นคู่สุดท้าย แล้วนำมาปรับรูปร่างของโครโมโซมโดยใช้โปรแกรม Microsoft Word XP/2003 หรือ Microsoft Powerpoint XP/2003

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ (cytogenetics) ของปลาวงศ์แมนดารินที่พบในประเทศไทยจำนวน 3 ชนิด พบว่าปลาแมนดารินแต่ละชนิดมีมาตรฐานลักษณะคาริโอไทป์ (karyotype) ที่เป็นลักษณะประจำพันธุ์ ดังนี้

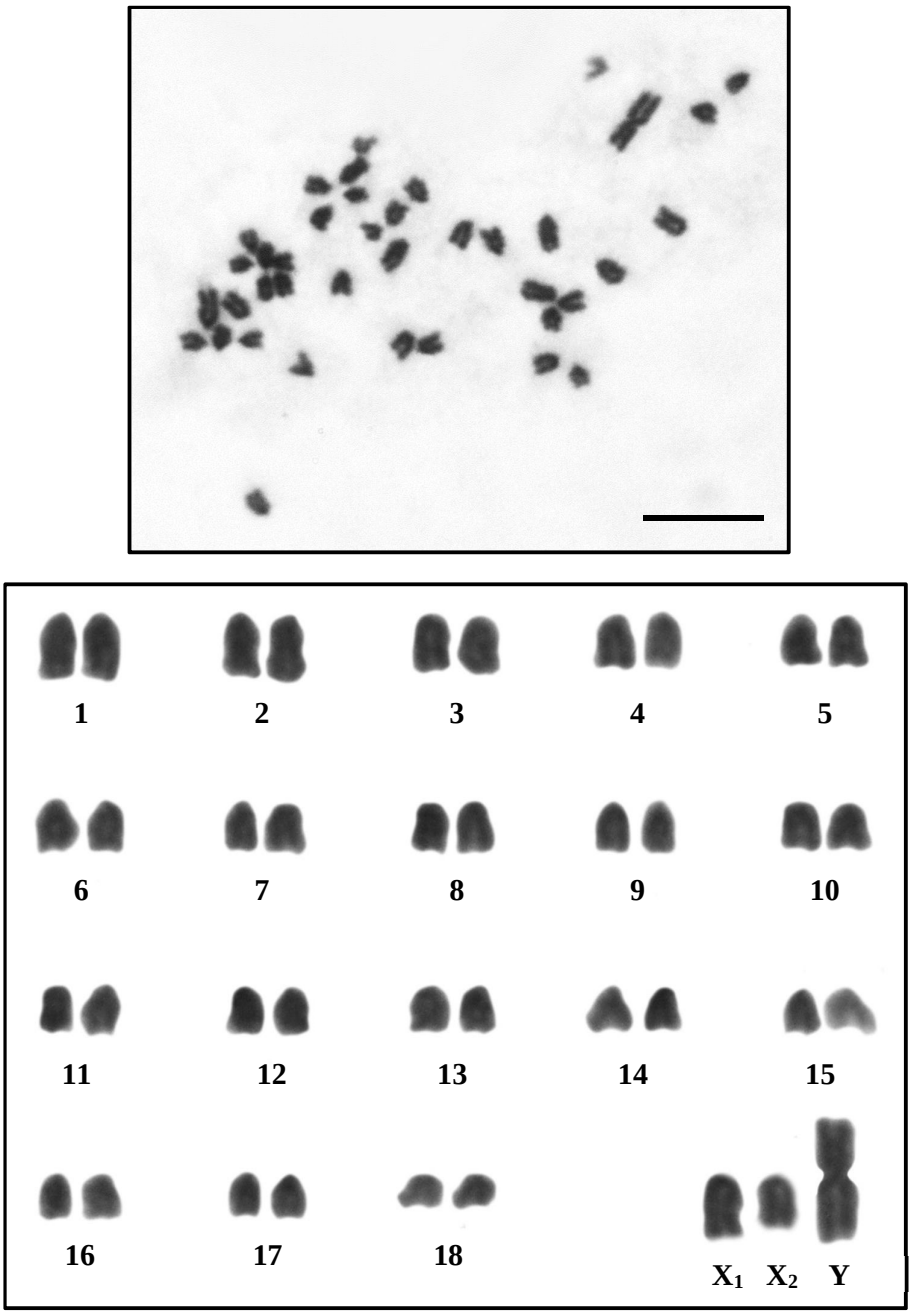
4.1 ปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropus splendidus*)

เป็นรายงานครั้งแรก (first report) ของการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาแมนดารินเขียว พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (diploid) ในเพศผู้เท่ากับ 39 แท่ง และในเพศเมียเท่ากับ 40 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number, NF) เท่ากับ 40 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ปลาแมนดารินเขียวมีระบบการกำหนดเพศแบบ $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ เป็นโครโมโซมเพศหลายแท่ง เกิดจากโครโมโซม Y เคลื่อนย้ายไปรวมกับกับโครโมโซมร่างกาย ส่งผลให้ปลาเพศผู้และปลาเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่างกัน โครโมโซมร่างกายของปลาแมนดารินเขียวประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก (telocentric) ขนาดใหญ่ 8 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 28 แท่ง โครโมโซม X_1 เป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ โครโมโซม X_2 เป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดกลาง และโครโมโซม Y เป็นชนิดเมทาเซนทริก (metacentric) ขนาดใหญ่ มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นโครโมโซมวาย และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นโครโมโซมร่างกายชนิดเทโลเซนทริกคู่ที่ 18 โดยที่โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุดประมาณ 2 เท่า จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ (nucleolar organizer regions, NORs) จำนวน 3 ตำแหน่ง (ภาพที่ 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 และ 4.5) ปลาแมนดารินเขียวมีคาริโอไทป์แบบไม่สมมาตร (asymmetrical karyotype) โดยมีโครโมโซม 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดเมทาเซนทริก และเทโลเซนทริก และมีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้

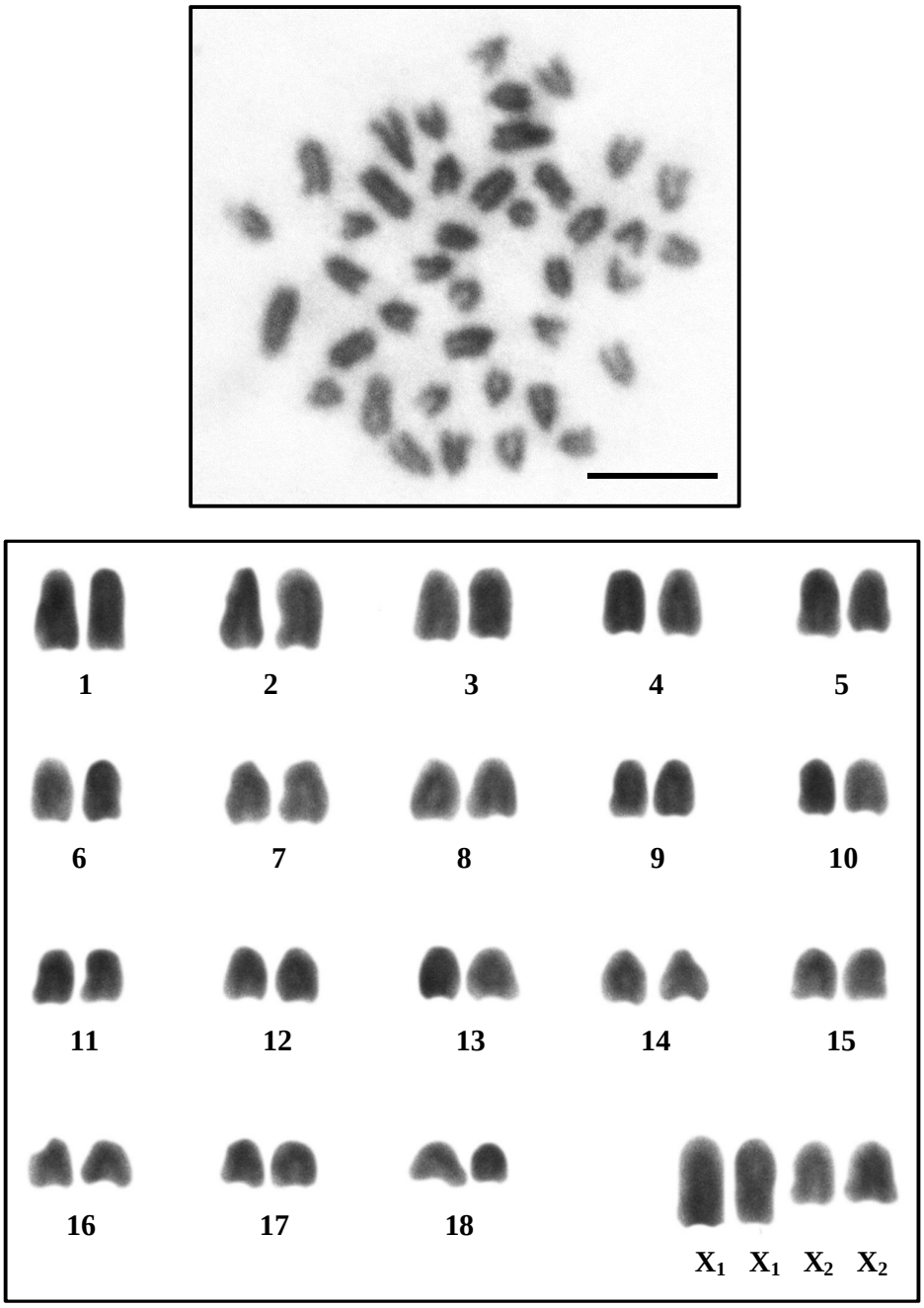
เพศผู้ $2n$ (diploid) $39 = L^t_8 + M^t_{28} + X_1X_2Y$

เพศเมีย $2n$ (diploid) $40 = L^t_8 + M^t_{28} + X_1X_1X_2X_2$

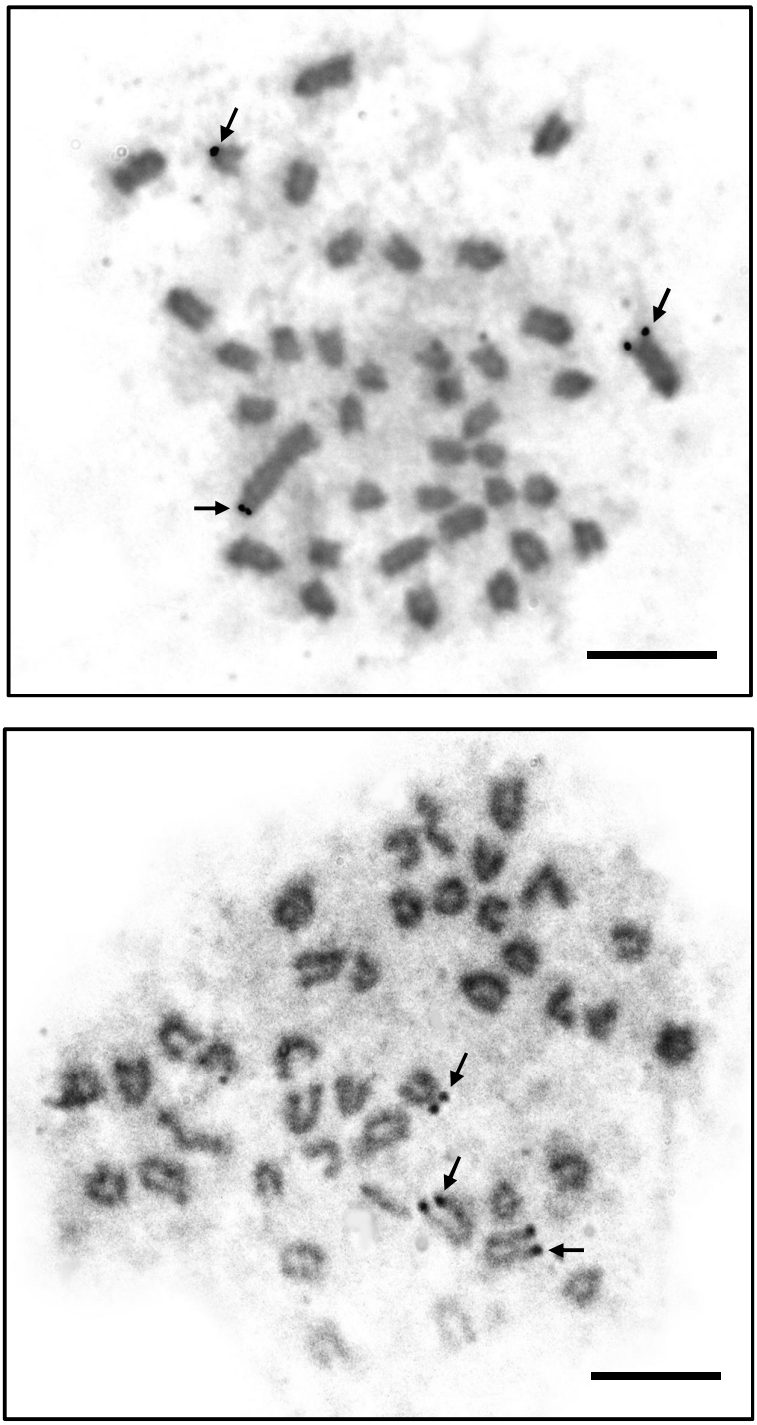
ภาพที่ 4.1 ลักษณะปลาแมนดารินเขียว (Mandarin fish, *Synchiropus splendidus*) สเกลบาร์ 3 เซนติเมตร



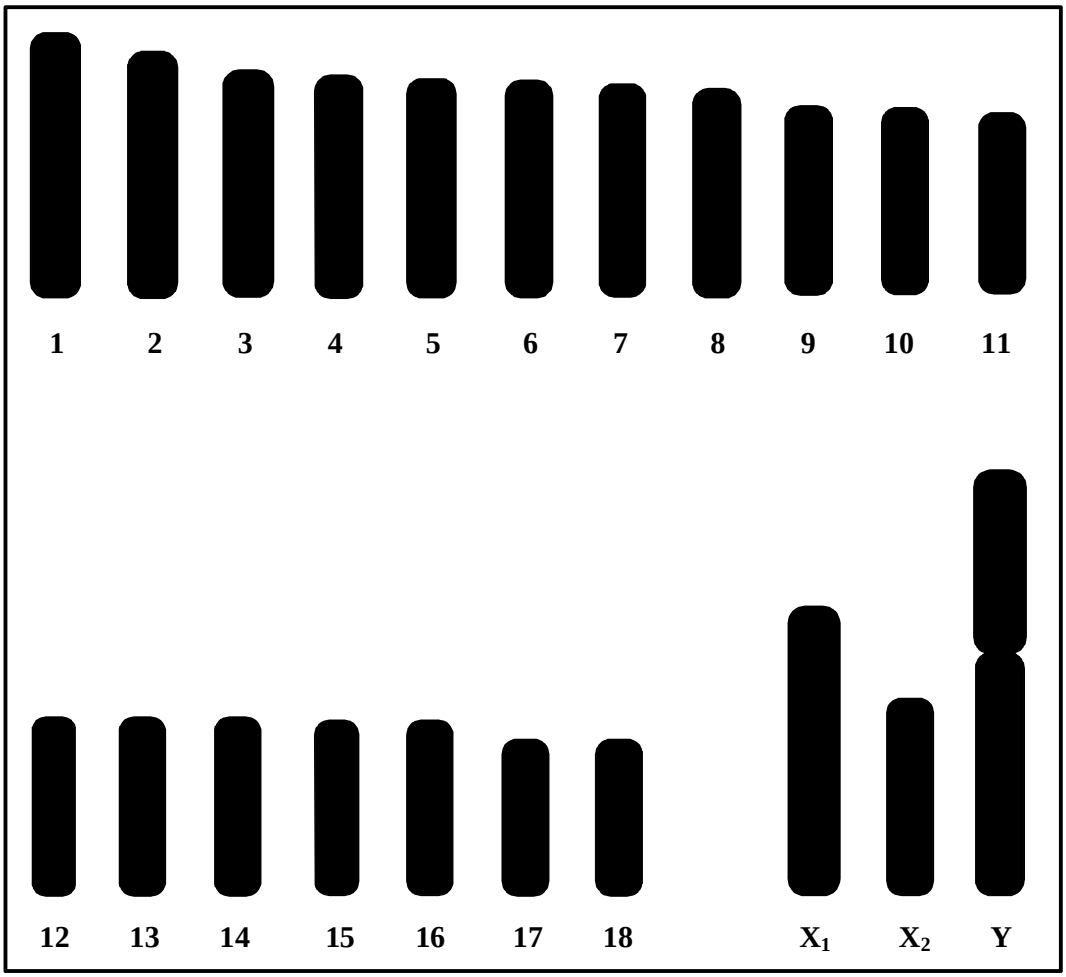
ภาพที่ 4.2 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และคาริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropus splendidus*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 39 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 4.3 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และคาริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropus splendidus*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 4.4 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซมของปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropus splendidus*) เพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 39 แท่ง (ภาพบน) และเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 40 แท่ง (ภาพล่าง) ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 4.5 อิดิโอแกรมของปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropus splendidus*) มีระบบการกำหนดเพศแบบ $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ เพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 39 แท่ง และเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; LI), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (total length; LT), ค่า relative length (RL), ค่า centromeric index (CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของค่า RL, CI ขนาดและชนิดของโครโมโซมแต่ละแท่งจากเซลล์ระยะเมทาเฟส ของปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropus splendidus*) เพศผู้และเพศเมียจำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 39 แท่งในเพศผู้ และ 40 แท่งในเพศเมีย

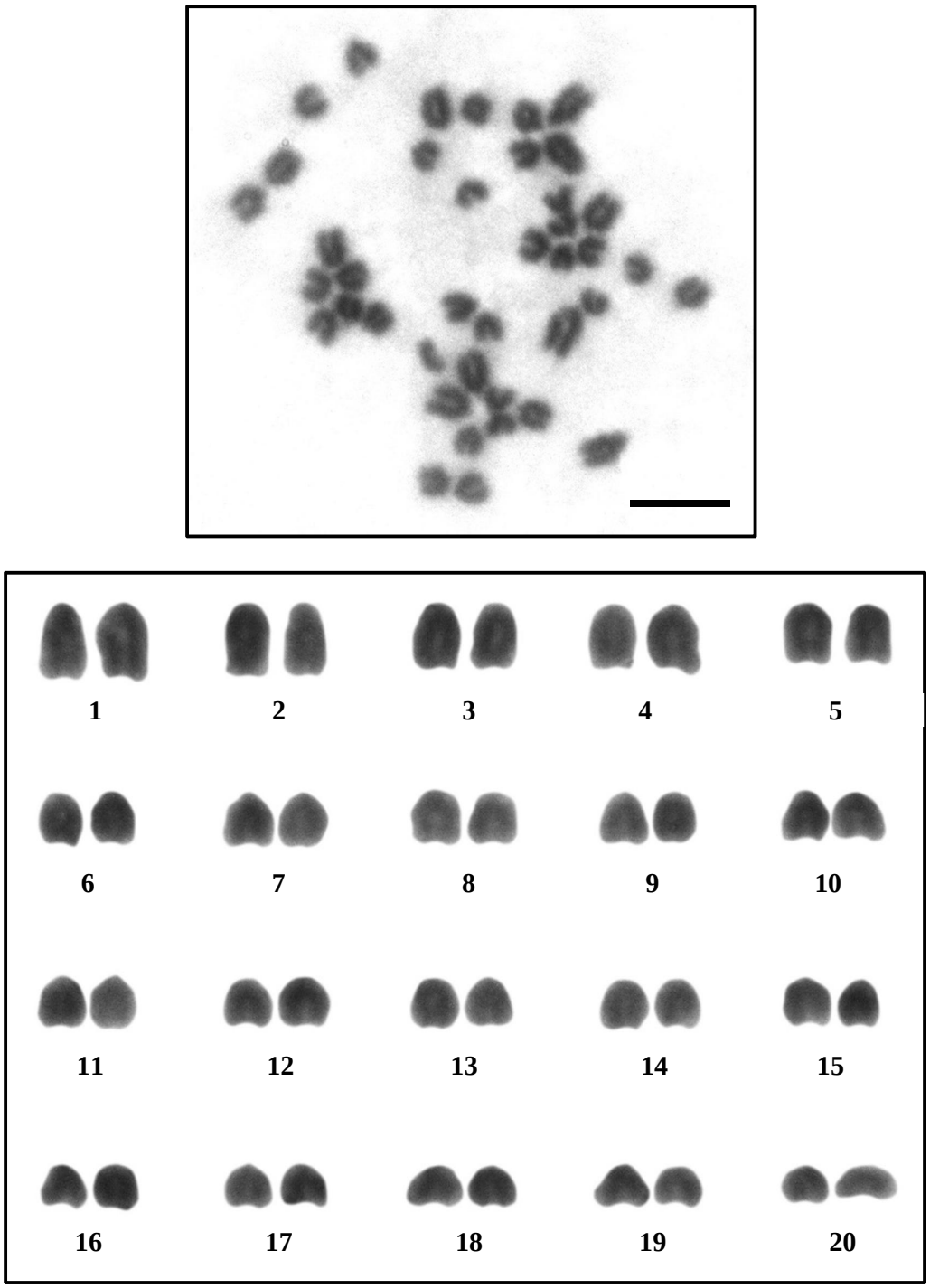
โครโมโซมคู่ที่	Ls	LI	LT	CI±SD	RL±SD	ขนาด	ชนิด
1	0.000	6.021	6.021	1.000±0.000	0.067±0.001	ใหญ่	เทโลเซนทริก
2	0.000	5.613	5.613	1.000±0.000	0.062±0.003	ใหญ่	เทโลเซนทริก
3	0.000	5.083	5.083	1.000±0.000	0.057±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
4	0.000	5.159	5.159	1.000±0.000	0.057±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
5	0.000	4.941	4.941	1.000±0.000	0.055±0.003	กลาง	เทโลเซนทริก
6	0.000	4.821	4.821	1.000±0.000	0.053±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
7	0.000	4.747	4.747	1.000±0.000	0.052±0.004	กลาง	เทโลเซนทริก
8	0.000	4.118	4.118	1.000±0.000	0.046±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
9	0.000	4.235	4.235	1.000±0.000	0.047±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
10	0.000	4.283	4.283	1.000±0.000	0.047±0.005	กลาง	เทโลเซนทริก
11	0.000	4.077	4.077	1.000±0.000	0.045±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
12	0.000	4.479	4.479	1.000±0.000	0.049±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
13	0.000	4.069	4.069	1.000±0.000	0.045±0.004	กลาง	เทโลเซนทริก
14	0.000	3.974	3.974	1.000±0.000	0.044±0.001	กลาง	เทโลเซนทริก
15	0.000	4.055	4.055	1.000±0.000	0.045±0.003	กลาง	เทโลเซนทริก
16	0.000	3.951	3.951	1.000±0.000	0.043±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
17	0.000	3.560	3.570	1.000±0.000	0.039±0.001	กลาง	เทโลเซนทริก
18	0.000	3.574	3.564	1.000±0.000	0.019±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
X_1	0.000	6.582	6.582	1.000±0.000	0.073±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
X_1	0.000	4.967	4.967	1.000±0.000	0.055±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
Y	5.304	5.519	10.823	0.510±0.001	0.076±0.002	ใหญ่	เมทาเซนทริก

4.2 ปลาแมนดารินจุด (*Synchiropus picturatus*)

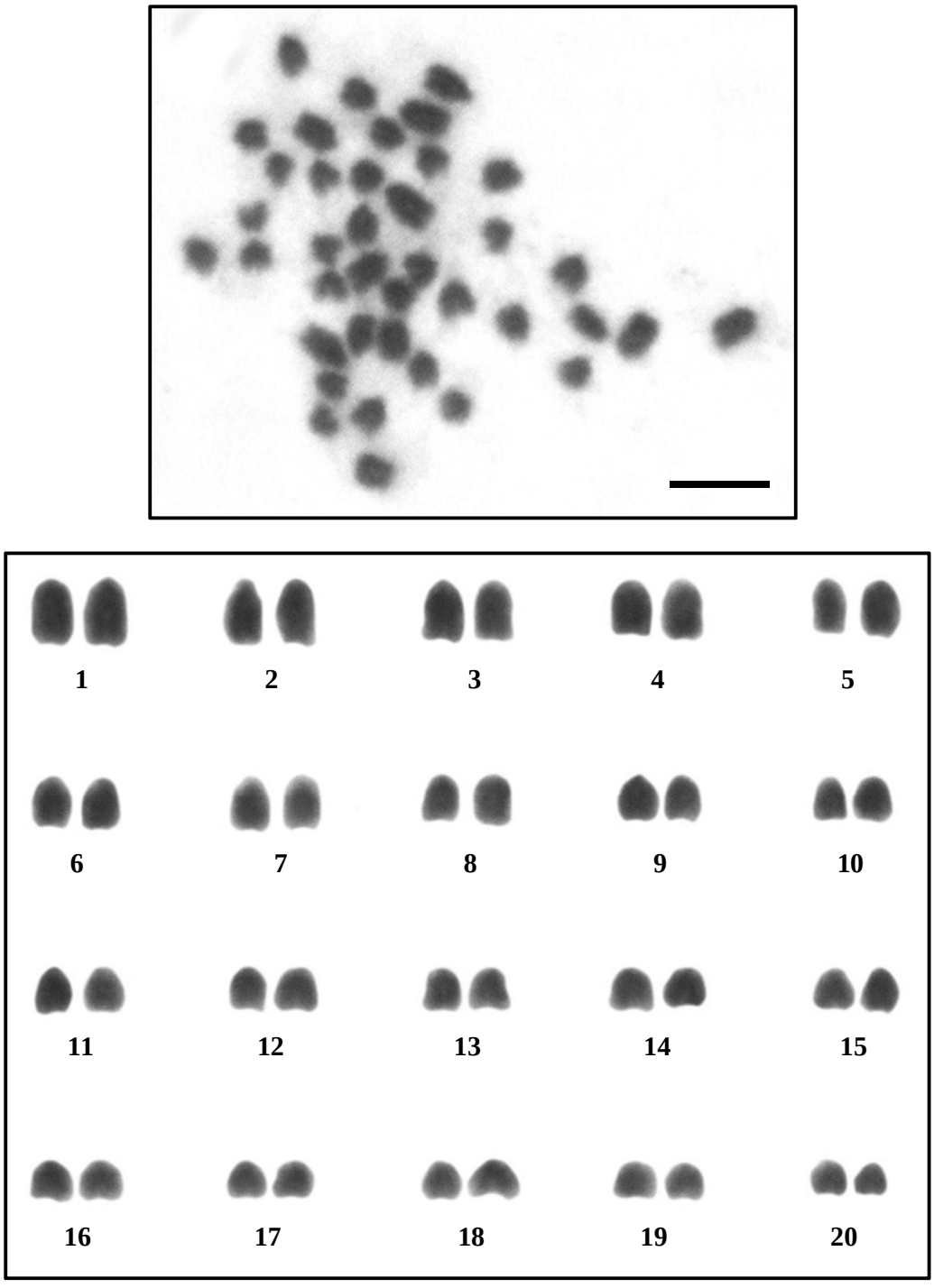
เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาแมนดารินจุด พบว่ามีจำนวนโครโมโซม ดิพลอด์เท่ากับ 40 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 40 ไม่พบความแตกต่างของคาริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาแมนดารินจุดประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 14 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 24 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิดเทโลเซนทริก และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นชนิดเทโลเซนทริก โดยที่โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุดประมาณ 2 เท่า จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่งทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (ภาพที่ 4.6, 4.7, 4.8. 4.9 และ 4.10) ปลาแมนดารินจุดมีคาริโอไทป์แบบไม่สมมาตร โดยมีโครโมโซมเพียงชนิดเดียว คือ ชนิดเทโลเซนทริก และมีสูตรคาริโอไทป์ดังนี้

$2n$ (diploid) $40 = L^{t}_{14} + M^{t}_{24} + S^{t}_{2}$

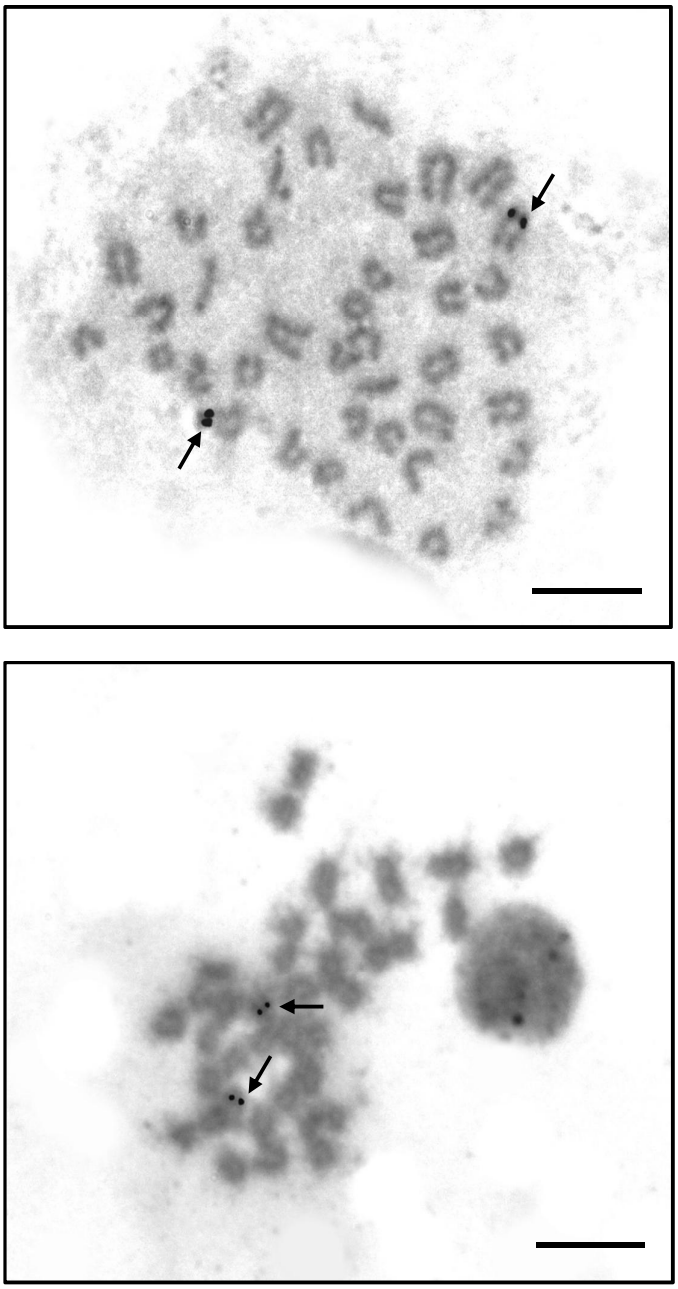
ภาพที่ 4.6 ลักษณะปลาแมนดารินจุด (Picturesque dragonet, *Synchiropus picturatus*) สเกลบาร์ 3 เซนติเมตร



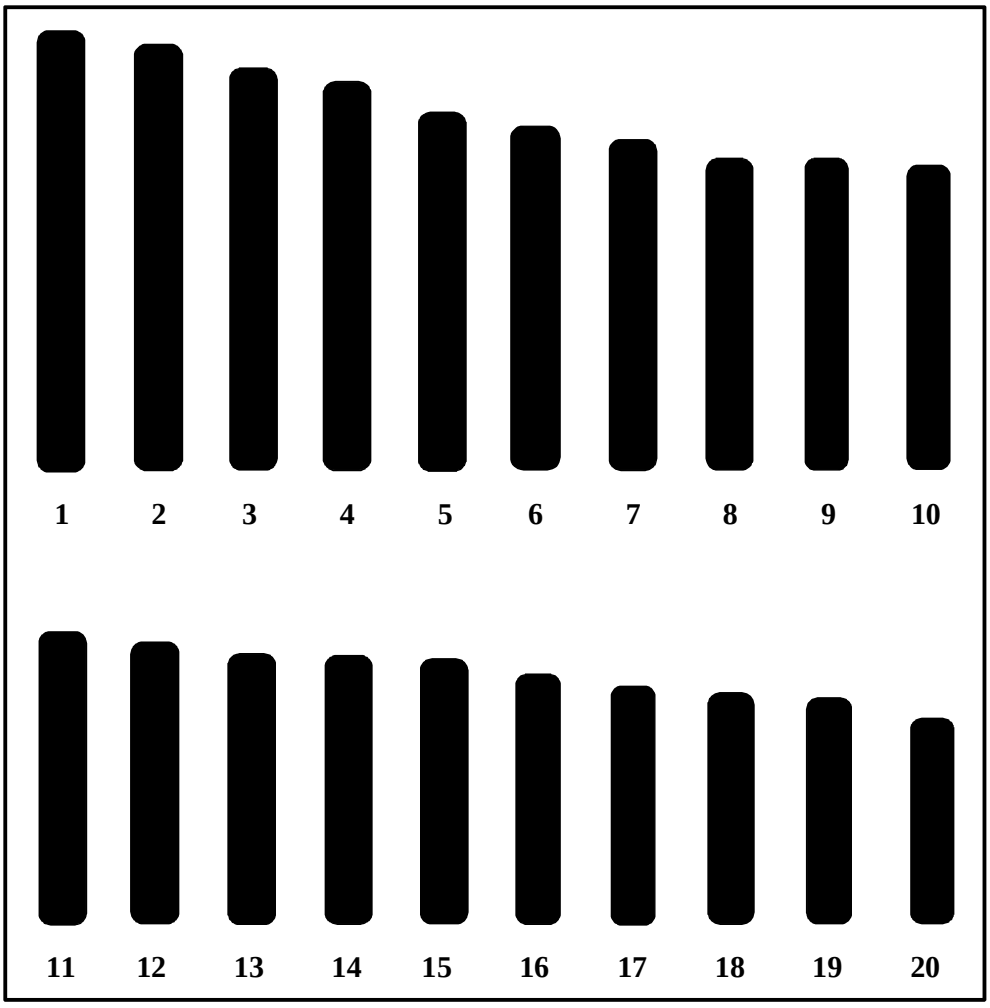
ภาพที่ 4.7 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และคาริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาแมนดารินจุด (*Synchiropus picturatus*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 4.8 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และคาริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาแมนดารินจุด (*Synchiropus picturatus*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 4.9 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซมของปลาแมนดารินจุด (*Synchiropus picturatus*) เพศผู้ (ภาพบน) และเพศเมีย (ภาพล่าง) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 4.10 อิดิโอแกรมของปลาแมนดารินจุด (*Synchiropus picturatus*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; LI), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (total length; LT), ค่า relative length (RL), ค่า centromeric index (CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของค่า RL, CI ขนาดและชนิดของโครโมโซมแต่ละแท่งจากเซลล์ระยะเมทาเฟส ของปลาแมนดารินจุด (*Synchiropus picturatus*) เพศผู้และเพศเมียจำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง

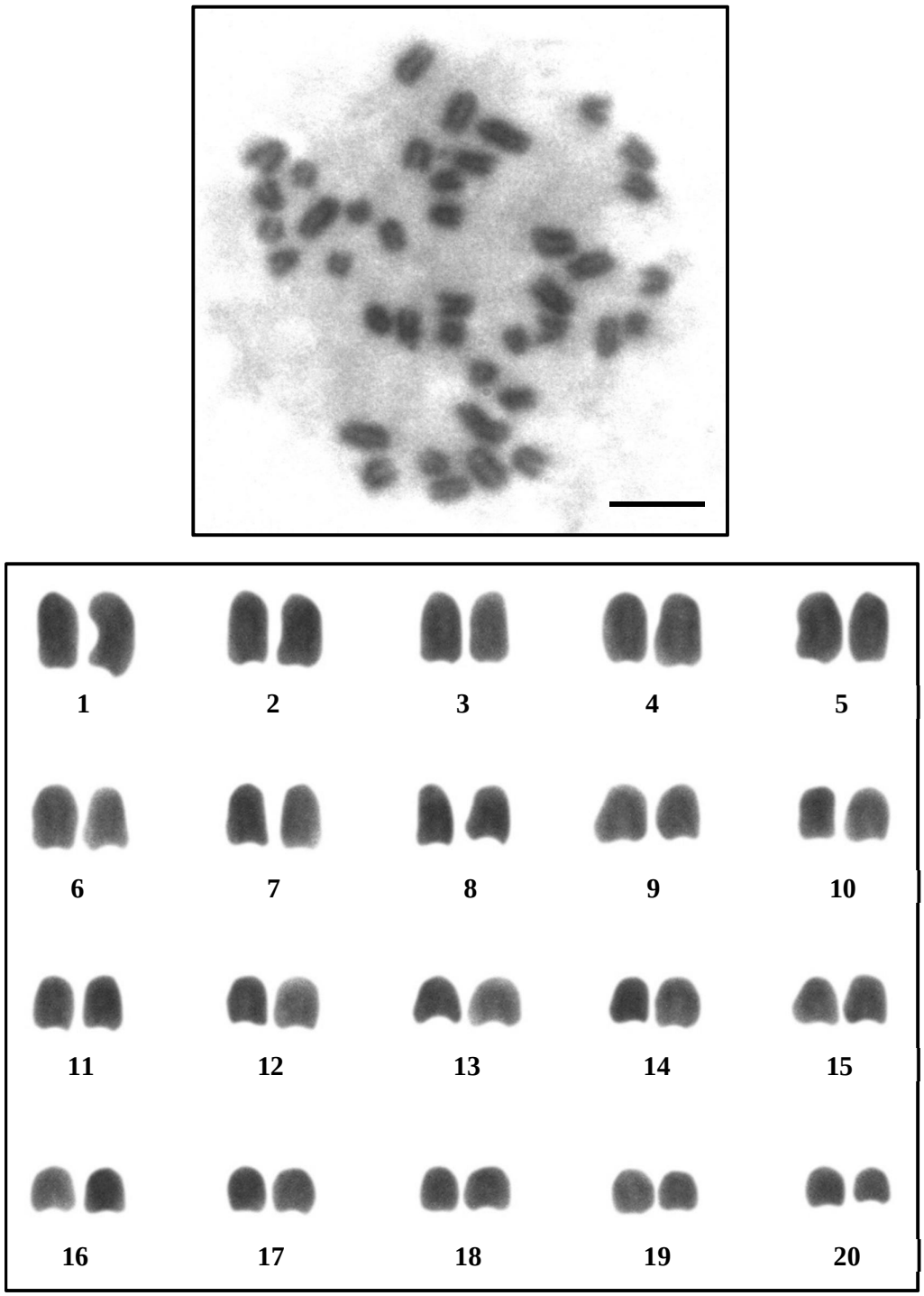
โครโมโซมคู่ที่	Ls	LI	LT	CI±SD	RL±SD	ขนาด	ชนิด
1	0.000	6.085	6.085	1.000±0.000	0.072±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
2	0.000	5.893	5.893	1.000±0.000	0.069±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
3	0.000	5.556	5.556	1.000±0.000	0.065±0.001	ใหญ่	เทโลเซนทริก
4	0.000	5.368	5.368	1.000±0.000	0.063±0.003	ใหญ่	เทโลเซนทริก
5	0.000	4.936	4.936	1.000±0.000	0.058±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
6	0.000	4.551	4.551	1.000±0.000	0.054±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
7	0.000	4.748	4.748	1.000±0.000	0.056±0.003	ใหญ่	เทโลเซนทริก
8	0.000	4.288	4.288	1.000±0.000	0.051±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
9	0.000	4.312	4.312	1.000±0.000	0.051±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
10	0.000	4.050	4.050	1.000±0.000	0.048±0.004	กลาง	เทโลเซนทริก
11	0.000	4.195	4.195	1.000±0.000	0.049±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
12	0.000	3.713	3.713	1.000±0.000	0.044±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
13	0.000	3.880	3.880	1.000±0.000	0.046±0.005	กลาง	เทโลเซนทริก
14	0.000	3.643	3.643	1.000±0.000	0.043±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
15	0.000	3.736	3.736	1.000±0.000	0.044±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
16	0.000	3.458	3.458	1.000±0.000	0.041±0.004	กลาง	เทโลเซนทริก
17	0.000	3.286	3.286	1.000±0.000	0.039±0.001	กลาง	เทโลเซนทริก
18	0.000	3.190	3.190	1.000±0.000	0.038±0.003	กลาง	เทโลเซนทริก
19	0.000	3.118	3.118	1.000±0.000	0.037±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
20	0.000	2.830	2.830	1.000±0.000	0.033±0.001	เล็ก	เทโลเซนทริก

4.3 ปลาสกูตเตอร์ (*Synchiropus ocellatus*)

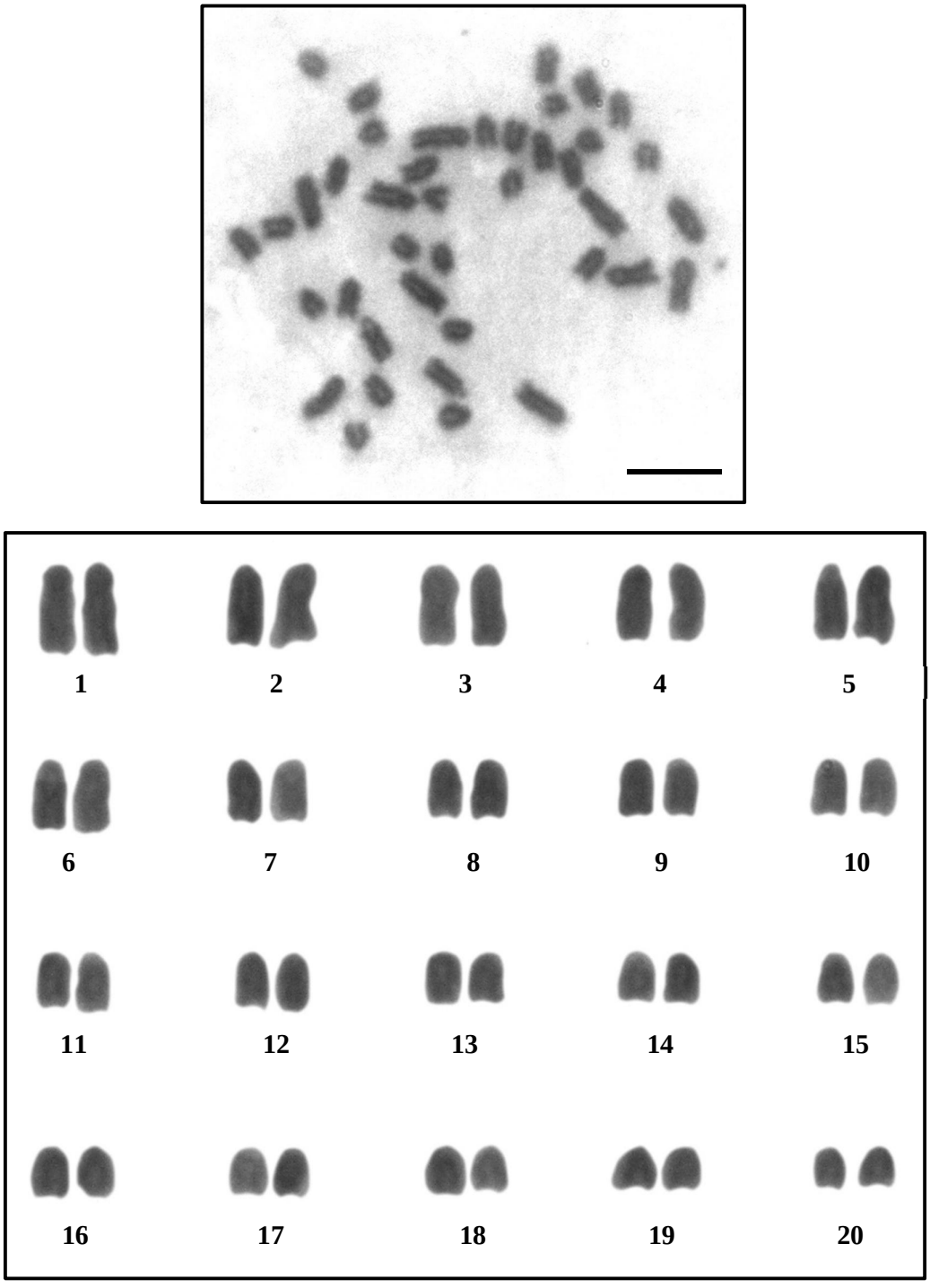
เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาสกูตเตอร์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 40 ไม่พบความแตกต่างของคาริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาสกูตเตอร์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 16 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 18 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 6 แท่ง มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิดเทโลเซนทริก และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นชนิดเทโลเซนทริก โดยที่โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุดประมาณ 3 เท่า จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่งทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (ภาพที่ 4.11, 4.12, 4.13. 4.14 และ 4.15) ปลาสกูตเตอร์มีคาริโอไทป์แบบไม่สมมาตร โดยมีโครโมโซมเพียงชนิดเดียว คือ ชนิดเทโลเซนทริก และมีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้

$2n$ (diploid) $40 = L^{t}_{16} + M^{t}_{18} + S^{t}_{6}$

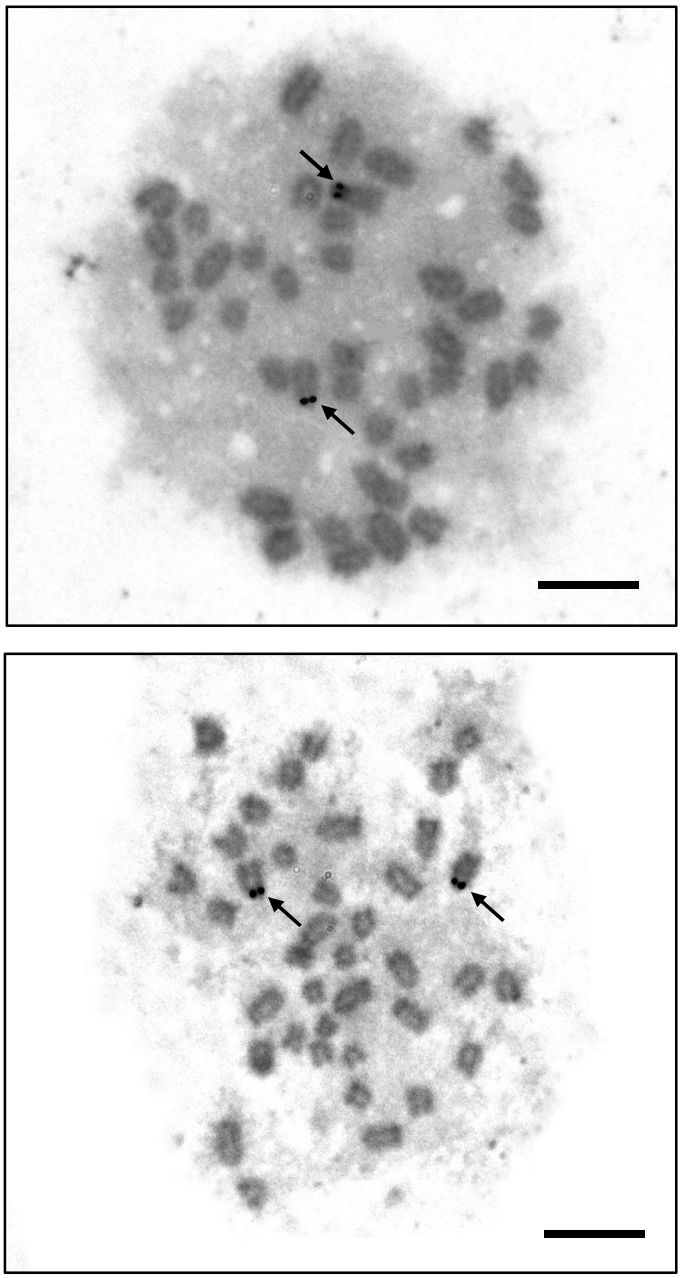
ภาพที่ 4.11 ลักษณะปลาสกูตเตอร์ (Ocellated dragonet, *Synchiropus ocellatus*) สเกลบาร์ 1 เซนติเมตร



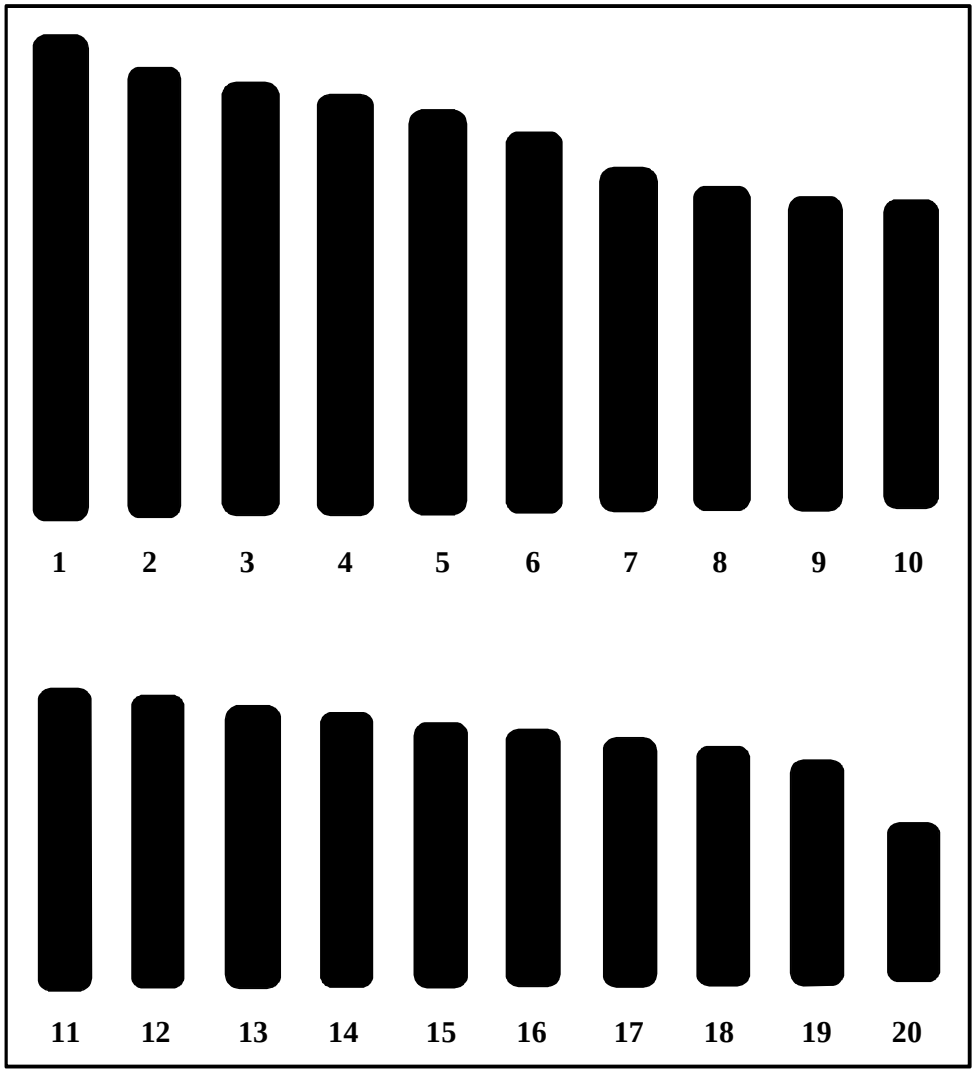
ภาพที่ 4.12 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และคาริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาสกูตเตอร์ (*Synchiropus ocellatus*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 4.13 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และคาริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาสกูตเตอร์ (*Synchiropus ocellatus*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 4.14 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซมของปลาสกูตเตอร์ (*Synchiropus ocellatus*) เพศผู้ (ภาพบน) และเพศเมีย (ภาพล่าง) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ (สเกลบาร์ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 4.15 อิดิโอแกรมของปลาสกูตเตอร์ (*Synchiropus ocellatus*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; LI), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (total length; LT), ค่า relative length (RL), ค่า centromeric index (CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของค่า RL, CI ขนาดและชนิดของโครโมโซมแต่ละแท่งจากเซลล์ระยะเมทาเฟส ของปลาสกุตเตอร์ (*Synchiropus ocellatus*) เพศผู้และเพศเมียจำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	Ls	LI	LT	CI±SD	RL±SD	ขนาด	ชนิด
1	0.000	6.557	6.557	1.000±0.000	0.076±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
2	0.000	6.076	6.076	1.000±0.000	0.070±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
3	0.000	5.842	5.842	1.000±0.000	0.068±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
4	0.000	5.669	5.669	1.000±0.000	0.066±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
5	0.000	5.456	5.456	1.000±0.000	0.063±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
6	0.000	5.134	5.134	1.000±0.000	0.059±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
7	0.000	4.628	4.628	1.000±0.000	0.054±0.002	ใหญ่	เทโลเซนทริก
8	0.000	4.358	4.358	1.000±0.000	0.050±0.001	ใหญ่	เทโลเซนทริก
9	0.000	4.232	4.232	1.000±0.000	0.049±0.001	กลาง	เทโลเซนทริก
10	0.000	4.157	4.157	1.000±0.000	0.048±0.001	กลาง	เทโลเซนทริก
11	0.000	4.081	4.081	1.000±0.000	0.047±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
12	0.000	3.929	3.929	1.000±0.000	0.046±0.002	กลาง	เทโลเซนทริก
13	0.000	3.809	3.809	1.000±0.000	0.044±0.001	กลาง	เทโลเซนทริก
14	0.000	3.711	3.711	1.000±0.000	0.043±0.001	กลาง	เทโลเซนทริก
15	0.000	3.570	3.570	1.000±0.000	0.041±0.001	กลาง	เทโลเซนทริก
16	0.000	3.468	3.468	1.000±0.000	0.040±0.001	กลาง	เทโลเซนทริก
17	0.000	3.346	3.346	1.000±0.000	0.039±0.001	กลาง	เทโลเซนทริก
18	0.000	3.208	3.208	1.000±0.000	0.037±0.001	เล็ก	เทโลเซนทริก
19	0.000	3.027	3.027	1.000±0.000	0.035±0.001	เล็ก	เทโลเซนทริก
20	0.000	2.120	2.120	1.000±0.000	0.024±0.016	เล็ก	เทโลเซนทริก

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาแมนดารินจำนวน 3 ชนิด ในประเทศไทย เตรียมโครโมโซมด้วยวิธีตรงและวิธีอ้อม ได้ผลการวิจัย ดังนี้

5.1.1 ปลาแมนดารินเขียว (*Synchiropus splendidus*)

ปลาแมนดารินเขียวมีจำนวนโครโมโซมดิพลอด์ในเพศผู้เท่ากับ 39 แท่ง และในเพศเมียเท่ากับ 40 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 40 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ปลาแมนดารินเขียวมีระบบการกำหนดเพศแบบ $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ เป็นโครโมโซมเพศหลายแท่ง เกิดจากโครโมโซม Y เคลื่อนย้ายไปรวมกับกับโครโมโซมร่างกาย ส่งผลให้ปลาเพศผู้และปลาเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่างกัน โครโมโซมร่างกายของปลาแมนดารินเขียวประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 8 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 28 แท่ง โครโมโซม X_1 เป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ โครโมโซม X_2 เป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดกลาง และโครโมโซม Y เป็นชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นโครโมโซมวาย และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นโครโมโซมร่างกายชนิดเทโลเซนทริกคู่ที่ 18 โดยที่โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุดประมาณ 2 เท่า จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์จำนวน 3 ตำแหน่ง ปลาแมนดารินเขียวมีคาริโอไทป์แบบไม่สมมาตร โดยมีโครโมโซม 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดเมทาเซนทริก และเทโลเซนทริก และมีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้

เพศผู้ $2n$ (diploid) $39 = L^t_8 + M^t_{28} + X_1X_2Y$

เพศเมีย $2n$ (diploid) $40 = L^t_8 + M^t_{28} + X_1X_1X_2X_2$

5.1.2 ปลาแมนดารินจุด (*Synchiropus picturatus*)

ปลาแมนดารินจุดมีจำนวนโครโมโซม ดิพลอด์เท่ากับ 40 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 40 ไม่พบความแตกต่างของคาริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาแมนดารินจุดประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 14 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 24 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิดเทโลเซนทริก และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นชนิดเทโลเซนทริก โดยที่โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุดประมาณ 2 เท่า จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่งทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ปลาแมนดารินจุดมีคาริโอไทป์แบบไม่สมมาตร โดยมีโครโมโซมเพียงชนิดเดียว คือ ชนิดเทโลเซนทริก และมีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้

$2n$ (diploid) $40 = L^t_{14} + M^t_{24} + S^t_2$

5.1.3 ปลาสกูตเตอร์ (*Synchiropus ocellatus*)

ปลาสกูตเตอร์มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 40 ไม่พบความแตกต่างของคาริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาสกูตเตอร์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 16 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 18 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 6 แท่ง มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิดเทโลเซนทริก และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นชนิดเทโลเซนทริก โดยที่โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุดประมาณ 3 เท่า จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่งทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ปลาสกูตเตอร์มีคาริโอไทป์แบบไม่สมมาตร โดยมีโครโมโซมเพียงชนิดเดียว คือ ชนิดเทโลเซนทริก และมีสูตรคาริโอไทป์ดังนี้

$2n$ (diploid) $40 = L^{t}_{16} + M^{t}_{18} + S^{t}_{6}$

5.2 วิจารณ์ผลการวิจัย

เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ในปลาแมนดาริน (วงศ์ Callionymidae) จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ ปลาแมนดารินเขียว ปลาแมนดารินจุด และปลาสกูตเตอร์ (มีรายงานมาก่อนหน้านี้ในประชากรของประเทศญี่ปุ่นจำนวน 5 ชนิด) จากการตรวจสอบเอกสารพบว่าในปัจจุบันมีปลาทะเลไม่น้อยกว่า 13,000 ชนิด โดยในจำนวนนี้มีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ 1,200 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 9.23 ส่วนใหญ่มีโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 48 แท่ง คิดเป็นร้อยละ 54 (พบ 648 ชนิดจากจำนวน 1,200 ชนิด) ในกลุ่มปลากระดูกแข็ง (osteicthyes) โครโมโซมดิพลอยด์จะมีความผันแปรมาก มีโครโมโซมดิพลอยด์น้อยสุด 22 แท่ง ในปลานกขุนทองชนิด *Xyrichthys twistii* (วงศ์ Labridae) และปลาที่อาศัยอยู่ในทวีปอาร์กติกชนิด *Notothenia coriiceps* (วงศ์ Nototheiidae) จนมีโครโมโซมดิพลอยด์มากสุดระหว่าง 240 ถึง 280 แท่ง ในปลาสเตอเจียน (วงศ์ Acipenseridae) ซึ่งโครโมโซมมีขนาดเล็กมาก (คล้ายจุด) และคาดว่าเกิดจากการที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 4 ชุด ($4n$, tetraploid) สำหรับกลุ่มปลากระดูกอ่อน (chondrichthyes) ในวงศ์ฉลามปากเป็ด (Polyodontidae) มีโครโมโซมดิพลอยด์ระหว่าง 112 ถึง 120 แท่ง ในปลากระเบน (ชั้น Elasmobranchii) พบว่าร้อยละ 55 ที่มีรายงานการศึกษาโครโมโซม มีโครโมโซมดิพลอยด์ระหว่าง 64 ถึง 86 แท่ง (NF = 90 ถึง 124) (Galetti *et al*., 2000)

จากการตรวจสอบเอกสารรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้พบว่าปลาในวงศ์ Callionymidae มีจำนวนโครโมโซมอยู่ 4 รูปแบบ ได้แก่ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 32, 36, 37 และ 38 แท่ง (Arai, 2011) ซึ่งแตกต่างกับรายงานการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าปลาแมนดารินเขียว ปลาแมนดารินจุด และปลาสกูตเตอร์มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 39 หรือ 40, 40 และ 40 แท่ง ตามลำดับ และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 40 ในทุกชนิด เมื่อทำการเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าปลาวงศ์นี้จะมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานอยู่ในช่วง 34-74 (Arai, 2011)

ปลาแมนดารินเขียวมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 39 แท่งในเพศผู้ เป็นโครโมโซมร่างกายชนิดเทโลเซนทริก 36 แท่ง และโครโมโซมเพศเป็น X_1X_1Y ปลาเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง เป็นโครโมโซมร่างกายชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด 40 แท่ง และมีโครโมโซมเพศเป็น $X_1X_1X_2X_2$ โดยโครโมโซม X_1 เป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ โครโมโซม X_2 เป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดกลาง และโครโมโซม Y เป็นชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ สำหรับปลาแมนดารินจุด และปลาสกูตเตอร์มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 40 แท่ง โครโมโซมประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด 40 แท่ง และตรวจไม่พบความแตกต่างของโครโมโซมเพศ (ตารางที่ 5.1) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าปลาในวงศ์ Callionymidae โครโมโซมประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด และในปลาบางชนิดพบโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกเพิ่มขึ้นมา 1-2 แท่ง ยกเว้นในปลา *Repomucenus richardsonii* จากประชากร Hyogo ของประเทศญี่ปุ่นมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 38 แท่ง โครโมโซมประกอบด้วยโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก 36 แท่ง และเทโลเซนทริก 2 แท่ง (Sawada and Sakamoto, 1980; Murofushi et al., 1983, 1984; Ojima and Kikuno, 1987; Arai, 2011)

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าปลาแมนดารินจุดและปลาสกูตเตอร์ ไม่มีความแตกต่างของคาริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งสอดคล้องกับปลา *Eleutherochir mirabilis*, *Repomucenus huguenini* และ *R. richardsonii* ที่อยู่ในวงศ์เดียวกันที่ไม่พบความแตกต่างของโครโมโซมเพศ (Sawada and Sakamoto, 1980; Murofushi et al., 1984; Ojima and Kikuno, 1987; Arai, 2011) สำหรับในปลาแมนดารินเขียวจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเพศเมียมีโครโมโซมเพศเป็น $X_1X_1X_2X_2$ และเพศผู้มีโครโมโซมเพศ X_1X_2Y โดยปลาเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมมากกว่าปลาเพศผู้ 1 แท่ง เกิดจากโครโมโซม Y เคลื่อนย้ายไปรวมกับกับโครโมโซมร่างกาย ส่งผลให้ปลาเพศผู้และปลาเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่างกัน โดยโครโมโซม X_1 เป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ โครโมโซม X_2 เป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดกลาง และโครโมโซม Y เป็นชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของปลาที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน (Callionymidae) ที่พบได้ในปลา *Repomucenus beniteguri* และ *R. ornatipinnis* ที่เพศผู้และเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากันและมีระบบการกำหนดเพศแบบ $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ เช่นเดียวกัน (Murofushi et al., 1983; Arai, 2011)

ปลาเป็นสัตว์ที่มีระบบการควบคุมลักษณะความเป็นเพศที่หลากหลาย นอกจากนี้ยังพบว่าในปลาบางชนิดแสดงลักษณะการเป็นกระเทย (hermaphrodite) บางชนิดสามารถเปลี่ยนแปลงเพศได้ (sex reversed) และมีปลาหลายชนิดที่กำหนดเพศด้วยยีน จากการศึกษาพบว่าในปลาทะเลจะมีรูปแบบการกำหนดเพศด้วยโครโมโซมเพศเพียงไม่กี่ชนิด ซึ่งแตกต่างจากปลาน้ำจืดที่มีการรายงานโครโมโซมเพศเอาไว้เป็นจำนวนมาก ในปลาทะเลจะพบรูปแบบการกำหนดเพศด้วยโครโมโซมเพศ 5 ระบบ ได้แก่ XX/XY (เพศผู้ XY เพศเมีย XX), XX/XO (เพศผู้ XO เพศเมีย XX), ZZ/ZW (เพศผู้ ZZ เพศเมีย ZW), ZZ/ZW_1W_2 (เพศผู้ ZZ เพศเมีย ZW_1W_2) และ $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (เพศผู้ X_1X_2Y เพศเมีย $X_1X_1X_2X_2$)) (Galetti *et al*., 2000)

จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบว่าปลาแมนดารินจุดและปลาสกูตเตอร์มีตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง สอดคล้องกับปลาในวงศ์เดียวกันที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ในปลา *Repomucenus beniteguri*, *R. huguenini*, *R. ornatipinnis* และ *R. richardsonii* ที่พบว่ามีตำแน่งนอร์ 2 ตำแหน่งเช่นเดียวกัน (Murofushi et al., 1983, 1984; Ojima and Kikuno, 1987; Arai, 2011) แต่แตกต่างกับรายงานการศึกษาในครั้งนี้ในปลาแมนดารินเขียวที่ตรวจพบตำแหน่งนอร์ 3 ตำแหน่งทั้งในปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย

สาเหตุของความผันแปรของโครโมโซมในปลาทะเล (รวมทั้งวงศ์ปลาแมนดาริน) จากการศึกษาพบว่าบรรพบุรุษของปลากระดูกแข็งมีสมมุติฐานว่ามีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 48 แท่ง และเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด (NF = 48) ซึ่งลักษณะคาริโอไทป์ดังกล่าวยังสามารถพบได้ในปลาทะเลหลายชนิด โดยเฉพาะในอันดับปลากะพงซึ่งเป็นอันดับที่มีความหลากชนิดพันธุ์มากที่สุด ในการพิจารณาถึงการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมจะพิจารณาจากโครโมโซมดิพลอยด์และชนิดของโครโมโซมในปลาชนิดต่าง ๆ ในแต่ละวงศ์ ในกรณีที่มีโครโมโซมเป็นชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด ถือว่าเป็นกลุ่มที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และจัดว่าเป็นคาริโอไทป์แบบโบราณ (primitive stage) ดังที่พบได้ในวงศ์ปลาผีเสื้อ และวงศ์ปลาสร้อยนกเขาทะเล ที่พบว่าปลาทั้งสองวงศ์นี้มีการแพร่กระจายตัวเป็นวงกว้างตามแนวปะการัง ที่จะส่งผลให้มีสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ระหว่างประชากรต่ำ ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายของยีนได้สูง (gene flow) ซึ่งเป็นไปตามโมเดลพันธุศาสตร์ประชากรดั้งเดิมตามทฤษฎีของแลนเด (Lande) ค.ศ. 1979 ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมาก ระหว่างการไม่มีสิ่งขวางกั้นทางภูมิศาสตร์จากสภาพแวดล้อมในทะเล และการเคลื่อนที่ในระดับสูงของกลุ่มปลาทะเล ที่จะส่งผลทำให้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม นอกจากนี้ยังพบว่าคาริโอไทป์เดิมที่มีโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากมีการรักษาความสมดุลในระดับของเซลล์ โดยจะมีเปลี่ยนแปลงได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในทางตรงกันข้ามสำหรับกลุ่มปลาที่ถูกจำกัดการแพร่กระจายตัว ร่วมกับการที่มีสภาพแวดล้อมทางทะเลที่มีความแตกต่างกันมาก พบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมสูงมาก ซึ่งรวมถึงการพัฒนาเปลี่ยนแปลงในระดับประชากรด้วย

จากสมมุติฐานดังกล่าวข้างต้นส่งผลทำให้ปลาทะเลมีคาริโอไทป์ที่ไม่หลากหลายเท่ากับปลาน้ำจืด (น้ำทะเลส่วนใหญ่เป็นผืนเดียวกันทั่วโลก) แต่เมื่อมีการพิจารณาลงไปในระดับชนิดพันธุ์ของปลาแต่ละวงศ์ พบว่าจะมีความผันแปรของจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันดังที่กล่าวมาแล้ว จากการศึกษาพบว่ากลไกการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม ที่ทำให้เกิดความผันแปรของโครโมโซมปลาทะเลจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่สำคัญ 3 กระบวนการ ได้แก่ 1) การหักและต่อสลับใหม่แบบมีเซนโทรเมียร์ร่วมด้วย 2) การเชื่อมรวมกันของโครโมโซม และ 3) การหักของชิ้นส่วนของโครโมโซม วงศ์ปลาทะเลที่มีวิวัฒนาการเปลี่ยนแปลงทางโครโมโซมนั้น อาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการใดกระบวนการหนึ่ง หรือทุกกระบวนการก็เป็นไปได้ ซึ่งทำให้มีลักษณะเฉพาะในแต่ละวงศ์ที่แตกต่างกันออกไป (Ojima and Kashiwagi, 1981; Ojima, 1983; Galetti *et al*., 2000)

ตารางที่ 5.1 ผลการศึกษาลักษณะของคาริโอไทป์ในปลาแมนดาริน (วงศ์ Callionymidae) ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้

ชนิด	2*n*	NF	NORs	สูตรคาริโอไทป์	แหล่งตัวอย่าง	อ้างอิง
Synchiropus splendidus	39, 40	40	3	36t+$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	Thailand	การศึกษาในครั้งนี้
S. picturatus	40	40	2	40t	Thailand	การศึกษาในครั้งนี้
S. ocellatus	40	40	2	40t	Thailand	การศึกษาในครั้งนี้
Eleutherochir mirabilis	36	36	-	36a	Japan	Sawada and Sakamoto (1980)
Repomucenus beniteguri	38	38	-	38st	Japan	Murofushi et al. (1983)
	37	38	2	1m+36st	Japan	Murofushi et al. (1983)
R. huguenini	32	34	2	2m+30a	Japan	Murofushi et al. (1984)
R. ornatipinnis	38	38	-	38st	Japan	Murofushi et al. (1983)
	37	38	2	1m+36st	Japan	Murofushi et al. (1983)
R. richardsonii	38	38	2	38a	Japan	Murofushi et al. (1984)
	38	74	-	36sm+2a	Japan	Ojima and Kikuno (1987)

หมายเหตุ: 2*n* = จำนวนดิพพลอยด์โครโมโซม, NF = จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน, NORs = รอยคอร์ดที่สองของโครโมโซม, m = โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก, sm = โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก, t = โครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก, st = โครโมโซมชนิดซับเทโลเซนทริก (เทียบได้กับโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกในการศึกษาครั้งนี้), a = โครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก และ – ไม่มีข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

กันยารัตน์ ไชยสุต. 2532. **เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล** Zephyranthes. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

อมรา คัมภิรานนท์. 2546. **พันธุศาสตร์ของเซลล์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาพันธุศาตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อลงกลด แทนออมทอง. 2554. **พันธุศาสตร์เซลล์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

Arai, R. 2011. Fish Karyotype. Springer, Japan.

Artoni, R. F., Falcáo, J. N., Moreira-Filho, O. and Bertollo, L. A. C. 2001. An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triportheus*. Chromosome Research 9: 449-456.

Born, G. G. and Bertollo, L. A. C. 2000. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. Chromosome Research 8: 111-118.

Chen, T. R. and Ebeling, A. W. 1968. Karyological evidence of female heterogamety in the mosquito fish, *Gambusia affinis*. Copeia 1: 70-75.

Fujiwara, A., Nishida-Umehara, C., Sakamoto, T., Okamoto, N., Nakayama, I. and Abe, S. 2001. Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation. Genetica 111: 78-89.

Galetti, P. M., Aguilar, C. T. and Molina, W. F. 2000. An overview of marine fishes cytogenetics. Hydrobiologia 420: 55-62.

Gold, J. R., Li, Y., Shipley, N. S. and Powers, P. K. 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. Journal of Fish Biology 37: 563-575.

Halnan, C. R. E. 1989. Cytogenetics of Animals. CAB International, United State of Kingdom.

Jesus, C. M., Bertollo, L. A. C. and Moreira-Filho, O. 1999. Comparative cytogenetics in *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. Genetica 105: 63-67.

Lande, R. 1979. Effective dame sizes during long-term evolution estimated from rates of chromosomal rearrangement. Evolution 33: 234–251.

Murofushi, M., Nishikawa, S. and Yosida, T. H. 1983. Cytogenetical studies on fishes. V. Multiple sex chromosome mechanism (XX-Y) found in two dragonet fishes. Proc. Japan Acad., Ser. B., 59: 58-61.

Murofushi, M., Nishikawa, S. and Yosida, T. H. 1984. Cytogenetical studies on fishes. VI. Karyotype comparison of four species in the dragonet fish. La Kromosomo, II, 34: 1079-1084.

Nanda, I., Schartl, M., Feichtinger, 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.

Ojima, Y. 1983. Fish cytogenetics. In: Chromosomes in evolution of eukaryotic groups. Sharma, A. K. and Sharma, A. (Eds.), Vol. I. pp. 111-145. CRC press, Florida.

Ojima, Y. and Kikuno, T. 1987. Karyotype of a gobiesociform and two perciform fishes (Teleostei). Proc. Japan Acad., Ser. B, 63: 201-204.

Ojima, Y. and Kashiwagi, E. 1981. Chromosomal evolution associated with Robertsonain fusion in the genus *Dascyllus* (Chromininae, Pisces). Proceedings of the Japan Academy 57: 368 p.

Sawada, Y. and Sakamoto, K. 1980. Chromosomes of a rare callionymid, *Draculo mirabilis*. Janpan. J. Ichthyol., 26: 367-368.

ภาคผนวก

รายการวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และการเตรียมสารต่าง ๆ

รายการวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และการเตรียมสารต่าง ๆ

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 วัสดุอุปกรณ์

- เครื่องแก้วขนาดต่าง ๆ
- Hot plate และ magnetic stirrer
- ขวดเก็บ media ขนาด 1000, 500 และ 100 มล.
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 15 มล.
- หลอดสุญญากาศ (vacuum tube) ขนาด 10 มล. ที่เคลือบด้วยเฮปาริน (hepalin)
- กระบอกฉีดยา (syling) และเข็มฉีดยาขนาดต่าง ๆ
- Automicropipette, micropipette และ pipette ขนาดต่าง ๆ
- โถสำหรับย้อมสี (staining jar)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องกรองสาร และแผ่นกรองเมมเบรน (millipore membrane filter) ขนาด 0.2 ไมโครลิตร
- เครื่องชั่งแบบละเอียด (balance)
- ตู้เย็น
- อ่างน้ำอุ่น (water bath)
- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- เครื่อง vortex mixture
- ตู้เพาะเลี้ยง (incubater)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow carbinet)
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.2 สารเคมี

- อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- Fetal calf serum (FCS)
- ยาปฏิชีวนะ Penicilli-Streptomycin
- ไฟโตฮีแมกกลูตินิน (phytoheamagglutinin, PHA)
- โคลชิซิน (colchicine)
- เมทานอล (methanol)
- เอทานอล 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์ (ethanal 95% และ 70%)
- สีย้อมจิมซ่า (Giemsa's stain)

- โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)
- โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaHPO_4$)
- โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- HBSS powder

2. **การเตรียมอาหารและสารเคมี**

2.1 **การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเลือด** (working media)

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเลือด 100 มล. ประกอบด้วย

1) DMEM/ M-199 solution 80 มิลลิลิตร
2) Fetal calf serum 20 มิลลิลิตร
3) Penicilin/Streptomycin 1-2 มิลลิลิตร
4) Mitogen 1-2 มิลลิลิตร

2.2 **การเตรียม** Hypotonic solution

สารละลาย Hypotonic solution 0.075 M HCl

<u>สารที่ใช้เตรียม</u>

1) KCl crystal
2) น้ำกลั่น

<u>วิธีเตรียม</u> (ปริมาตรที่เตรียม 100 มิลลิลิตร)

ชั่งผลึก KCl 0.5588 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าจนผลึกละลายหมด เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ : น้ำยานี้มีอายุการใช้งาน 1-2 สัปดาห์

2.3 **การเตรียม** Colchicine

-<u>สูตรที่ 1</u> ชั่ง colchicine 0.005 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
ได้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

-<u>สูตรที่ 2</u> ชั่ง colchicine 0.0025 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
ได้ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

-Colchicine powder เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

2.4 **การเตรียม** Fixative

สารที่ใช้เตรียม

1) Glacial acetic acid
2) Absolute methanol

วิธีเตรียม

ใช้ glacial acetic acid 1 ส่วน ผสมกับ absolute methanol 3 ส่วน เก็บใส่ขวดแช่ในตู้เย็น (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

2.5 **การเตรียม** Sorensen buffer

สารที่ใช้เตรียม

1) Stock solution A : ใช้ KH_2PO_4 9.1 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
2) Stock solution B : ใช้ $NaHPO_4$ 9.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ใช้ Stock solution A 50.8 มิลลิลิตร ผสมกับ Stock solution B 49.2 มิลลิกรัม จะได้ Sorensen buffer (pH 6.8) 100 มิลลิกรัม

2.6 **การเตรียมสีย้อม** Giemsa

การเตรียมสีจิมซ่า 10% (10% Giemsa's solution)

สีจิมซ่า 10% เตรียมจาก Giemsa's stain ใช้ชนิด Stock Giemsa's solution โดยดูดสีจิมซ่าจาก Stock Giemsa's solution มา 5 มิลลิลิตร ละลายใน Sorensen buffer 45 มิลลิลิตร

2.7 **การเตรียม** phytoheamagglutinin (PHA)

สารที่ใช้เตรียม

1) PHA powder
2) น้ำกลั่น

วิธีเตรียม

ละลายผง PHA ด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเก็บไว้ที่ 2-8 องศาเซลเซียส

2.8 **การเตรียมสารละลาย** 1 NHCl

สารที่ใช้เตรียม

1) Conc. HCl
2) น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 500 มิลลิลิตร)

ใช้ Conc. HCl จำนวน 43.68 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 456.32 มิลลิลิตร โดยค่อยๆรินกรด HCl ใส่ลงในน้ำกลั่น (ข้อควรระวัง ห้ามเทน้ำกลั่นลงใน HCl เป็นอันขาด แต่ให้เทกรด HCl ลงในน้ำกลั่น)

2.9 **การเตรียมสารละลาย** 1 N NaOH

สารที่ใช้เตรียม

1) NaOH crystal
2) น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 500 มิลลิลิตร)

ชั่งผลึก NaOH 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.10 **การเตรียม** Hank' balance salt solution (HBSS)

สารที่ใช้เตรียม

1) HBSS powder
2) $NaHCO_3$ crystal
3) 1 N HCl
4) 1 N NaOH
5) น้ำกลั่น

วิธีเตรียม

1) ละลาย HBSS powder 1 ซองใน Erlenmeyer flask ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 500 มิลลิลิตร ล้างผง HBSS ที่ติดอยู่ในซองออกให้หมด เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าจนผงละลายเข้ากันได้ดี
2) ชั่ง $NaHCO_3$ 0.35 กรัม ละลายผลึก $NaHCO_3$ ในสารละลาย HBSS เขย่าจนผลึกละลายหมด
3) ปรับ pH โดยใช้ 1 N HCl และ 1 N NaOH จนได้ pH 7.1-7.3
4) ทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้ millipore membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร
5) แบ่งใส่ขวดๆละ 100 มิลลิลิตร (aseptic technique) เก็บที่ 2-8 องศาเซลเซียส