รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาวงศ์อมไข่ (Family Apogonidae)

Molecular Cytognetics of Cardinalfishes (Family Apogonidae)

ที่ปรึกษาโครงการ

ศ.ดร.อลงกลด แทนออมทอง

หัวหน้าโครงการ

ดร.วรรณภา กสิฤกษ์

ผู้ร่วมโครงการ

ผศ.ดร.วีระยุทธ สุภิวงค์

นายณัฐวุฒิ เหลืองอ่อน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802042

สัญญาเลขที่ 158/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาวงศ์อมไข่ (Family Apogonidae)

Molecular Cytognetics of Cardinalfishes (Family Apogonidae)

ที่ปรึกษาโครงการ

ศ.ดร.อลงกลด แทนออมทอง

หัวหน้าโครงการ

ดร.วรรณภา กสิฤกษ์

ผู้ร่วมโครงการ

ผศ.ดร.วีระยุทธ สุภิวงค์

นายณัฐวุฒิ เหลืองอ่อน

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 158/2560

ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการ และ เจ้าหน้าที่ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเข้ามาทำงานวิจัย และอนุเคราะห์การใช้สถานที่และเครื่องมือในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณคณะนิสิตนักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือในการทำงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี

คุณประโยชน์ที่มีในรายงานการวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตเวทิตาแก่บิดา มารดา บูรพาจารย์และผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่าน รวมทั้งมหาวิทยาลัยบูรพา และมหาวิทยาลัยขอนแก่น

คณะผู้ทำงานวิจัย

เมษายน 2561

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ดร.วรรณภา กสิฤกษ์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา
โครงการวิจัยเรื่อง พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาวงศ์อมไข่ (Family Apogonidae)
Molecular Cytogenetics of Cardinalfishes (Family Apogonidae)
รหัสโครงการ 2560A10802042 / สัญญาเลขที่ 158/1560 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 326,500 บาท (สามแสนสองหมื่นหกพันห้าร้อยบาทถ้วน)
ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี 7 เดือน (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2559 – 30 เมษายน 2561)

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน (FISH) ของปลาอมไข่ทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) ปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) ปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera*) ปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) ปลาอมไข่นีออน (*Zoramia leptacantha*) ปลาอมไข่ขาว (*Ambassis kopsii*) ปลาอมไข่แถบกว้าง (*Ostorhinchus fasciatus*) ปลาอมไข่ซิดนีย์ (*O. limenus*) และปลาอมไข่แถบแดง (*O. margaritophorus*) โดยการเตรียมโครโมโซมจากอวัยวะส่วนไตของตัวอย่างปลาชนิดละ 10 ตัว นำโครโมโซมที่เตรียมได้ไปย้อมสีด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน (FISH) จำนวน 2 โพรบ ได้แก่ โพรบเทโลเมียร์ และโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S ตรวจสอบสัญญาณเรืองแสงบนโครโมโซมในตำแหน่งที่จำเพาะต่อชนิดของปลาอมไข่

ผลการศึกษาพบว่าจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ในปลาทั้ง 9 ชนิด เท่ากัน คือ 46 แท่ง สัญญาณของโพรบถูกพบบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกแท่ง ผลการไฮบริไดซ์โพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอกับโครโมโซมของปลาอมไข่ทั้ง 9 ชนิด พบว่า ปลาอมไข่ครีบยาว (*P. kauderni*) ปลาอมไข่ตาดำ (*F. lateralis*) ปลาอมไข่ตาแดง (*S. nematotera*) ปลาอมไข่ตาฟ้า (*S. orbicularis*) ถูกพบสัญญาณของโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอบนโครโมโซมจำนวน 2 แท่งซึ่งเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก ตรงตำแหน่งใกล้กับเทโลเมียร์ของแขนข้างสั้น ส่วนปลาอมไข่นีออน (*Z. leptacantha*) ปลาอมไข่ขาว (*A. kopsii*) ปลาอมไข่แถบกว้าง (*O. fasciatus*) ปลาอมไข่ซิดนีย์ (*O. limenus*) และปลาอมไข่แถบแดง (*O. margaritophorus*) ตรวจไม่พบตำแหน่งของยีน ไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอบนโครโมโซม

Abstract

The purpose of this research was to study molecular cytogenetics by Fluorescence in *situ* Hybridization technique (FISH) using telomeric and 18S rDNA probes by analysing 9 fish species in family Apogonidae. Ten samples of each species such as Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni*), Humpblack cardinalfish (*Fibramia lateralis*), Pajama cardinalfish (*Sphaeramia nematoptera*), Orbiculate cardinalfish (*S. orbicularis*), Threadfin cardinalfish (*Zoramia leptacantha*), *Ambassis kopsii*, Broadband cardinalfish (*Ostorhinchus fasciatus*), Sydney cardinalfish (*O. limenus*) and Red striped cardinalfish (*Ostorhinchus margaritophorus*) were taken the kidney cells for preparing chromosomes. FISH staining technique was applied to stain the chromosomes by using telomeric probe and 18S rDNA probe. Fluorescent signals were examined on the specific position of chromosome that particular species of cardinalfishes.

The result showed that the diploid chromosome of nine studied fish species in Family Apogonidae was 2n=46. FISH with the telomeric probe presented signals of hybridization on each telomere of all chromosomes. For the 18S rDNA probe mapping, only 4 of 9 studied fish species were found the hybridization signal as *P. kauderni, F. lateralis, S. nematoptera*, and *S. orbicularis*, but on the other hand the others were not found the signal of hybridization. The appearance of the signal was terminally located on the short arm adjacent to telomere of the single pair.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ข
บทคัดย่อ	ค
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ฌ
บทที่ 1	1
1.1 บทนำ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	5
บทที่ 2	6
2.1 วิธีดำเนินการวิจัย	6
2.2 ผลการวิจัย	10
บทที่ 3	28
3.1 วิจารณ์ผลการวิจัย	28
บทที่ 4	32
4.1 สรุปผลการวิจัย	32
บทที่ 5	33
5.1 ผลผลิต	33
รายงานการเงิน	34
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	39
ประวัตินักวิจัย	43

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของวงศ์ปลาอมไข่	2
2.1	ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อสร้างโพรบ	8
3.1	ผลเปรียบเทียบการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาอมไข่ 9 ชนิด	29

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*)	10
2.2	ลักษณะปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*)	11
2.3	ลักษณะปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematotera*)	12
2.3	ลักษณะปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*)	12
2.5	ลักษณะปลาอมไข่นีออน (*Zoramia leptacantha*)	13
2.6	ลักษณะปลาอมไข่ขาว (*Ambassis kopsii*)	14
2.7	ลักษณะปลาอมแถบกว้าง (*Ostorhinchus fasciatus*)	14
2.8	ลักษณะปลาอมไข่ซิดนีย์ (*Ostorhinchus limenus*)	15
2.9	ลักษณะปลาอมไข่แถบแดง (*Ostorhinchus margaritophorus*)	16
2.10	เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ)	18
2.11	เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematotera*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ)	19
2.12	เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่นีออน (*Zoramia leptacantha*) (A ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ขาว (*Ambassis kopsii*) (B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ)	20
2.13	เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่แถบกว้าง (*Ostorhinchus fasciatus*) (A ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ซิดนีย์ (*Ostorhinchus limenus*) (B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ)	21
2.14	เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่แถบแดง (*Ostorhinchus margaritophorus*) (ย้อมด้วยแดปีและโพรบ)	22
2.15	เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและ โพรบ) และปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ)	23

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
2.16	เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematotera*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ)	24
2.17	เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่นีออน (*Zoramia leptacantha*) (A ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ขาว (*Ambassis kopsii*) (B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ)	25
2.18	เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่แถบกว้าง (*Ostorhinchus fasciatus*) (A ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ซิดนีย์ (*Ostorhinchus limenus*) (B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ)	26
2.19	เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่แถบแดง (*Ostorhinchus margaritophorus*) (ย้อมด้วยแดปีและโพรบ)	27

สัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์และคำย่อ	คำจำกัดความ
2*n* (diploid)	จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์
a (acrocentric)	โครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก
Ag-NOR	ตำแหน่งนอร์ที่ติดสีซิลเวอร์จากการย้อมแถบสีนอร์
CI (Centromeric Index)	ค่าดัชนีเซนโทเมียร์
DAPI(4’6’-diamidino-2-phenylindole)	สีย้อมแดปี
Ll (Length of long arm)	ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว
Ls (Length of short arm)	ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น
LT (Total of length)	ความยาวของแขนโครโมโซมทั้งหมด
m (metacentric)	โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก
NOR (Nucleolar Organizer Region)	บริเวณนอร์
NF (Fundamental Number)	จำนวนโครโมโซมพื้นฐานหรือจำนวนแขนโครโมโซม
RL (Relative Legth)	ความยาวสัมพัทธ์
sm (submetacentric)	โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก
st (subteloctentric)	โครโมโซมชนิดซับเทโลเซนทริก
t (teleocentric)	โครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก
TR (Telomere Region)	ตำแหน่งนอร์ใกล้ตำแหน่งทโลเมียร์

บทที่ 1

1.1 บทนำ

ปลาอมไข่เป็นปลาที่จัดอยู่ในชั้นแอคติโนเธอริจิอี (class Actinopterygii) ชั้นย่อยนีโอเธอริจิอี (subclass Neopterygii) อันดับเพอซิฟอร์มส์ (order Perciforms) อันดับย่อยเพอคอยดีอี (suborder Percoidei) วงศ์ใหญ่เพอคอยเดีย (superfamily Percoidea) วงศ์อโพโกนิดี (family Apogonidae) มีรายงานทั่วโลกพบ 41 สกุล (genus) และ 352 ชนิด (species) ส่วนในประเทศไทยพบ 13 สกุล และ 26 ชนิด (Froese and Pauly, 2018) ปลาอมไข่ส่วนใหญ่เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก อาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูงในทะเลเขตร้อนและเขตอบอุ่น เป็นปลาที่มีลำตัวค่อนข้างยาว แบนข้าง มีเกล็ดขนาดใหญ่มีทั้งแบบเกล็ดขอบเรียบ (cycloid scales) และขอบหยัก (ctenoid scales) มีดวงตาใหญ่ มีปากค่อนข้างกว้าง เฉียงลง มีฟันซี่เล็กเรียวยาวไม่เท่ากันอยู่ติดกันเป็นแถว (villiform) แผ่นปิดเหงือกยื่นออกมาเป็นหนาม 1 ก้าน ครีบหลังแยกออกจากกันเป็น 2 ครีบชัดเจน โดยครีบหลังหน้ามีลักษณะเป็นก้านครีบแข็งประมาณ 6-8 ก้าน ส่วนครีบหลังหลังมีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน และก้านครีบอ่อน 8 – 14 ก้าน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 2 ก้าน ก้านครีบอ่อน 8-18 ก้าน ครีบท้องมีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน และก้านครีบอ่อน 5 ก้าน (Kimura et al., 2003) ปลาอมไข่เป็นปลาทะเลสวยงามชนิดหนึ่งที่มีผู้สนใจนำมาเลี้ยงเป็นปลาตู้ ด้วยปลาอมไข่มีขนาดเล็ก มีรูปทรงแปลกตา มีดวงตาใหญ่ ปากหนา มีความหลากหลายของสีสันและลวดลาย ว่ายน้ำรวมกันเป็นฝูง มีนิสัยไม่ก้าวร้าว สามารถเลี้ยงรวมกับปลาชนิดอื่นได้ มีความอดทน (Fenner, 2014) มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งปัจจุบันกรมประมงได้นำปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) ซึ่งเป็นปลาสายพันธุ์จากต่างประเทศมาเพาะเลี้ยงได้สำเร็จ และสามารถส่งเสริมให้เป็นธุรกิจการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ได้ (สามารถ เดชสถิตย์ และพรจันทร์ ปิ่นสุวรรณ, 2552) ปลาอมไข่จัดอยู่ในปลาทะเลสวยงามที่สามารถส่งออกนอกราชอาณาจักรได้ โดยมีเงื่อนไขว่าได้จากการเพาะพันธุ์ การนำเข้า และการศึกษาวิจัย (กรมประมง, 2553) การนำปลาสายพันธุ์ต่างประเทศเข้ามาในประเทศไทย และปล่อยลงในธรรมชาติ ทั้งโดยตั้งใจและไม่ตั้งใจ หรือรู้เท่าไม่ถึงการณ์ อาจทำให้เกิดการปะปนของพันธุกรรมปลา ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้พันธุกรรมของปลาประจำถิ่นนั้นถูกทำลาย การศึกษาทางพันธุศาสตร์จึงมีบทบาทสำคัญในการหาเอกลักษณ์ของปลา การปรับปรุงพันธุ์ การจัดการความหลากหลายทางชีวภาพ แต่จากการตรวจสอบเอกสารงานวิจัยที่ผ่านมามีรายงานทางด้านพันธุศาสตร์ของปลาวงศ์อมไข่อยู่น้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลยังไม่มีข้อมูลการศึกษาทั้งในประเทศและต่างประเทศ และยังไม่มีรายงานทางด้านพันธุศาสตร์ของปลาวงศ์อมไข่ที่พบในน่านน้ำของประเทศไทย สำหรับในการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของวงศ์ปลาอมไข่พบว่ามีเพียง 18 ชนิด จาก 6 สกุล คิดเป็นจำนวนน้อยกว่าร้อยละ 5 ของจำนวนวงศ์ปลาอมไข่ทั้งหมดซึ่งมีประมาณ 352 ชนิด จาก 41 สกุลทั่วโลก รายงานทั้งหมดเป็นการศึกษาโดยการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์ ยังไม่มีการศึกษาการย้อมสีด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญยิ่ง นอกจากนี้ไม่มีรายงานการศึกษาในปลาอมไข่จากน่านน้ำของประเทศไทย โดยรายละเอียดสรุปได้ดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของวงศ์ปลาอมไข่

ชนิด	2*n*	NF	แคริโอไทป์	NORs	อ้างอิง
Apogon americanus	36	70	12m+6sm+16a+2t	2(TR)	Araújo et al. (2010)
A. binotatus	36	50	14m/sm+22a/t	-	Rivlin et al. (1987)
	36	62	26m/sm+10a/t	-	Rivlin et al. (1987)
	35	49	14m/sm+21a/t	-	Rivlin et al. (1987)
A. imberbis	36	56	-	-	Alvarez et al. (1991)
A. maculatus	34	61	27m/sm+7a/t	-	Rivlin et al. (1988)
A. pseudomaculatus	36	66	30m/sm+2a+4t	-	Rivlin et al. (1986)
A. lineatus	46	52	2m+4sm+2a+38t	-	Murofushi (1986)
Nectamia fusca	46	-	2m+44sm/a/t	-	Rivlin et al. (1986)
A. nubilus	46	92	2m+36sm+8a	-	Rivlin et al. (1986)
A. doederleini	46	54	2m+6sm+38a/t	-	Ojima and Kojima (1985)
A. endekataenia	46	46	46a/t	-	Rishi (1973)
	46	52	2m+4sm+16a+24t	-	Murofushi (1986)
A. moluccensis	46	46	46a/t	-	Rishi (1973)
A. notatus	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Ojima and Kojima (1985)
	46	53	2m+5sm+39a/t	-	Ojima and Kojima (1985)
	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Ojima and Kojima (1985)
	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Murofushi (1986)
O. semilineatus	46	52	2m+4sm+20a+20t	-	Murofushi et al. (1980)
A. semilineatus	46	54	2m+6sm+38a/t	-	Ojima and Kojima (1985)
Fibramia lateralis	46	54	8a+38	2(TR)	Kasiroek et al. (2017a)
Phaeoptyx pigmentaria	38	-	6m+32sm/a/t	-	Rivlin et al. (1986)
Pterapogon kauderni	46	92	4m+14sm+28a	2(TR)	Kasiroek et al. (2017b)
Sphaeramia orbicularis	46	50	4sm+42a/t	-	Ojima and Kojima (1985)

หมายเหตุ: 2*n* = โครโมโซมดิพลอยด์, NF= จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน, m = เมทาเซนทริก, sm = ซับเมทา เซนทริก, a = อะโครเซนทริก, t = เทโลเซนทริก, st = ซับเทโลเซนทริก, TR = ตำแหน่งนอร์ใกล้เทโลเมียร์ และ - = ไม่มีข้อมูล

จากตารางจะพบว่าจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของวงศ์ปลาอมไข่นั้นมีลักษณะเฉพาะ โดยมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่ำ (2n=34-46 แท่ง) เมื่อเทียบกับปลาในอันดับเดียวกัน (order Perciforms) ด้วยกัน โดยส่วนมากปลาในอันดับเพอซิฟอร์มประมาณร้อยละ 60 มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 2n=48 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน NF=48 เช่นเดียวกับปลากระดูกแข็งทั่วไป (Galetti et al., 2000) แคริโอไทป์ของวงศ์ปลาอมไข่มีความหลากหลายสูง โดยบางชนิดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่ำถึง 2n=34 ซึ่งพบได้ในปลา *Apogon maculatus* (Rivlin et al., 1988) แต่ส่วนใหญ่ปลาในวงศ์นี้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ในบางชนิดมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานสูงถึง NF=92 พบได้ในปลา *A. nubilis* (2n=46, NF=92) (Rivlin et al., 1986) อย่างไรก็ตามการที่จำนวน

โครโมโซมดิพลอยด์ที่ลดลงอาจเกิดจากการเชื่อมรวมกัน (fusion) ของโครโมโซมที่ไม่ใช่โครโมโซมคู่เหมือน โดยเชื่อมกันตรงตำแหน่งเซนโทรเมียร์ (centric fusion) ของโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก ส่งผลทำให้จำนวนโครโมโซมที่มีสองแขนเพิ่มขึ้น แต่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ลดลง หรือการที่โครโมโซมดิพลอยด์เท่าเดิมแต่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน อาจเกิดจากการที่โครโมโซมดิพลอยด์ที่มีแขนเดียวเกิดการหักแล้วต่อสลับแบบมีเซนโทรเมียร์ร่วมด้วย (pericentric inversion) จนกลายเป็นโครโมโซมชนิดใหม่ที่มีสองแขน จึงทำให้จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่มีการเปลี่ยนแปลงที่จำนวนแขนของโครโมโซมที่มีเพิ่มขึ้นมา จากการศึกษาข้อมูลที่ผ่านมาจะพบได้ว่าปลาวงศ์อมไข่ มีเครื่องหมายโครโมโซมที่จำเพาะและแตกต่างกันในแต่ละชนิดพันธุ์

การเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมมีบทบาทสำคัญทำให้เกิดความหลากหลายของจำนวนและรูปแบบของโครโมโซมในปลา (Araújo, Martínez, & Molina, 2010) และที่สำคัญการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนบนโครโมโซมด้วย การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล โดยวิธี in situ hybridization (ISH) จึงถูกนำมาใช้ในการอธิบายการเปลี่ยนแปลงยีนบนโครโมโซมดังกล่าว ต่อมาวิธี ISH ได้ถูกพัฒนาโดยการติดฉลากโพรบด้วยสารเรืองแสง (fluorescein) แทนสารกัมมันตรังสีจึงถูกตั้งชื่อใหม่ว่า Fluorescence in situ hybridization (FISH) เทคนิค FISH ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายพร้อมกับมีการพัฒนาและประยุกต์ใช้อย่างต่อเนื่องแตกต่างกันออกไปตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการศึกษา แต่ยังคงมีหลักการพื้นฐานของเทคนิค FISH กล่าวคือดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกตรึงบนสไลด์ ส่วนดีเอ็นเอโพรบจะถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เพื่อให้สัญญาณที่ตรวจสอบได้ จากนั้นทั้งดีเอ็นเอเป้าหมายและดีเอ็นเอโพรบจะถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติเป็นสายเดี่ยวแล้วนำมาไฮบริไดซ์หรือทำให้เกิดการเข้าคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษา แล้วล้างเอาสัญญาณส่วนที่เกินออกเพื่อจะได้ตำแหน่งที่ต้องการศึกษาเท่านั้น (Fan, 2002) ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา การหาลำดับดีเอ็นเอที่อยู่บนโครโมโซมโดยใช้เทคนิค FISH นั้นถูกนำมาประยุกต์ใช้กับปลาหลายชนิด (Cross et al., 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การตรวจหาดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำ ๆ เป็นกลุ่มที่อยู่ในตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม ได้แก่ ยีนฮีสโตน (histone genes) ยีนไรโบโซม (ribosomal RNA genes) ซึ่งยีนเหล่านี้มีประโยชน์ในการศึกษาลักษณะและรูปแบบของโครโมโซม และเป็นยีนที่พบในปลาทุกชนิด ซึ่งการศึกษายีนดังกล่าวบนโครโมโซมเป็นข้อมูลใหม่ในการสร้างวิวัฒนาการของปลา การตรวจสอบดังกล่าวจะใช้โพรบที่ตรวจสอบแตกต่างกันไป เช่น โพรบที่จำเพาะต่อชนิด โพรบที่จำเพาะต่อโครโมโซม หรือโพรบที่จำเพาะต่อเพศ ซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงปลา สำหรับโพรบเซนโทเมียร์และเทโลเมียร์ถูกใช้ในการตรวจสอบการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมภายในชนิดเดียวกัน (Ruth & Kent, 1996)

เทคนิคฟิช (FISH) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง และความผิดปกติภายในจีโนม เซลล์ในพวกยูแคริโอตจะมีลำดับเบสที่ซ้ำ ๆ กัน (intersperse element หรือ short intersperse element) เป็นจำนวนมากภายในจีโนม และจะมีการรวมตัวกันอย่างมีแบบแผนโดยกระจัดกระจายในตำแหน่งต่าง ๆ บนโครโมโซม หรือที่เรียกว่าเฮเทอโรโครมาทิก บล็อก (heterochromatic blocks) (Liehr, 2009) ในปลาหลายชนิด พบว่าลำดับเบสที่ซ้ำๆ มีการกระจายอยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกันไป โดยอาจอยู่บริเวณตำแหน่งเซนโทเมียร์ ตัวอย่างเช่น ปลาแอนตาร์กติก ไอซ์ (Antarctic Ice, *Chiondraco hamatus*), ปลา *Hoplias malabaricus*, ปลา *Sparus aurata* และปลา Salvelinus alpines เป็นต้น หรือพบกระจายอยู่บริเวณเทโลเมียร์ ซึ่งจะพบในโครโมโซมสัตว์มี

กระดูกสันหลังทุกชนิด ปลาที่เคยตรวจสอบด้วยโพรบเทโลเมียร์ ได้แก่ กลุ่มปลา Cypriniforms และกลุ่มปลา Salmoniforms ส่วนในปลากลุ่ม poecilids, ปลา *Leporinus elongates*, ปลา *Chiondraco hamatus* และปลา *Oncorhynchus tshawytscha* พบกลุ่มลำดับเบสที่ซ้ำจะมีความจำเพาะที่โครโมโซมเพศ (Ruth & Kent, 1996)

ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ ยีน หรือ อาร์ดีเอ็นเอ เป็นกลุ่มยีนที่อยู่กันเป็นชุดซ้ำๆตั้งแต่ 100 ถึง 1,000 ชุด เรียงต่อกัน ในปลารวมทั้งยูคาริโอตชั้นสูงอื่นๆ ประกอบด้วยกลุ่มยีน 2 วงศ์ (multigene families) ที่แตกต่างกัน กลุ่มยีนวงศ์แรก (ยีนหลักของ อาร์ดีเอ็นเอ) เรียกว่า 45S rDNA เป็นตัวสร้าง นิวคลีโอรัส ประกอบด้วยยีน 18S, 58S และ 28S rDNAs ส่วนกลุ่มยีนอีกวงศ์ (ยีนรองของอาร์ดีเอ็นเอ) เรียกว่า 5S rDNA เป็นยีนที่ไม่ได้สร้างนิวคลีโอลัส ดังนั้น 45S rDNA จึงเป็นกลุ่มยีนที่สัมพันธ์กับตำแหน่งนอร์ (Mazzei et al. 2004) ยีน 45S rDNA ถูกถอดรหัสโดยเอนไซม์ RNA polymerase I ในขณะที่ 5S rDNA ถูกถอดรหัสโดยเอนไซม์ RNA polymerase III รูปแบบของการกระจายตัวของยีนไรโบโซมมีความจำเพาะต่อชนิดและการจัดเรียงตัวของโครโมโซมในปลาวงศ์ Channichthyidae (Mazzei et al. 2004) Fontana et al. (2003) ยังพบว่ารูปแบบของการกระจายตัวของกลุ่มยีนเหล่านี้มีความคล้ายคลึงและอนุรักษ์สูงภายในวงศ์ของปลาสเตอร์เจียน และยีนเหล่านี้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมอย่างดีในการศึกษาวิวัฒนาการรวมทั้งการระบุชนิดโดยใช้พันธุกรรมในชนิดที่ใกล้เคียงกันของปลาสกุล Tor นอกจากนี้การใช้ยีนไรโบโซมซึ่งเป็นเสมือนโครโมโซมเครื่องหมายมีความสำคัญยิ่งในการศึกษาเปรียบเทียบทางพันธุกรรม (Singh et al. 2009) ยีนไรโบโซม (18S and 5S rDNA) ยังเป็นเครื่องหมายที่ถูกใช้ในปลา *H. malabaricus* เพื่อแยกแต่ละประชากรออกจากกันได้ (Cioffi, Martins, & Bertollo, 2009; Vicari, Artoni, & Bertollo, 2005) ในทำนองเดียวกันรูปแบบของโพรบ rDNA เหล่านี้สามารถถูกใช้เป็นเครื่องหมายจีโนมเพื่อใช้สำหรับตรวจสอบคู่ผสมระหว่างชนิดได้ รวมถึงการทำแผนที่โครโมโซมของยีนสายเดี่ยว ตำแหน่งไมโครแซทเทิลไลท์ ในปัจจุบันมีการใช้เทคนิค FISH เพื่อใช้ประโยชน์ในการแยกลักษณะทางปริมาณ ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Ruth & Kent, 1996)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาทางพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทูไฮบริไดเซชัน (fluorescence *in situ* hybridization หรือ FISH) ของวงศ์ปลาอมไข่

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิด ขนาด และการสร้างโครโมโซมเครื่องหมายของวงศ์ปลาอมไข่

1.2.3 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการศึกษาด้านการปรับปรุงสายพันธุ์ การคัดเลือกพ่อ-แม่พันธุ์ปลาอมไข่ การเพาะเลี้ยง และการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมในธรรมชาติ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

เก็บตัวอย่างปลางวงศ์ปลาอมไข่จากบริเวณอ่าวไทย และร้านจำหน่ายปลาสวยงาม นำมาศึกษาด้วยเทคนิคพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบ (probe) ที่จำเพาะตอตำแหน่งเทโลเมียร์ (telomere) และตำแหน่งยีนที่สร้าง ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA gene) ชนิด 18S rDNA

บทที่ 2

2.1 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปลาอมไข่ที่เป็นปลาธรรมชาติจากฝั่งทะเลอ่าวไทย ฝั่งทะเลอันดามัน และปลาที่มีการเลี้ยงเป็นปลาสวยงามในประเทศไทย

2.1.2 ศึกษาลักษณะภายนอกตามสัณฐานวิทยาเพื่อระบุชนิดตัวอย่างปลาอมไข่

นำตัวอย่างปลามาตรวจสอบ และระบุชนิดโดยใช้เอกสารตามคู่มือของ ชวลิต วิทยานนท์ (2551), แอลเลน (Allen, 1997) และโยชิดะ และคณะ (Yoshida et al., 2003) ทำการถ่ายภาพตัวอย่างปลาอมไข่แต่ละชนิด

2.1.3 ศึกษาด้านพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล

การศึกษาด้านพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล ประกอบด้วย ขั้นตอนการเตรียมโครโมโซม ดังต่อไปนี้

2.1.3.1 การเตรียมโครโมโซมโดยวิธีทางตรง (direct method)

อวัยวะที่ใช้ คือไต เนื่องจากเป็นอวัยวะที่มีการแบ่งเซลล์ตลอดเวลาโดยเตรียมจากในตัวสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) โดยดัดแปลงมาจากวิธีของเชนและอีเบลลิง (Chen and Ebeling, 1968) และนันดาและคณะ (Nanda et al., 1995) ดังนี้ ฉีดโคลชิซินเข้มข้นร้อยละ 0.05 (0.05% colchicine) ขนาด 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เข้าไปในกล้ามเนื้อของปลา ปล่อยให้ปลาว่ายในตู้เลี้ยงปลาที่พ่นออกซิเจนอย่างแรง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำปลาไปทำให้ตายอย่างสงบโดยใส่ลงไปในน้ำที่มีสารละลายน้ำมันกานพลู (clove oil) ระดับความเข้มข้น 100 ส่วนในล้านส่วนหรือพีพีเอ็ม ทิ้งไว้จนกระทั่งปลาหยุดหายใจ ผ่าตัดเปิดช่องท้อง และนำเฉพาะส่วนของไตมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.075 โมลาร์ (KCl 0.075 M) กรองเศษเซลล์ขนาดใหญ่ออกด้วยตะแกรงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร เทตะกอนเซลล์ขนาดเล็กลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ลงไปในหลอดปั่นเหวี่ยงประมาณ 6-8 มิลลิลิตร ขึ้นกับตะกอนเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที นำตะกอนเซลล์ไปปั่นที่ความเร็ว 1,200-1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสข้างบน เติมน้ำยาตรึงสภาพ (fixative) ที่มีส่วนผสมของเมทานอล (methanol) 3 ส่วนต่อกรดอะซิติก (acetic acid) 1 ส่วน ที่เตรียมใหม่ ๆ และเย็นจัดทีละหยดอย่างช้า ๆ พร้อมกับเขย่าหลอดไปด้วย เติมจนครบ 7 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปั่นที่ 1,200-1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสข้างบน เติมน้ำยาตรึงสภาพลงไป 7-8 มิลลิลิตร ปั่นอีกครั้ง ทาซ้ำเพื่อล้างตะกอนเซลล์ให้สะอาด 3-4 ครั้ง เก็บตะกอนเซลล์ในสารละลายตรึงเซลล์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะศึกษา

2.1.3.2 การเตรียมสไลด์โครโมโซม

นำตะกอนเซลล์ที่เตรียมไว้แล้วมาหยดบนสไลด์ที่สะอาด 1-2 หยด โดยหยดห่างจากสไลด์ 10 เซนติเมตร เมื่อหยดครบเวลา 15 วินาทีให้หยดน้ำยาตรึงสภาพตามอีก 1 หยด ปล่อยให้แห้งในอากาศ การเตรียมสไลด์จะเตรียมจากตัวอย่างปลาอมไข่ตัวละ 8 สไลด์

2.1.4 ศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล ประกอบด้วย ขั้นตอนการเตรียมโครโมโซม การเตรียม โพรบ การทำพรีทรีทเมนต์ (pre-treatment) การทำไฮบริไดเซชั่น (hybridization) และการวิเคราะห์ผล ดัดแปลงจากแลร์ (Liehr, 2009) และอลงกลด แทนออมทอง (2554)

2.1.4.1 ขั้นตอนการเตรียมสไลด์เหมือนกับการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์

2.1.4.2 การทำพรีทรีทเมนต์มีขั้นตอน ดังนี้

1. นำสไลด์ไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

2. เตรียมน้ำกลั่น 95 มิลลิลิตร ผสมกับกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในโถย้อมสี จากนั้นนำไปอุ่นในอ่างน้ำอุ่นให้ได้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3. เติมสารละลายเปบซิน (pepsin) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในโถย้อมสีในข้อ 4.2.2

4. จุ่มแผ่นสไลด์ในโถย้อมสีที่เตรียมไว้ในอ่างน้ำอุ่น เป็นระยะเวลา 3-5 นาที

5. ล้างแผ่นสไลด์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

6. หยดสารละลายโพสต์ฟิกเซชัน (post-fixation solution) ที่มีส่วนผสมพาราฟอร์มาดีไฮด์ (paraformaldehyde) 500 ไมโครลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 เท่า (1X PBS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride) ความเข้มข้น 1 โมล่าร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนกระจกปิดสไลด์ชนิดยาว (25 X 50 มิลลิเมตร) จากนั้นวางสไลด์บนกระจกปิดสไลด์ และบ่มเป็นเวลา 10 นาที

7. นำกระจกปิดสไลด์ออก และล้างในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 เท่า เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสไลด์ไปล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5 นาที

8. ทำการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยผ่านในลำดับแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 75, 95 และ 100 ตามลำดับ เป็นเวลาลำดับละ 3 นาที แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.1.4.3 การเตรียมโพรบ

โพรบที่จะศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ โพรบที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งของเทโลเมียร์ของโครโมโซม หรือเทโลเมียร์โพรบ (telomeric probe) และโพรบที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งของไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอยีนบนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิต (rRNA probe)

1. เทโลเมียร์โพรบ จะใช้โพรบที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อการค้า ดังนี้ DAKO, telomere PNA FISH Kit/FITC Cat. NO. K5325

2. ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอยีนโพรบ ชนิด 18S rDNA เตรียมโดยกระบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากดีเอ็นเอของปลาอมไข่ครีบยาว ที่มีขนาดความยาวของเบส 1,400 คู่ของยีน 18S rRNA ตามวิธีของซิออฟฟีและคณะ (Cioffi et al., 2009) ซึ่งใช้ไพรเมอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

	18S rDNA
Forward	5’ CCGCTTTGGTGACTCTTGAT 3’
Reverse	5’ CCGAGGACCTCACTAAACCA 3’

ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังตารางที่ 3-1 แล้วเข้าสู่ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามขั้นตอนที่กำหนด

ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในการทำโพรบ

ใช้เครื่อง Thermal cycle รุ่น Palm cycler ซึ่งการทำงานประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อสร้างโพรบ

ส่วนประกอบของสารละลาย	**ปริมาตร (µl)**
1. 50 ng DNA template	1.0
2. 10 µM Forward Primer	0.5
3. 10 µM Reverse Primer	0.5
4. dNTPs (1.25 mM)	3.2
5. PCR Buffer 10x	2.5
6. $MgCl_2$ (50mM)	0.75
7. Taq DNA pol (5U/ µl)	0.1
8. Distilled water	16.45
ปริมาตรรวม	25

หลังจากนั้นนำโพรบ 18S rDNA ไปติดฉลากแบบโดยตรงด้วยสารเรืองแสงสเปกทรัม ออร์เรน (spectrum orange-dUTP) (Roche, Mannheim, Germany) ด้วยวิธีนิค ทรานสเลชัน (nick translation) (Morrison et al., 2002)

2.1.4.4 การทำไฮบริไดเซชั่น

2.1.4.4.1 เทโลเมียร์โพรบ มีขั้นตอน ดังนี้

1. เติมโพรบ ในปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์จากนั้นนำสไลด์ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2. นำสไลด์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นสไลด์ออกจากที่มืด แล้วนำกระจกปิดสไลด์ออกจากแผ่นสไลด์

3. ทำการล้างโพรบส่วนเกินออก โดยแช่ในสารละลายซาลีนโซเดียมซิเตรท (saline-sodium citrate, 1X SSC) ที่ถูกทำให้อุ่นอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น

4. ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยการผ่านในลำดับของแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70, 95 และ 100 ตามลำดับ ลำดับละ 2 นาที แล้วปล่อยในแห้งในที่มืด

5. ย้อมสีสไลด์ด้วยสารละลายแดปี (DAPI; 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ยาว จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ หรือเก็บในกล่องทึบแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.4.4.2 ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอยีนโพรบ ชนิด 18S rDNA มีขั้นตอนดังนี้

1. นำแผ่นสไลด์ไปบ่มกับสารละลายฟอร์มาดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 70 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

2. นำแผ่นสไลด์มาแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 ที่เย็นจัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

3. ย้ายแผ่นสไลด์ไปแช่ในลำดับแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 และ 100 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้องลำดับละ 2 นาที จากนั้นเป่าให้แห้งอย่างรวดเร็ว

4. นำสารละลายโพรบไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอยีนโพรบ ชนิด 18S rDNA ไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยส่วนผสมของโพรบ มีดังนี้ 2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ดีไอออไนด์ ฟอร์มาไมด์ (deionized formamide) ความเข้มข้นร้อยละ 50 และสารละลายเดกซ์แทรนซัลเฟต (dextran sulphate) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ในระหว่างขั้นตอนที่ 1-3 ต้องทำให้แล้วเสร็จพร้อมกันกับขั้นตอนที่ 4)

5. หยดสารละลายโพรบที่ถูกทำให้เสียสภาพ (denatured) ลงบนสไลด์ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำไปบ่มในที่ชื้นและมืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6. นำสไลด์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นสไลด์ออกจากที่มืด แล้วนำกระจกปิดสไลด์ออกจากแผ่นสไลด์

7. ทำการล้างโพรบส่วนเกินออก โดยแช่ในสารละลายซาลีนโซเดียมซิเตรท (1X SSC) ที่ถูกทำให้อุ่นอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที

8. ล้างแผ่นสไลด์ในสารละลายโซเดียมซิเตรทคลอไรด์ 4 เท่า (4X) ที่อุณหภูมิห้องและทำการเขย่าเป็นเวลา 5 นาที

9. ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยการผ่านในลำดับของแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70, 95 และ 100 ตามลำดับ ลำดับละ 2 นาที แล้วปล่อยในแห้งในที่มืด

10. ย้อมสีสไลด์ด้วยสารละลายแดปีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ยาว จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ หรือเก็บในกล่องทึบแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.4.5 การวิเคราะห์ผล

ตรวจสอบสัญญาณเรืองแสงบนโครโมโซมในตำแหน่งที่จำเพาะต่อชนิดของปลาอมไข่ศึกษาเปรียบเทียบในแต่ละชนิด สำหรับสัญญาณของโพรบเทโลเมียร์นั้นได้เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีส้มแดงเพื่อให้ตรวจสอบสัญญาณได้ง่ายขึ้น เพราะสีพื้นของโครโมโซมที่ย้อมติดแดปีเป็นสีน้ำเงิน

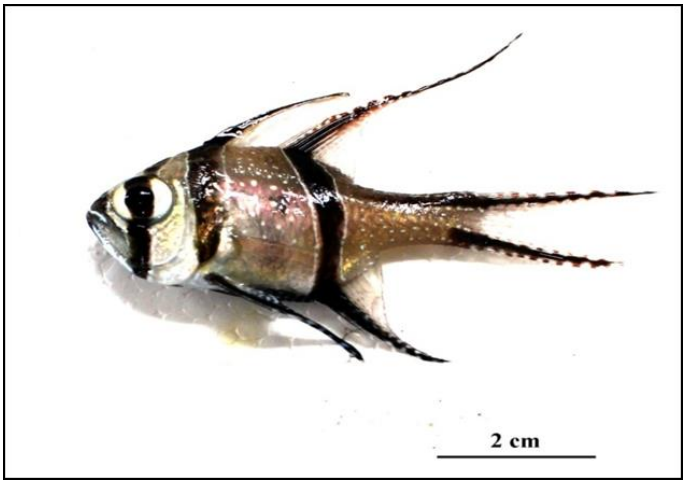
2.2 ผลการวิจัย

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาวงศ์อมไข่ ที่เป็นปลาจากธรรมชาติทั้งฝั่งทะเลอันดามัน ฝั่งอ่าวไทย และปลาที่มีการเลี้ยงเป็นปลาสวยงามในประเทศไทยจำนวน 9 ชนิด พบว่าปลาวงศ์อมไข่ แต่ละชนิดมีลักษณะประจำพันธุ์ ดังนี้

2.2.1 ปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*)

ลักษณะทั่วไป

เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 8 เซนติเมตร ลำตัวมีสีขาวเงิน มีแถบสีดำพาดขวางผ่านลำตัว 3 แถบ คือ ที่ตา ที่ครีบหลังอันที่ 1 และครีบหลังอันที่ 2 มีแถบดำตามความยาวของครีบหลัง ครีบก้น และครีบหางทั้งด้านบนและด้านล่าง มีจุดสีขาวกระจายทั่วลำตัวและครีบต่าง ๆ ยกเว้นครีบอก มีครีบหลังแบ่งออกเป็น 2 ส่วนจากกันชัดเจนและมีครีบที่ยาวมาก มีก้านครีบแข็ง 8 ก้าน ก้านครีบอ่อน 14 ก้าน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 2 ก้าน และก้านครีบอ่อน 13 ก้าน ครีบหางยาวเป็นรูปส้อมชัดเจน (ภาพที่ 2.1)

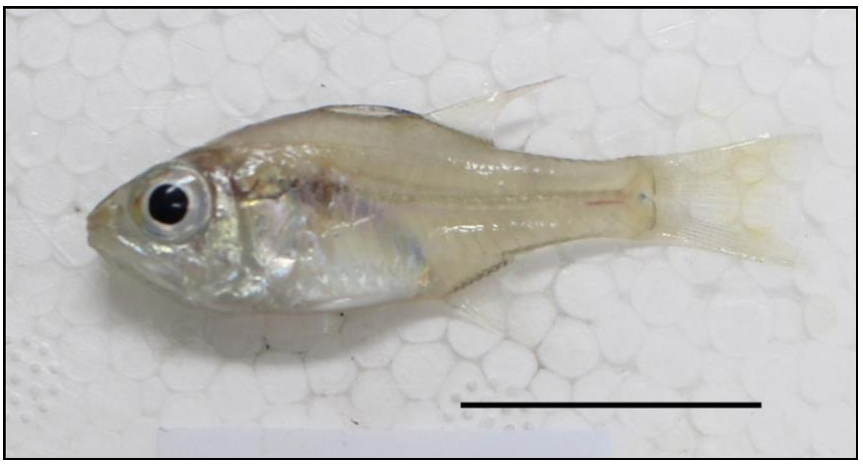


ภาพที่ 2.1 ลักษณะปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) สเกลบาร์ 2 เซนติเมตร

2.2.2 ปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*)

ลักษณะทั่วไป

เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 10 เซนติเมตร ลำตัวมีสีขาวเงิน ลำตัวค่อนข้างยาวและแคบ มีเส้นสีดำพาดผ่านกลางลำตัวตามยาวจากอกถึงหาง มีครีบหลังแยกออกจากกันเป็น 2 ส่วน ครีบหลังส่วนหน้ามีลักษณะเป็นก้านครีบแข็ง 6 ก้าน ครีบหลังส่วนหลังมีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อน 9 ก้าน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 2 ก้าน และก้านครีบอ่อน 8 ก้าน ครีบห้องมีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อน 5 ก้าน มีตากลมโตสีดำ (ภาพที่ 2.2)

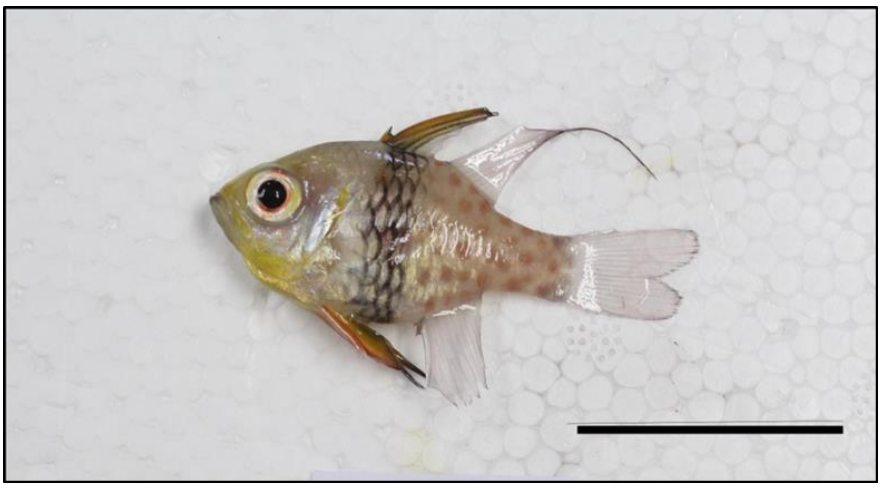


ภาพที่ 2.2 ลักษณะปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) สเกลบาร์ 2 เซนติเมตร

2.2.3 ปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera*)

ลักษณะทั่วไป

เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 8 เซนติเมตร ลำตัวมีสีสัน มีแถบสีดำพาดผ่านกลางลำตัวตามแนวขวางแบ่งลำตัวเป็นครึ่งหัวและครึ่งหาง โดยบริเวณครึ่งส่วนหัวมีสีน้ำตาลเหลือง ส่วนบริเวณหางเป็นสีอ่อนมีจุดสีน้ำตาลกระจายอยู่ทั่ว มีครีบหลังแบ่งเป็น 2 ส่วน ครีบหลังส่วนหน้ามีลักษณะเป็นก้านครีบแข็ง 7 ก้าน ครีบหลังส่วนหลังเป็นก้านครีบแข็ง 1 ก้านก้านครีบอ่อน 9 ก้าน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 2 ก้าน และก้านครีบอ่อน 8 ก้าน ครีบท้องมีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อน 5 ก้าน มีตากลมโตสีออกแดง (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera*) สเกลบาร์ 3 เซนติเมตร

2.2.4 ปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*)

ลักษณะทั่วไป

เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 8 เซนติเมตร ลำตัวมีสีสันน้อย มีแถบสีน้ำตาลเข้มพาดเฉียงผ่านกลางลำตัวตามแนวขวางแบ่งลำตัวเป็นครึ่งหัวและครึ่งหาง โดยบริเวณครึ่งส่วนหัวและครึ่งหางมีสีเดียวกัน แต่ส่วนบริเวณหางจะมีจุดสีน้ำตาลเข้มกระจายอยู่ทั่ว มีครีบหลังแบ่งเป็น 2 ส่วน ครีบหลังส่วนหน้ามีลักษณะเป็นก้านครีบแข็ง 5 ก้าน ครีบหลังส่วนหลังเป็นก้านครีบแข็ง 1 ก้านก้านครีบอ่อน 8 ก้าน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 2 ก้าน และก้านครีบอ่อน 9 ก้าน ครีบท้องมีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อน 5 ก้าน มีตากลมโตสีออกฟ้า (ภาพที่ 2.4)

ภาพที่ 2.4 ลักษณะปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) สเกลบาร์ 3 เซนติเมตร

2.2.5 ปลาอมไข่นีออน (*Zoramia leptacantha*)

ลักษณะทั่วไป

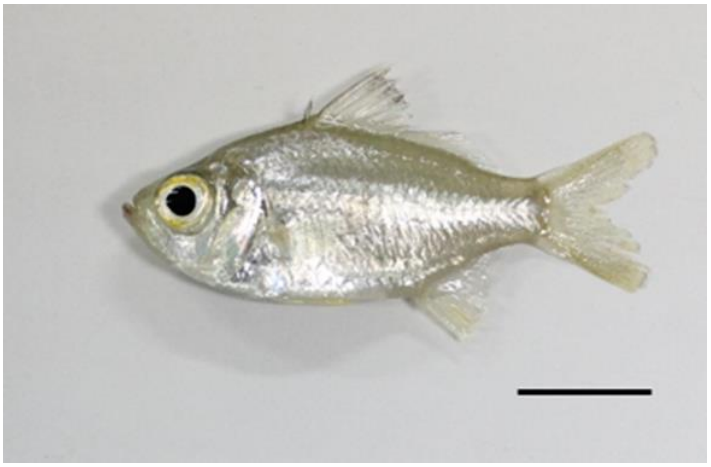
เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 6 เซนติเมตร ลำตัวมีสีสันน้อย เมื่อว่ายอยู่ในน้ำจะมีการเรืองแสงเล็กน้อย มีครีบหลังแบ่งเป็น 2 ส่วน ครีบหลังส่วนหน้ามีลักษณะเป็นก้านครีบแข็ง 5 ก้าน ครีบหลังส่วนหลังเป็นก้านครีบแข็ง 2 ก้านก้านครีบอ่อน 9 ก้าน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 2 ก้าน และก้านครีบอ่อน 9 ก้าน ครีบท้องมีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อน 5 ก้าน มีตากลมโตสีออกดำ (ภาพที่ 2.5)

ภาพที่ 2.5 ลักษณะปลาอมไข่นีออน (*Zoramia leptacantha*) สเกลบาร์ 2 เซนติเมตร

2.2.6 ปลาอมไข่ขาว (*Ambassis kopsii*)

ลักษณะทั่วไป

เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 10 เซนติเมตร เป็นปลาที่อาศัยอยู่ได้ทั้งน้ำจืดและทะเล สามารถที่จะอพยพได้เป็นระยะทางมากกว่า 100 กม. ลำตัวมีสีขาวเงิน ครีบหลังส่วนหน้ามีจุดสีดำอยู่ด้านบน มีตากลมโตสีออกดำ (ภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 ลักษณะปลาอมไข่ขาว (*Ambassis kopsii*) สเกลบาร์ 2 เซนติเมตร

2.2.7 ปลาอมไข่แถบกว้าง (*Ostorhinchus fasciatus*)

ลักษณะทั่วไป

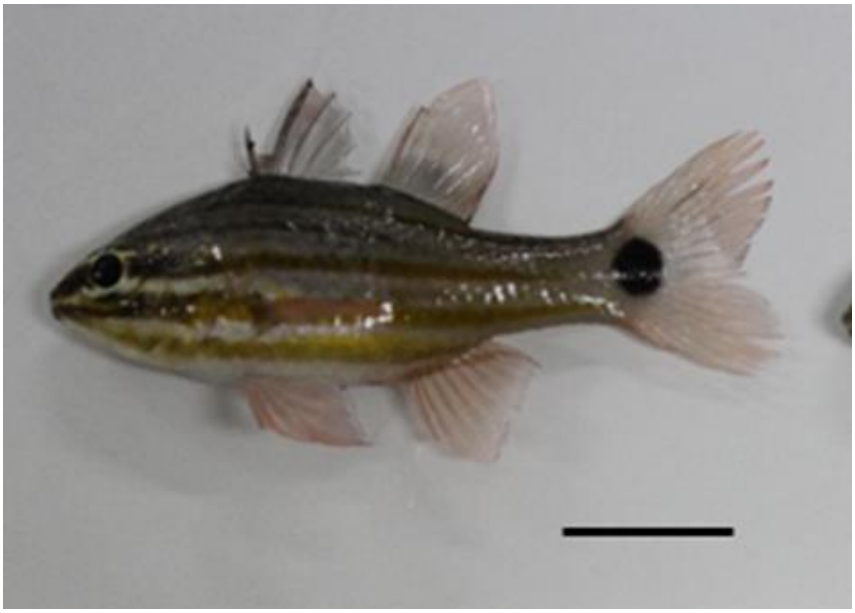
เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 10 เซนติเมตร ลำตัวเป็นรูปไข่ ปกติลำตัวมีสีขาวหรือสีชมพูอ่อน มีแถบสีเข้ม 3-4 แถบพาดผ่านกลางลำตัวตามยาวจากหัวถึงหาง แบ่งลำตัวเป็นครึ่งบนและครึ่งล่าง โดยแถบสีเข้มแถบใหญ่ จะพาดสลับกับแถบสีขาวแถบเล็ก เฉพาะส่วนที่เป็นครึ่งบนเท่านั้น มีครีบหลังมีลักษณะเป็นก้านครีบแข็ง 8 ก้าน ก้านครีบอ่อน 9 ก้าน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 2 ก้าน และก้านครีบอ่อน 8 ก้าน มีตากลมโตสีออกดำ (ภาพที่ 2.7)

ภาพที่ 2.7 ลักษณะปลาอมไข่แถบกว้าง (*Ostorhinchus fasciatus*) สเกลบาร์ 2 เซนติเมตร

2.2.8 ปลาอมไข่ซิดนีย์ (*Ostorhinchus limenus*)

ลักษณะทั่วไป

เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ยสูงสุด 14 เซนติเมตร ลำตัวรูปไข่มีสีออกน้ำตาล ครีบมีสีชมพู มีแถบสีน้ำตาลเข้มพาดเฉียงผ่านตามความยาวของลำตัวจำนวน 5 แถบ แถบบนจำนวน 2 แถบ มีขนาดเล็กและโค้งมากกว่าแถบล่าง โคนหางมีจุดสีดำขนาดใหญ่สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน มีตากลมโตสีออกดำ (ภาพที่ 2.8)



ภาพที่ 2.8 ลักษณะปลาอมไข่ซิดนีย์ (*Ostorhinchus limenus*) สเกลบาร์ 2 เซนติเมตร

2.2.9 ปลาอมไข่แถบแดง (*Ostorhinchus margaritophorus*)

ลักษณะทั่วไป

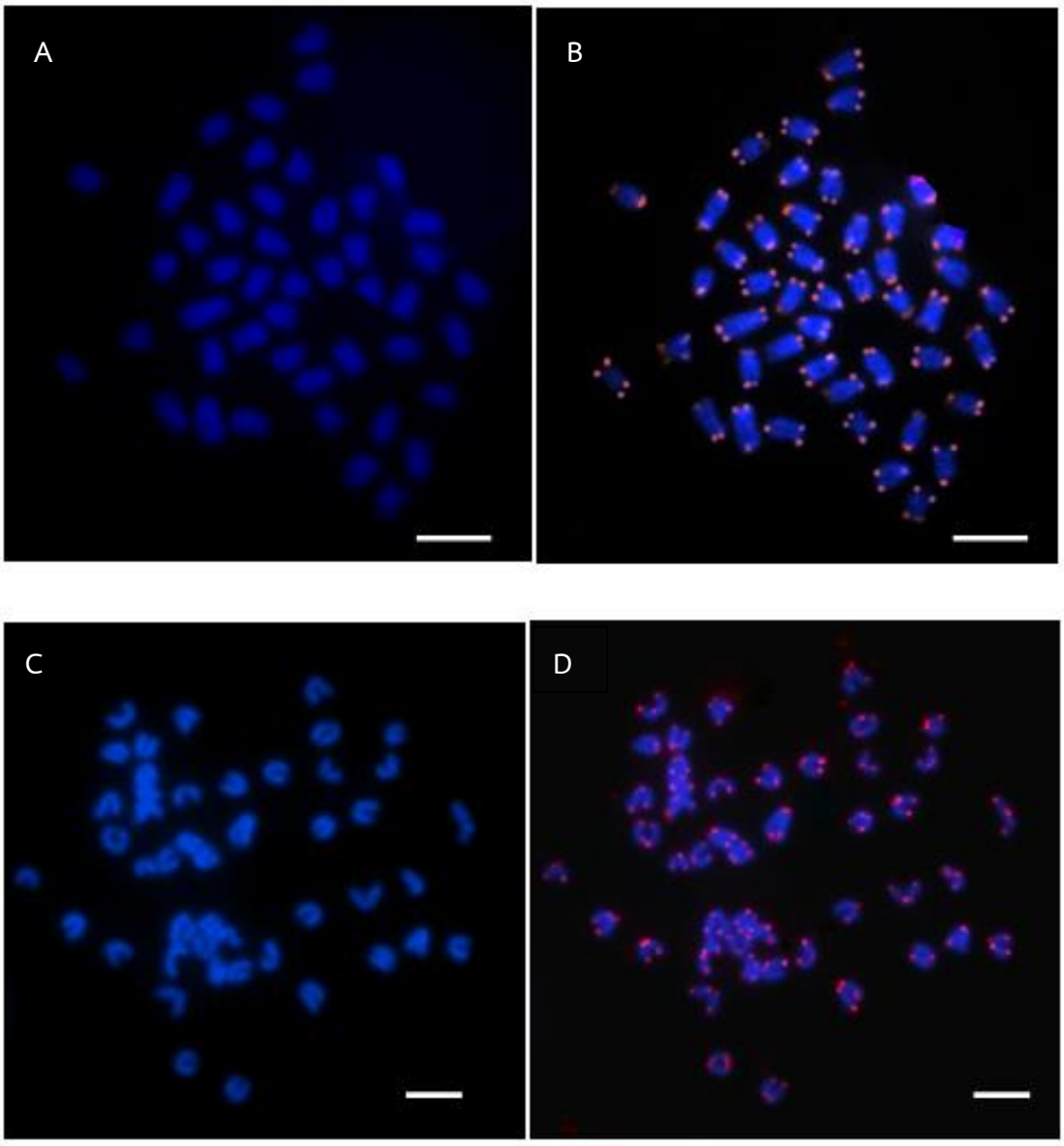
เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 6 เซนติเมตร ลำตัวรูปไข่มีสีออกน้ำตาล ครีบมีสีขาว มีแถบสีน้ำตาลเข้มหรือสีแดงพาดเฉียงผ่านกลางลำตัวตามแนวขวางจำนวน 5 แถบ ตลอดความยาวของลำตัว แถบบนจำนวน 3 แถบ มีลักษณะโค้งมากกว่าแถบล่าง มีตากลมโตสีออกดำ (ภาพที่ 2.9)

ภาพที่ 2.9 ลักษณะปลาอมไข่แถบแดง (*Ostorhinchus margaritophorus*) สเกลบาร์ 2 เซนติเมตร

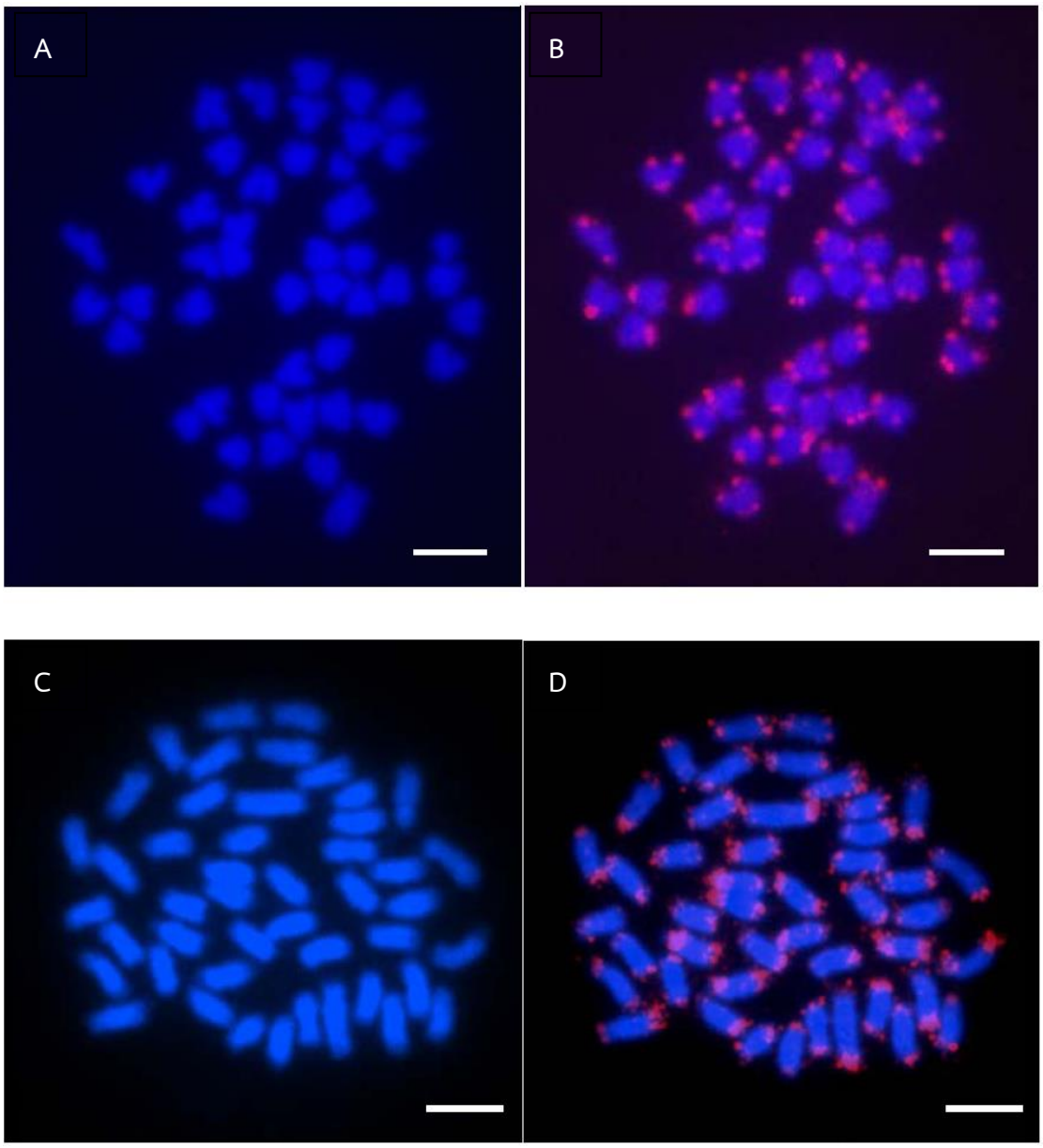
การศึกษาจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (diploid number, 2n) ของปลาอมไข่ทั้ง 9 ชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าปลาอมไข่ครีบยาว (*P. kauderni*) ปลาอมไข่ตาดำ (*F. lateralis*) ปลาอมไข่ตาแดง (*S. nematoptera*) ปลาอมไข่ตาฟ้า (*S. orbicularis*) ปลาอมไข่นีออน (*Z. leptacantha*) ปลาอมไข่ขาว (*A. kopsii*) ปลาอมไข่แถบกว้าง (*O. fasciatus*) ปลาอมไข่จุดดำ ซิดนีย์ (*O. limenus*) และปลาอมไข่แถบแดง (*O. margaritophorus*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 46 แท่ง เหมือนกันทุกชนิด และปลาทั้ง 9 ชนิดพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างโครโมโซม ปลาเพศผู้และเพศเมีย

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน (FISH) โดยศึกษาจำนวน 2 โพรบ ได้แก่ โพรบเทโลเมียร์ และโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S ซึ่งย้อมสีพื้นหลังของโครโครโมโซมด้วยสีแดปี ผลการไฮบริไดซ์โพรบเทโลเมียร์กับโครโมโซมปลาอมไข่ทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ครีบยาว (*P. kauderni*) ปลาอมไข่ตาดำ (*F. lateralis*) ปลาอมไข่ตาแดง (S. *nematoptera*) ปลาอมไข่ตาฟ้า (*S. orbicularis*) ปลาอมไข่นีออน (*Z. leptacantha*) ปลาอมไข่ขาว (*A. kopsii*) ปลาอมไข่แถบกว้าง (*O. fasciatus*) ปลาอมไข่ซิดนีย์ (*O. limenus*) และปลาอมไข่แถบแดง (*O. margaritophorus*) พบว่าสัญญาณของโพรบถูกพบบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกแท่ง และไม่พบบริเวณกลางแท่งของโครโมโซม (ภาพที่ 2.10, 2.11, 2.12, 2.13 และ 2.14)

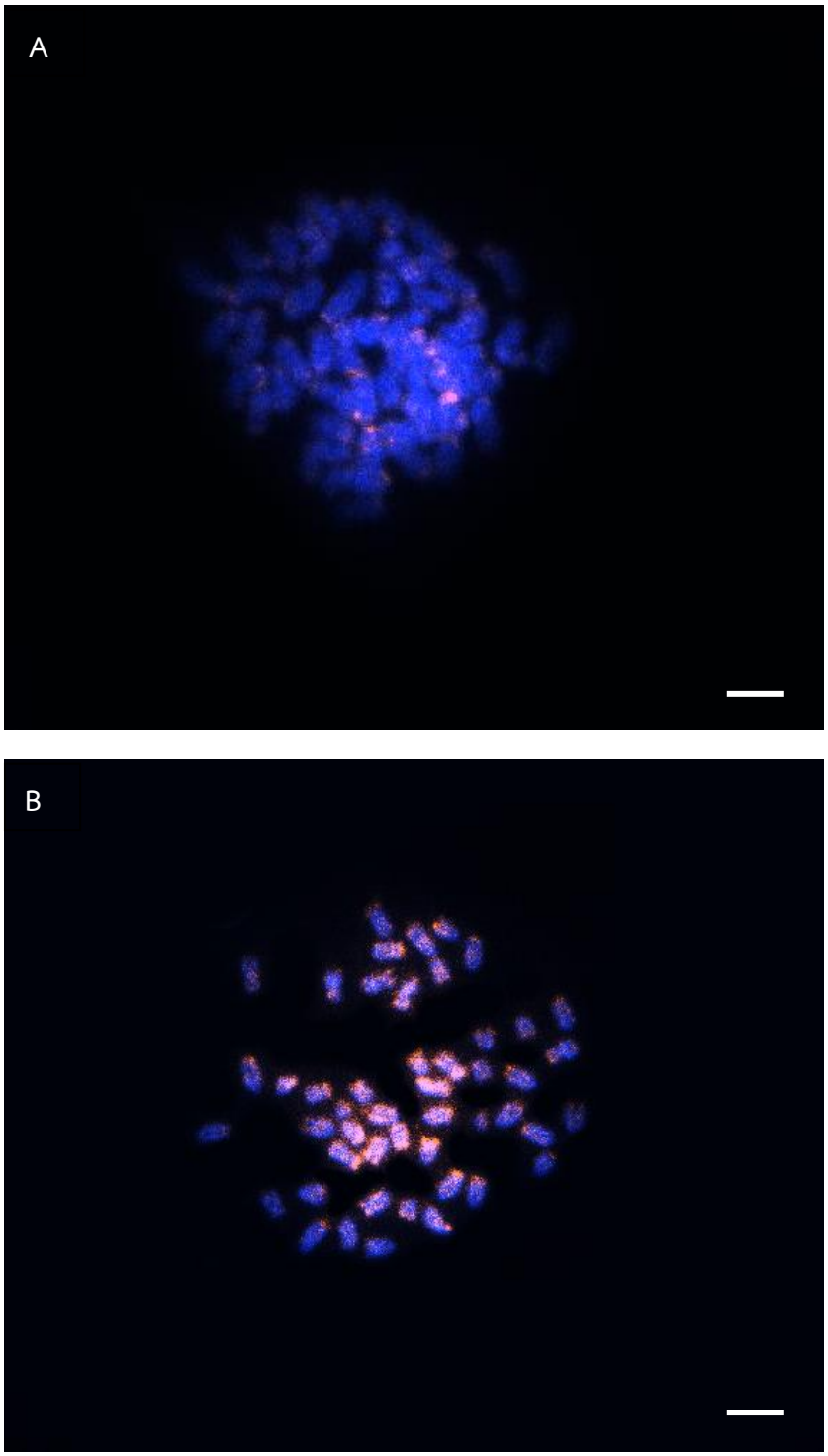
ผลการไฮบริไดซ์โพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอกับโครโมโซมของปลาอมไข่ทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ครีบยาว (*P. kauderni*) ปลาอมไข่ตาดำ (*F. lateralis*) ปลาอมไข่ตาแดง (S. *nematoptera*) ปลาอมไข่ตาฟ้า (*S. orbicularis*) พบว่าสัญญาณของโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอ ถูกพบจำนวน 2 แท่งซึ่งเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก ตรงตำแหน่งใกล้กับเทโลเมียร์ของแขนข้างสั้น ในปลาทั้ง 4 ชนิด ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ตรงกับโครโมโซมที่มีนอร์ (ภาพที่ 2.15 และ 2.16) สำหรับปลาปลาอมไข่นีออน (*Z. leptacantha*) ปลาอมไข่ขาว (*A. kopsii*) ปลาอมไข่แถบกว้าง (*O. fasciatus*) ปลาอมไข่ซิดนีย์ (*O. limenus*) และปลาอมไข่แถบแดง (*O. margaritophorus*) ตรวจไม่พบตำแหน่งของยีนไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอบนโครโมโซม (ภาพที่ 2.17, 2.18 และ 2.19)



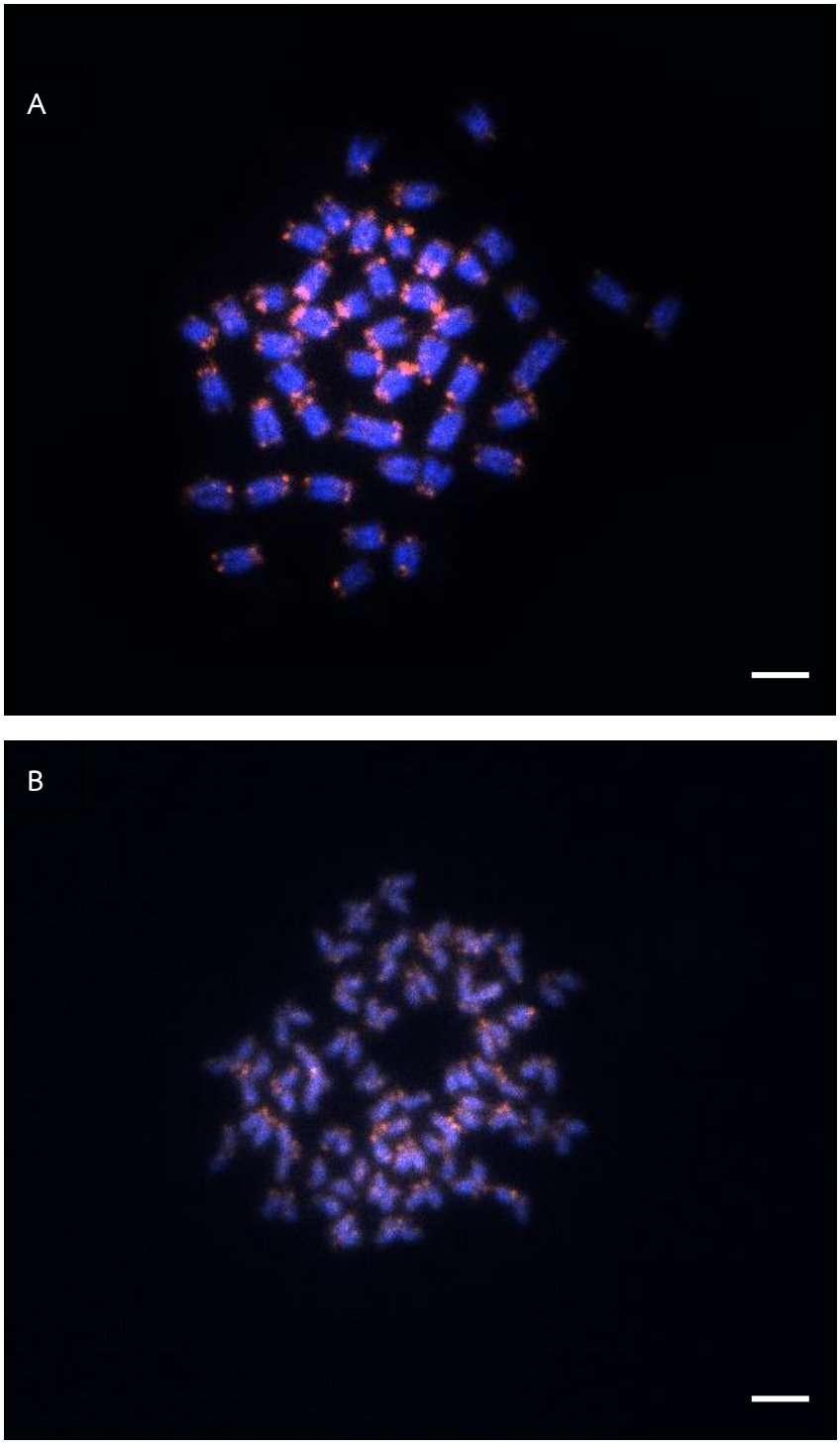
ภาพที่ 2.10 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) สเกลบาร์ เท่ากับ 5 ไมโครเมตร



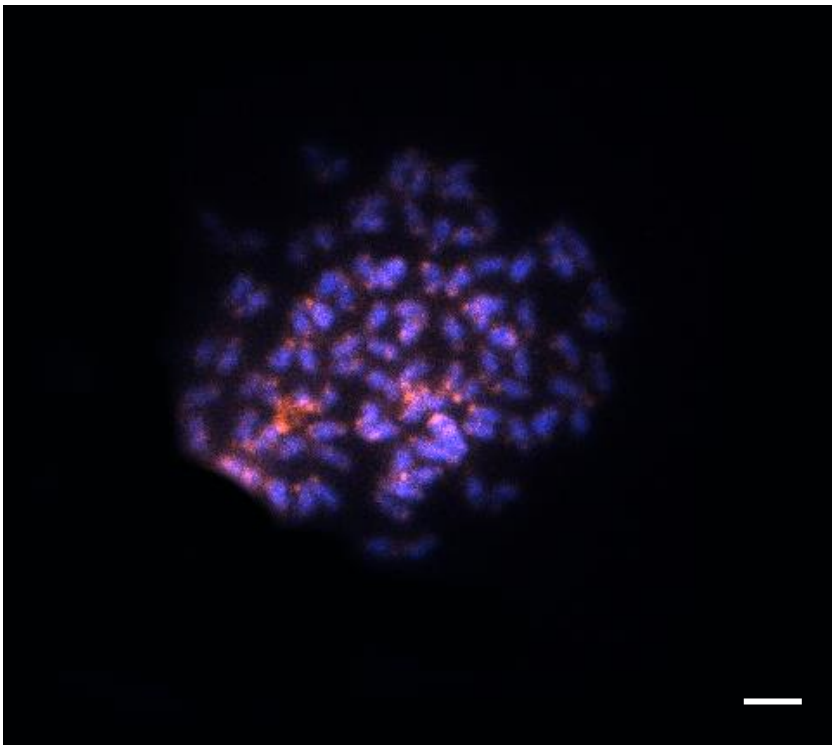
ภาพที่ 2.11 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) สเกลบาร์ เท่ากับ 5 ไมโครเมตร



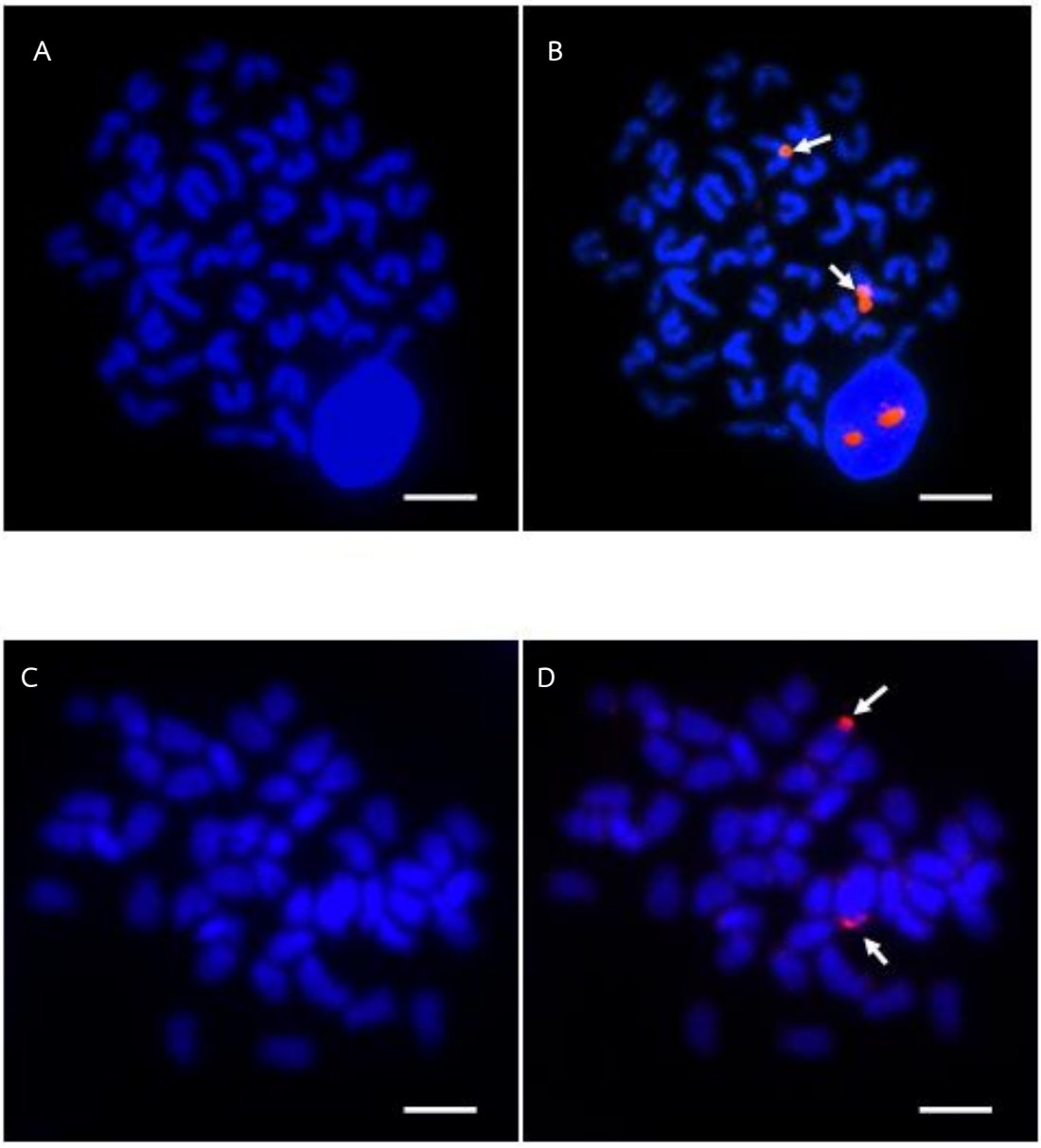
ภาพที่ 2.12 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่นีออน (*Zoramia leptacantha*) (A ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ขาว (*Ambassis kopsii*) (B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) สเกลบาร์ เท่ากับ 5 ไมโครเมตร



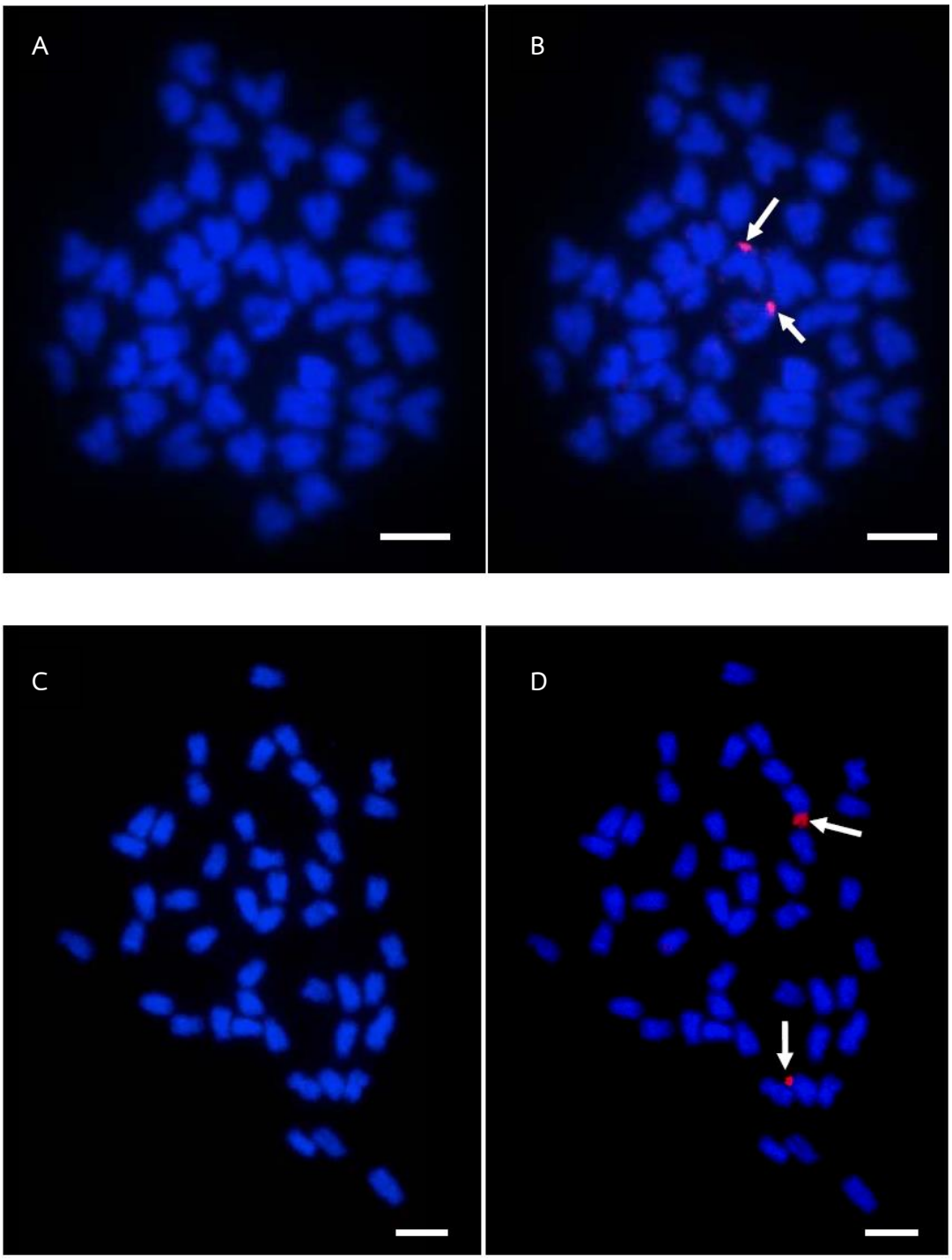
ภาพที่ 2.13 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่แถบกว้าง (*Ostorhinchus fasciatus*) (A ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ซิดนีย์ (*Ostorhinchus limenus*) (B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) สเกลบาร์ เท่ากับ 5 ไมโครเมตร



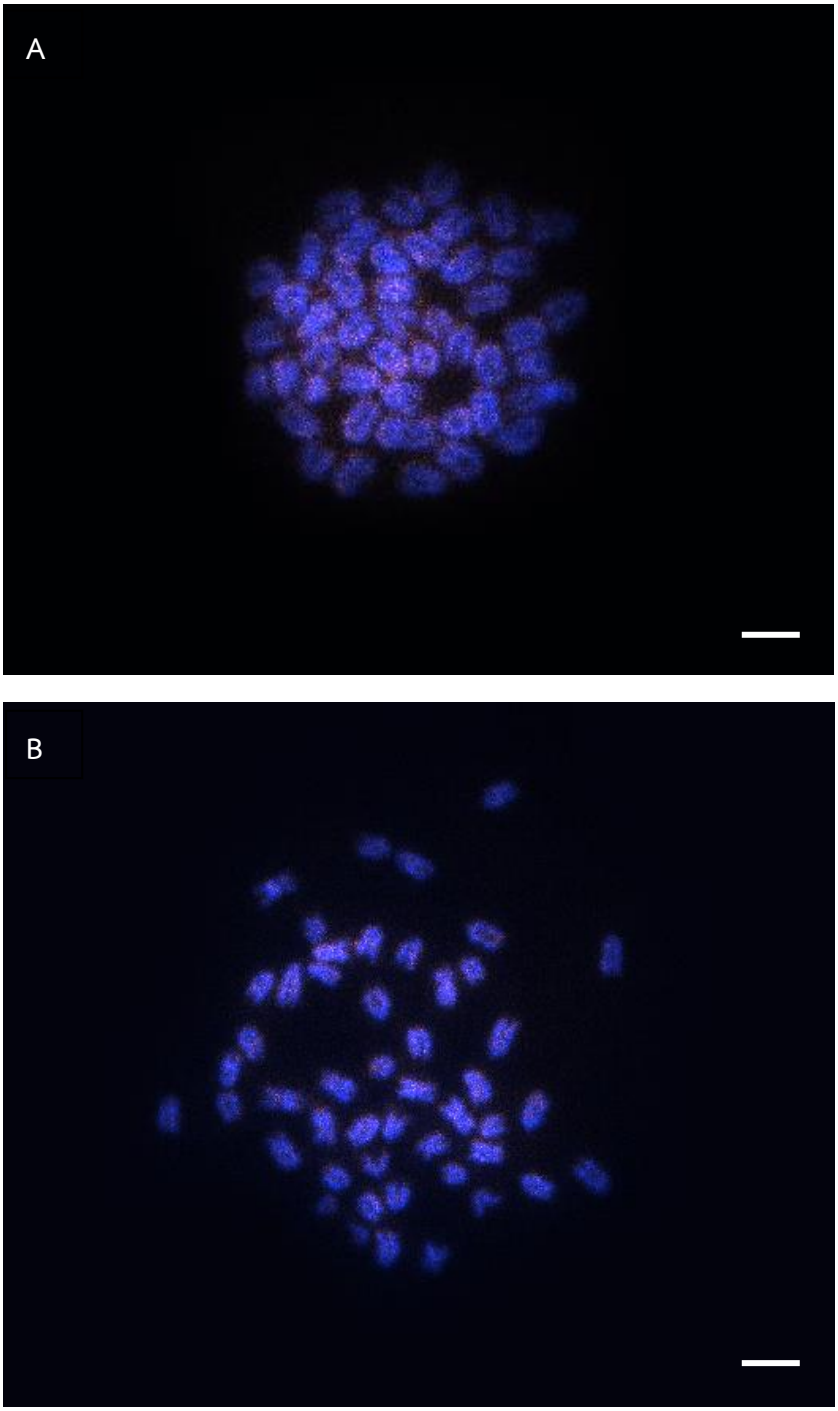
ภาพที่ 2.14 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่แถบแดง (*Ostorhinchus margaritophorus*) (ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) สเกลบาร์ เท่ากับ 5 ไมโครเมตร



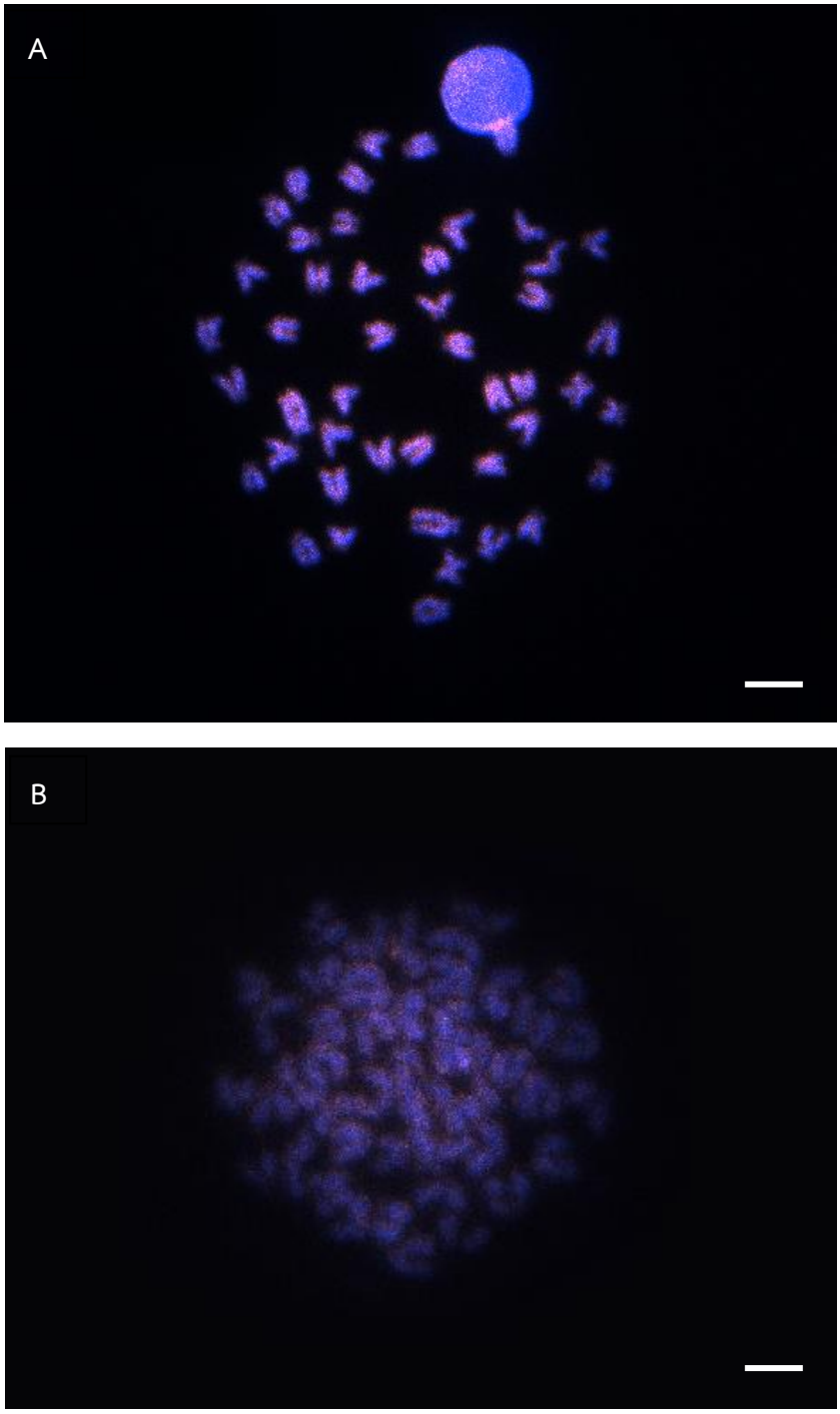
ภาพที่ 2.15 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) ลูกศรชี้แสดงสัญญาณโพรบจำนวน 2 ตำแหน่ง สเกลบาร์ เท่ากับ 5 ไมโครเมตร



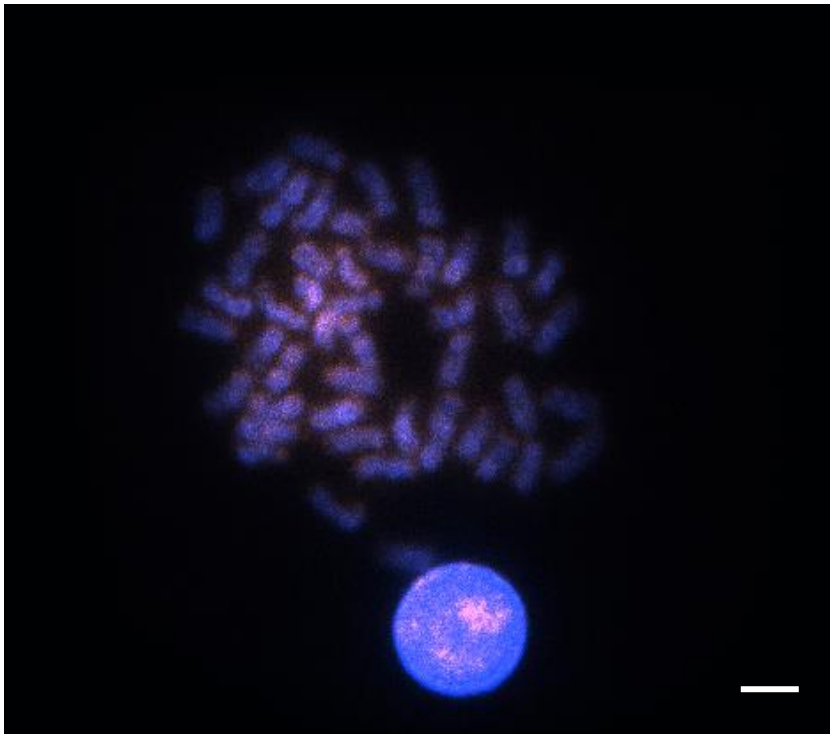
ภาพที่ 2.16 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematotera*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kaudemi*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) ลูกศรชี้แสดงสัญญาณโพรบจำนวน 2 ตำแหน่ง สเกลบาร์ เท่ากับ 5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 2.17 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่นีออน (*Zoramia leptacantha*) (A ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ขาว (*Ambassis kopsii*) (B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) สเกลบาร์ เท่ากับ 5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 2.18 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่แถบกว้าง (*Ostorhinchus fasciatus*) (A ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ซิดนีย์ (*Ostorhinchus limenus*) (B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) สเกลบาร์ เท่ากับ 5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 2.19 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่แถบแดง (*Ostorhinchus margaritophorus*) (ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) สเกลบาร์ เท่ากับ 5 ไมโครเมตร

บทที่ 3

3.1 วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาอมไข่ 9 ชนิด เป็นรายงานครั้งแรกในปลา 8 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ครีบยาว (*P. kauderni*) ปลาอมไข่ตาดำ (*F. lateralis*) ปลาอมไข่ตาแดง (*S. nematoptera*) ปลาอมไข่นีออน (*Z. leptacantha*) ปลาอมไข่ขาว (*A. kopsii*) ปลาอมไข่แถบกว้าง (*O. fasciatus*) ปลาอมไข่จุดดำซิดนีย์ (*O. limenus*) และปลาอมไข่แถบแดง (*O. margaritophorus*) ส่วนปลาอมไข่ตาฟ้า (*S. orbicularis*) เป็นรายงานการศึกษาเพิ่มเติม

จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของปลาอมไข่ทั้ง 9 ชนิด ที่ศึกษาในครั้งนี้เท่ากับ 46 แท่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา ของ Ojima and Kojima (1985) ที่ศึกษาในปลาอมไข่ตาฟ้าจากมหาสมุทรแปซิฟิก และจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ยังเท่ากับปลาชนิดอื่น ๆ อีกหลายชนิดในวงศ์เดียวกัน ได้แก่ ปลา *Jaydia lineata* (Murofushi,1986) ปลา *Nectamia fusca* (Rivlin *et al*. 1986) ปลา *Ostorhinchus doederleini* (Ojima and Kojima 1985) ปลา *O. endekataenia* (Rishi 1973; Murofushi 1986) ปลา *O. moluccensis* (Rishi 1973) *O. notatus* (Ojima and Kojima 1985; Murofushi (1986) *O. semilineatus* (Murofushi *et al*. 1980; Ojima and Kojima 1985) แต่แตกต่างจากปลา *A. maculatus* ที่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 34 แท่ง (Rivlin *et al*. 1988) ปลา *Apogon americanus* (Araújo *et al*. 2010) ปลา *A. binotatus* (Rivlin *et al*. 1987) ปลา *A. imberbis* (Alvarez *et al*. 1991) และปลา *A. pseudomaculatus* (Rivlin *et al*. 1986) ที่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 36 แท่ง และแตกต่างจากปลา *Phaeoptyx pigmentaria* ที่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 38 แท่ง (Rivlin *et al*. 1986)

จำนวนโครโมโซมพื้นฐานของปลาอมไข่ตาดำเท่ากับ 54 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งแตกต่างกับปลาชนิดอื่นๆ ในวงศ์ปลาอมไข่ยกเว้นปลา *Ostorhinchus doederleini* (Ojima and Kojima 1985) และ *O. semilineatus* (Ojima and Kojima 1985) ปลาอมไข่ตาฟ้ามีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 68 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งแตกต่างกับรายงานก่อนหน้านี้จากมหาสมุทรแปซิฟิก โดย Ojima and Kojima (1985) ที่รายงานว่าปลาอมไข่ตาฟ้ามีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 50 และต่างจากชนิดอื่น ๆ ทุกชนิดที่มีรายงานการศึกษามาแล้ว ความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมพื้นฐานในปลาชนิดเดียวกันแต่ต่างประชากรยังมีรายงานการศึกษาในปลา ปลา *O. endekataenia* (Rishi 1973; Murofushi 1986) และปลา *A. binotatus* (Rivlin *et al*. 1987) ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลมาจากความแตกต่างผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ปลาอมไข่ตาแดงมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 74 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งแตกต่างกับปลาทุกชนิดในวงศ์เดียวกัน ส่วนปลาอมไข่ครีบยาวมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 92 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งแตกต่างกับปลาทุกชนิดในวงศ์เดียวกันยกเว้นปลา *Nectamia fusca* จากประเทศสหรัฐอเมริกา (Rivlin *et al*. 1986) เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้าจะพบว่าจำนวนโครโมโซมพื้นฐานของปลาวงศ์ปลา อมไข่มีความแตกต่างผันแปรตั้งแต่ 46 ถึง 92 (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ผลเปรียบเทียบการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาอมไข่ 9 ชนิด

ชนิด	2*n*	NF	สูตรแคริโอไทป์	FISH	เอกสารอ้างอิง
Apogon americanus	36	70	12m+6sm+16a+2t	-	Araújo *et al*. (2010)
A. binotatus	36	50	14m/sm+22a/t	-	Rivlin *et al*. (1987)
	36	62	26m/sm+10a/t	-	Rivlin *et al*. (1987)
	35	49	14m/sm+21a/t	-	Rivlin *et al*. (1987)
A. imberbis	36	56	-	-	Alvarez *et al*. (1991)
ปลาอมไข่ขาว (*A. kopsii*)	46	-	-	/	การศึกษาครั้งนี้
A. maculatus	34	61	27m/sm+7a/t	-	Rivlin *et al*. (1988)
A. pseudomaculatus	36	66	30m/sm+2a+4t	-	Rivlin *et al*. (1986)
ปลาอมไข่ตาดำ *(Fibramia lateralis)*	46	54	8a+38t	/	การศึกษาครั้งนี้
A. lineatus	46	52	2m+4sm+2a+38t	-	Murofushi (1986)
Nectamia fusca	46	-	2m+44sm/a/t	-	Rivlin *et al*. (1986)
A. nubilus	46	92	2m+36sm+8a	-	Rivlin *et al*. (1986)
A. doederleini	46	54	2m+6sm+38a/t	-	Ojima and Kojima (1985)
O. endekataenia	46	46	46a/t	-	Rishi (1973)
A. endekataenia	46	52	2m+4sm+16a+24t	-	Murofushi (1986)
ปลาอมไข่แถบแดง (*O. margaritophorus*)	46	-	-	/	การศึกษาครั้งนี้
A. moluccensis	46	46	46a/t	-	Rishi (1973)
ปลาอมไข่แถบกว้าง (*O. fasciatus*)	46	-	-	/	การศึกษาครั้งนี้
ปลาอมไข่ซิดนีย์ (*O. limenus*)	46	-	-	/	การศึกษาครั้งนี้
O. notatus	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Ojima and Kojima (1985)

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชนิด	2*n*	NF	สูตรแคริโอไทป์	FISH	เอกสารอ้างอิง
A. notatus	46	53	2m+5sm+39a/t	-	Ojima and Kojima (1985)
	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Ojima and Kojima (1985)
	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Murofushi (1986)
O. semilineatus	46	52	2m+4sm+20a+20t	-	Murofushi *et al*. (1980)
A. semilineatus	46	54	2m+6sm+38a/t	-	Ojima and Kojima (1985)
Phaeoptyx pigmentaria	38	-	6m+32sm/a/t	-	Rivlin *et al*. (1986)
ปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*)	46	92	4m+14sm+28a	/	การศึกษาครั้งนี้
ปลาอมไข่ตาแดง *(Sphaeramia nematotera)*	46	74	14sm+14a+18t	/	การศึกษาครั้งนี้
ปลาอมไข่ตาฟ้า *(S. orbicularis)*	46	50	4sm+42a/t	-	Ojima and Kojima (1985)
	46	68	8sm+ 14a+24t	/	การศึกษาครั้งนี้
ปลาอมไข่นีออน (*Zoramia leptacantha*)	46	-	-	/	การศึกษาครั้งนี้

หมายเหตุ: 2*n* = จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์, NF = จำนวนโครโมโซมพื้นฐานหรือจำนวนแขนโครโมโซม, m = โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก, sm = โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก, a = โครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก, st=โครโมโซมชนิดซับเทโลเซนทริก, t=โครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก, FISH = เทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน และ -= ไม่มีข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานการศึกษาครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลในปลาอมไข่ทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ครีบยาว (*P. kauderni*) ปลาอมไข่ตาดำ (*F. lateralis*) ปลาอมไข่ตาแดง (*S. nematoptera*) ปลาอมไข่ตาฟ้า (*S. orbicularis*) ปลาอมไข่นีออน (*Z. leptacantha*) ปลาอมไข่ขาว (*A. kopsii*) ปลาอมไข่แถบกว้าง (*O. fasciatus*) ปลาอมไข่จุดดำซิดนีย์ (*O. limenus*) และปลาอมไข่แถบแดง (*O. margaritophorus*) โดยใช้โพรบเทโลเมียร์ และโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S ผลของการไฮบริไดซ์โพรบเทโลเมียร์กับโครโมโซมปลาอมไข่ทั้ง 9 ชนิด พบว่าผลเป็นไปในแนวเดียวกัน คือ พบสัญญาณตรงตำแหน่งเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกแท่ง และไม่พบตรงตำแหน่งกลางแท่งหรือตำแหน่งอื่นของโครโมโซม ข้อมูลนี้บ่งชี้ให้ทราบว่าในระหว่างวิวัฒนาการทางโครโมโซมในปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิดนั้นไม่เกิดผ่านเซนทริกฟิวชัน (centric fusion) หรือแทนเด็มฟิวชัน (tandem fusion) สำหรับโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S พบสัญญาณตรงบริเวณใกล้เทโลเมียร์ของแขนข้างสั้นของโครโมโซมอะโครเซนทริกขนาดใหญ่จำนวน 1 คู่ ในปลา อมไข่ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ครีบยาว (*P. kauderni*) ปลาอมไข่ตาดำ (*F. lateralis*) ปลาอมไข่ ตาแดง (*S. nematotera*) ปลาอมไข่ตาฟ้า (*S. orbicularis*) เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาในวงศ์เดียวกันพบว่ามีรายงานเพียง 1 ชนิดเท่านั้น คือ ปลาอมไข่ *A. americanus* โดย Araújo *et al*. (2010) ที่ศึกษาด้วยโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S และ 5S ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสัญญาณของโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S พบตรงตำแหน่งเดียวกับตำแหน่งนอร์ที่ย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบนอร์ จำนวน 1 คู่ ตำแหน่งใกล้เทโลเมียร์แขนข้างสั้นของโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก คู่ที่ 8 ส่วนสัญญาณของโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 5S พบตรงตำแหน่งระหว่างเซนโทรเมียร์และ เทโลเมียร์ หรือที่เรียกว่าอินเทอร์สติเชียล (interstitial) ของโครโมโซมชนิดซับเทโลเซนทริก 2 คู่

จากข้อมูลผลการศึกษาจะพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างนิวคลีโอลัส (ไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S) ในวงศ์ปลาอมไข่จะอยู่บนโครโมโซม 1 คู่ ซึ่งเป็นลักษณะที่ถูกอนุรักษ์ไว้สำหรับปลาวงศ์นี้ การศึกษาด้วยเทคนิคอินซิทู ไฮบริไดเซชันนี้ยังสนับสนุนความแม่นยำของการย้อมด้วยแถบสีแบบนอร์ ซึ่งข้อจำกัดของแถบสีแบบนอร์นั้นจะพบว่าในปลาอมไข่ตาฟ้า ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาว มีความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมที่มีนอร์เกิดขึ้นบางตัวอย่างระหว่างโครโมโซมคู่เหมือน (นอร์ 1 หรือ 2 แท่ง) แต่ผลจากเทคนิคฟิช พบว่าโครโมโซมที่มีสัญญาณของยีนไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S มีจำนวน 2 แท่งในทุกตัวอย่างที่ศึกษา อย่างไรก็ตามเพื่อที่จะทำให้เข้าใจแบบแผนและ วิวัฒนาการของยีนกลุ่มนี้มากขึ้นมีความจำเป็นต้องศึกษาในปลาชนิดอื่นๆ ในวงศ์ปลาอมไข่ให้มากขึ้น

บทที่ 4

4.1 สรุปผลการวิจัย

ปลาอมไข่ทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ครีบยาว (*P. kauderni*) ปลาอมไข่ตาดำ (*F. lateralis*) ปลาอมไข่ตาแดง (*S. nematoptera*) ปลาอมไข่ตาฟ้า (*S. orbicularis*) ปลาอมไข่นีออน(*Z. leptacantha*) ปลาอมไข่ขาว (*A. kopsii*) ปลาอมไข่แถบกว้าง (*O. fasciatus*) ปลาอมไข่ซิดนีย์ (*O. limenus*) และปลาอมไข่แถบแดง (*O. margaritophorus*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง เหมือนกันทุกชนิด และปลาทั้ง 9 ชนิดพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างโครโมโซมปลาเพศผู้และเพศเมีย

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน (FISH) จำนวน 2 โพรบ ได้แก่ โพรบเทโลเมียร์ และโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S ปลาอมไข่ทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ครีบยาว (*P. kauderni*) ปลาอมไข่ตาดำ (*F. lateralis*) ปลาอมไข่ตาแดง (*S. nematoptera*) ปลาอมไข่ตาฟ้า (*S. orbicularis*) ปลาอมไข่นีออน (*Z. leptacantha*) ปลาอมไข่ขาว (*A. kopsii*) ปลาอมไข่แถบกว้าง (*O. fasciatus*) ปลาอมไข่จุดดำซิดนีย์ (*O. limenus*) และปลาอมไข่แถบแดง (*O. margaritophorus*) พบว่าสัญญาณของโพรบถูกพบบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกแท่ง

ผลการไฮบริไดซ์โพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอกับโครโมโซมของปลาอมไข่ทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ครีบยาว (*P. kauderni*) ปลาอมไข่ตาดำ (*F. lateralis*) ปลาอมไข่ตาแดง (*S. nematotera*) ปลาอมไข่ตาฟ้า (*S. orbicularis*) พบว่าสัญญาณของโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอ ถูกพบจำนวน 2 แท่งซึ่งเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก ตรงตำแหน่งใกล้กับเทโลเมียร์ของแขนข้างสั้น ในปลาทั้ง 4 ชนิด สำหรับปลาปลาอมไข่นีออน (*Z. leptacantha*) ปลาอมไข่ขาว (*A. kopsii*) ปลาอมไข่แถบกว้าง (*O. fasciatus*) ปลาอมไข่จุดดำซิดนีย์ (*O. limenus*) และปลาอมไข่แถบแดง (*O. margaritophorus*) ตรวจไม่พบตำแหน่งของยีนไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอบนโครโมโซม

บทที่ 5

5.1 ผลผลิต

ผลงานส่งตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 3 ฉบับ ได้แก่

1. Kasiroek, W., Luangoon, N., Indananda, C., Kaewmad, P., Tanomtong, A. and Supiwong, W. 2018. Characterization of Mitotic Chromosomes of Spotted Cardinalfish, *Sphaeramia nematoptera* (Perciformes: Apogonidae): Karyotypes and Chromosomal Nucleolar Organizer Region Phenotypes. *Cytologia*. (Submitted).
2. Kasiroek, W., Indananda, C., Pengseng, P., Patawang, I., Supiwong, W. and Tanomtong, A. 2018. Karyological Analysis of Orbiculate Cardinalfish, *Sphaeramia orbicularis* (Perciformes: Apogonidae) by Classical and FISH Techniques. *Cytologia*. (Submitted).
3. Kasiroek, W., Phimphan, S., Pinthong, K., Pengseng, P., Supiwong, W. and Tanomtong, A. 2018. Comparative Karyotype Analysis of Cardinalfishes (Perciformes, Apogonidae) in Thailand by Classical Cytogenetic and FISH Techniques. *OMB Genetics*. (Submitted).

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. (2553). *รวมกฎหมายลำดับรองที่เกี่ยวข้องกับการนำเข้า การส่งออกสัตว์น้ำ.* กรุงเทพฯ: สำนักบริหารจัดการด้านการประมง.

ชวลิต วิทยานนท์. (2551). คู่มือปลาทะเล. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์สารคดี.

สามารถ เดชสถิย์ และพรจันทร์ ปิ่นสุวรรณ. (2552). *คู่มือการเพาะพันธุ์ปลาอมไข่ครีบยาว Banggai Cardinalfish, Pterapogon koumans, 1933*. กระบี่: ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่.

อลงกลด แทนออมทอง. (2554). *พันธุศาสตร์เซลล์*. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Allen, G. R. (1997). *Tropical Reef fishes of Thailand*. Bangkok: Asia Books.

Alvarez, M. C., Otis, J., Amores, A., & Guise, K. (1991). Short-term cell culture technique for obtaining chromosomes in marine and freshwater fish. *Journal of FishBiology*, *39*, 817-824.

Araújo, W. C., Martínez, P. A., & Molina, W. F. (2010). Mapping of ribosomal DNA by FISH, EcoRI digestion and replication bands in the cardinalfish *Apogon americanus* (Perciformes). *Cytologia*, *75* (1), 109-117.

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

Cioffi, M. B., Martins, C., & Bertollo, L. A. C. (2009). Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genetics*, *10*, 34.

Cross, I., Merlo, A., Manchdo, M., Infante, C., Canavate, J. P., & Rebordinos, L. (2006). Cytogenetic characterization of the sole *Solea senegalensis* (Teleostei: Pleuronectiformes: Soleidae): Ag-NOR, (GATA)n, (TTAGGG)n and ribosomal genes by one-color and two-color FISH. *Genetica*, *128*, 253-259.

Fenner, B. (2014). *Cardinalfishes, Family Apogonidae.* Retrieved February 21, 2014, from http://www.wetwebmedia.com/cardinal.htm.

Fontana, F., Lanfredi, M., Congiu, L., Leis, M., Chicca, M., & Rossi, R. (2003). Chromosomal mapping of 18S–28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent in situ hybridization in six sturgeon species. *Genome, 46*, 473-477.

Froese, R., & Pauly, D., (eds). (2016). “Apogonidae” in *Fishbase*. Retrieved April 17, 2018, from http://www.fishbase.org,version(02/2018).

Galetti Jr., P. M., Aguilar, C. T., & Molina W. F. (2000). An Overview of Marine Fish Cytologenetics. *Hydrobiologia*, *420*, 55-62.

Kimura, S., Shibukawa, K., Matsuura, K., Peristiwady, T., & Suharti, S.R. (2003). Apogonidae. In Kimura, S. & Matsuura, K. (Eds.). *Fish of Bitung, Northern Tip of Sulawasi, Indonesia* (p. 61). Tokyo: Tokai University Press.

Liehr, T. (2009). *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) - Application Guide*. Berlin: Springer.

Mazzei, F., Ghigliotti, L., Bonillo, C., Coutanceau, J-P., Ozouf-Costaz, C., & Pisano, E. (2004). Chromosomal patterns of major and 5S ribosomal DNA in six icefish species (Perciformes, Notothenioidei, Channichthyidae). *Polar Biology*, *28*, 47-55.

Morrison, L. E., Ramkrishnan, R. Ruffalo, T. M., & Wilber, K. A. (2002). Labeling Fluorescence *in Situ* H*ybridizat*ion P*robes for* Genome Targets. In Fan, Y. S. (Ed.), Molecular Cytogenetics Protocols and Application (pp. 21-40). New Jersey: Humana Press.

Murofushi, M. (1986). A study of karyotype classification and karyotype evolution in marine teleosts. *Report of Mishima Research Institute of Science and Living*, *9*, 95-157.

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

Ojima, Y., & Kojima, T. (1985). Chromosomal polymorphisms in Apogonidae fishes. *Proceedings of Japan Academy, Series B*, *61*, 79-82.

Rishi, K. K. (1973). A preliminary report on the karyotypes of eighteen marine fishes. *Research Bulletin of the Punjab university*, *24*, 161-162.

Rivlin, K. A., Dale, G., & Rachlin, J. W. (1986). Karyotipic analysis of three species of cardinal fish (Apogonidae) and its implications for the taxonomic status of the genera *Apogon* and *Phaeoptyx*. *Annals of New York Academy of Sciences*, *463*, 211-213.

Rivlin, K. A., Rachlin, J. W., & Warkentine, B. E. (1988). G-banding of the chromosomes of *Apogon maculatus* and *A. pseudomaculatus* (Perciformes: Apogonidae). *Annals of New York academy of Sciences*, *529*, 160-163.

Ruth, B. P. & Kent, M. R. (1996). Application of Fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture, 140*, 197-216.

Singh, M., Kumar, R., Nagpure, N. S. Kushwaha, B., Gond, I., & Lakra, W. S. (2009). Chromosomal localization of 18S and 5S rDNA using FISH in the genus *Tor* (Pisces, Cyprinidae). *Genetica, 137,* 245-252.

Vicari, M.R., Artoni, R.F., & Bertollo, L.A.C. (2005). Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genetics and Molecular Biology*, *28***,** 103-110.

Yoshida, T., Motomura, H., Musikasinthorn, P., & Matsuura, K. (eds.). (2013). *Fishes of northern Gulf of Thailand*. Kagoshima: National Museum of Nature and Science, Tsukuba, Research Institute for Humanity and Nature, Kyoto, and Kagoshima University Museum.

ภาคผนวก

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

สารที่ใช้เตรียม

1) KCl crystal
2) น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 100 มิลลิลิตร)

ชั่งผลึก KCl 0.5588 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าจนผลึกละลายหมด เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ : น้ำยานี้มีอายุการใช้งาน 1-2 สัปดาห์

2.3 การเตรียม Colchicine

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

-สูตรที่ 2 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 โดยค่อยๆ รินกรด 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) แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 100 มิลลิลิตร (aseptic technique) เก็บที่ 2-8 องศาเซลเซียส