รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาโครโมโซมและความหลากหลายของแคริโอไทป์ในวงศ์ย่อยปลาบู่ (Subfamily Gobiinae)

Chromosomal Studies and Karyotypic Diversity in Subfamily Gobiinae

ภายใต้แผนงานวิจัยการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงปลาบู่ทะเล (Gobiidae)

เพื่อเพิ่มมูลค่าทางการค้าและการอนุรักษ์ที่ยั่งยืน

ที่ปรึกษาโครงการ

ศ.ดร.อลงกลด แทนออมทอง

หัวหน้าโครงการ

ดร.วรรณภา กสิฤกษ์

ผู้ร่วมโครงการ

ผศ.ดร.วีระยุทธ สุภิวงค์

นายณัฐวุฒิ เหลืองอ่อน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2561A10803050

สัญญาเลขที่ 96/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาโครโมโซมและความหลากหลายของแคริโอไทป์ในวงศ์ย่อยปลาบู่ (Subfamily Gobiinae)

Chromosomal Studies and Karyotypic Diversity in Subfamily Gobiinae

ภายใต้แผนงานวิจัยการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงปลาบู่ทะเล (Gobiidae)

เพื่อเพิ่มมูลค่าทางการค้าและการอนุรักษ์ที่ยั่งยืน

ที่ปรึกษาโครงการ

ศ.ดร.อลงกลด แทนออมทอง

หัวหน้าโครงการ

ดร.วรรณภา กสิฤกษ์

ผู้ร่วมโครงการ

ผศ.ดร.วีระยุทธ สุภิวงค์

นายณัฐวุฒิ เหลืองอ่อน

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 91/2561

ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการ และ เจ้าหน้าที่ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเข้ามาทางานวิจัย และอนุเคราะห์การใช้สถานที่และเครื่องมือในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณคณะนิสิตนักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือในการทำงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คุณชนะ เทศคง ที่ช่วยให้คำแนะนำในเรื่องชนิดของปลา

คุณประโยชน์ที่มีในรายงานการวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตเวทิตาแก่บิดา มารดา บูรพาจารย์และผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่าน รวมทั้งมหาวิทยาลัยบูรพา และมหาวิทยาลัยขอนแก่น

คณะผู้ทางานวิจัย

มิถุนายน 2562

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ดร.วรรณภา กสิฤกษ์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาโครโมโซมและความหลากหลายของแคริโอไทป์ในวงศ์ย่อยปลาบู่ (Subfamily Gobiinae)

Chromosomal Studies and Karyotypic Diversity in Subfamily Gobiinae

รหัสโครงการ 2561A10803050 / สัญญาเลขที่ 91/2561 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 494,600 บาท (สี่แสนเก้าหมื่นสี่พันหกร้อยบาทถ้วน)

ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี 9 เดือน (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2561 – 30 มิถุนายน 2562)

การศึกษาโครโมโซมและความหลากหลายของแคริโอไทป์ในวงศ์ย่อยปลาบู่ (Subfamily Gobiinae)

บทคัดย่อ

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของวงศ์ย่อยปลาบู่ (Gobiinae) ในประเทศไทย 8 ชนิด ได้แก่ ปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) ปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) ปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) ปลาตีน (*Glossogobius giuris*) ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) ปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*V. muralis*) และปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*V. strigata*) เตรียมโครโมโซมจากไตด้วยวิธีการบดขยี้เซลล์ และการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์ ผลการศึกษาพบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46, 50, 50, 46, 46, 44, 44 และ 44 แท่ง ตามลำดับ มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 82, 88, 100, 46, 46, 46, 44 และ 48 ตามลำดับ สามารถจัดสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้ ปลาบู่กุ้งยักษ์ (2sm + 34a + 10t), ปลาบู่หัวโต (2sm + 36a + 12t), ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (12sm + 12sm + 26a), ปลาบู่หินดำ (46t), ปลาตีน (44t), ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (2m + 42t), ปลาบู่ทรายเส้นชมพู (44t) และปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (2m + 2a + 40t) ตรวจไม่พบความแตกต่างของของคาริโอไทป์ระหว่างปลาบู่เพศผู้และเพศเมีย การย้อมแถบสีแบบนอร์พบนอร์ 2 ตำแหน่งในปลาบู่ทุกชนิด ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ที่ได้นี้แสดงถึงความแปรผันทางโครโมโซมของปลาที่ศึกษาทั้งภายในสกุลและระหว่างสกุลที่ซึ่งมีความใกล้ชิดกัน ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ครั้งแรกของปลาปลาบู่กุ้งยักษ์ ปลาบู่หัวโต ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด ปลาบู่หินดำ ปลาตีน ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า ปลาบู่ทรายเส้นชมพู และปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า การศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาของประเทศไทย ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับองค์ความรู้ด้านอนุกรมวิธาน พันธุศาสตร์ วิวัฒนาการ และชีววิทยาโมเลกุล

คำสำคัญ : วงศ์ย่อยปลาบู่, พันธุศาสตร์ระดับเซลล์, โครโมโซม, คาริโอไทป์

Chromosomal Studies and Karyotypic Diversity in Subfamily Gobiinae

ABSTRACT

Cytogenetics of eight species of some fishes (subfamily Gobiinae) in Thailand were studied such as *Amblyeleotris* sp., *Acentrogobius viridipunctatus*, *Aulopareia janetae*, *Butis amboinensis*, *Glossogobius giuris*, *Valenciennea sexguttata*, *V. muralis* and *V. strigata*. Chromosomes from kidney tissue and T-lymphocyte cell culture and square techniques were prepared by breaking cell and followed by conventional staining and NOR-banding techniques. The result showed that diploid chromosome number (2*n*) of 46, 50, 50, 46, 46, 44, 44 and 44, respectively with the fundamental number (NF) or chromosome arms of 82, 88, 100, 46, 46, 46, 44 and 48, respectively. The karyotypic formula of fishes can be shown as following: *Amblyeleotris* sp. (2sm + 34a + 10t), *Acentrogobius viridipunctatus* (2sm + 36a + 12t), *Aulopareia janetae* (12sm + 12sm + 26a), *Butis amboinensis* (46t), *Glossogobius giuris* (44t), *V. sexguttata* (2m + 42t), *V. muralis* (44t) and *V. strigata* (2m + 2a + 40t). No strange size chromosomes related to sex was observed in all species. The results showed all species had NORs 2 positions. The obtained results revealed the variations found in the chromosomal characteristics within genus and among the closely related genera. In addition, we appreciate to present that the findings which were obtained in the present study provide the first cytogenetic reports on *Amblyeleotris* sp., *Acentrogobius viridipunctatus*, *Aulopareia janetae*, *Butis amboinensis*, *V. sexguttata*, *V. muralis* and *V. strigata*. All obtained results of the present study are basic information of fish biology and genetic diversity which is useful for taxonomy, genetics, evolution and molecular biology of these fishes.

Key Words: Subfamily Gobiinae, Cytogenetics, chromosome, karyotype

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ข
บทคัดย่อ	ค
สารบัญ	จ
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ฎ
บทที่ 1	1
1.1 รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของวงศ์ปลาบู่ (subfamily Gobiinae)	1
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	6
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	9
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย	9
บทที่ 2	10
2.1 วิธีดำเนินการวิจัย	10
2.2 ผลการวิจัย	15
บทที่ 3	77
3.1 วิจารณ์ผลการวิจัย	77
บทที่ 4	80
4.1 สรุปผลการวิจัย	80
บทที่ 5	83
5.1 ผลผลิต	83
รายงานสรุปการเงิน	84
เอกสารอ้างอิง	86
ภาคผนวก	89
ประวัตคณะผู้วิจัย	93

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 2.1 ลักษณะภายนอกของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp	16
ภาพที่ 2.2 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	17
ภาพที่ 2.3 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	18
ภาพที่ 2.4 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	19
ภาพที่ 2.5 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	20
ภาพที่ 2.6 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	21
ภาพที่ 2.7 อิดิโอแกรมของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	22
ภาพที่ 2.8 ลักษณะภายนอกของปลาบู่ หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*)	24
ภาพที่ 2.9 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	25
ภาพที่ 2.10 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	26
ภาพที่ 2.11 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของ ปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	27

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 2.12 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	28
ภาพที่ 2.13 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	29
ภาพที่ 2.14 อิดิโอแกรมของปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	30
ภาพที่ 2.15 ลักษณะภายนอกของปลาบู่ แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*)	32
ภาพที่ 2.16 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	33
ภาพที่ 2.17 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	34
ภาพที่ 2.18 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของ ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	35
ภาพที่ 2.19 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	36
ภาพที่ 2.20 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่ แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	37
ภาพที่ 2.21 อิดิโอแกรมของปลาบู่ แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	38
ภาพที่ 2.22 ลักษณะภายนอกของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*)	40
ภาพที่ 2.23 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 2.24 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	42
ภาพที่ 2.25 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	43
ภาพที่ 2.26 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	44
ภาพที่ 2.27 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	45
ภาพที่ 2.28 อิดิโอแกรมของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	46
ภาพที่ 2.29 ลักษณะภายนอกของปลาตีน (*Glossogobius giuris*)	48
ภาพที่ 2.30 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	49
ภาพที่ 2.31 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	50
ภาพที่ 2.32 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	51
ภาพที่ 2.33 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	52
ภาพที่ 2.34 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาตีน (*Glossogobius giuris*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 2.35 อิดิโอแกรมของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	54
ภาพที่ 2.36 ลักษณะภายนอกของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*)	56
ภาพที่ 2.37 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	57
ภาพที่ 2.38 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	58
ภาพที่ 2.39 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	59
ภาพที่ 2.40 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	60
ภาพที่ 2.41 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	61
ภาพที่ 2.42 อิดิโอแกรมของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	62
ภาพที่ 2.43 ลักษณะภายนอกของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*)	64
ภาพที่ 2.44 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	65
ภาพที่ 2.45 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 2.46 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	67
ภาพที่ 2.47 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	68
ภาพที่ 2.48 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	69
ภาพที่ 2.49 อิดิโอแกรมของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์	70
ภาพที่ 2.50 ลักษณะภายนอกของปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*Valenciennea strigata*)	72
ภาพที่ 2.51 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*Valenciennea strigata*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	73
ภาพที่ 2.52 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*Valenciennea strigata*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	74
ภาพที่ 2.53 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*Valenciennea strigata*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา	75

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1.1 การศึกษาพันุศาสตร์เซลล์ของปลาบู่วงศ์ย่อย Goniinae (Arai, 2011)	2
ตารางที่ 2.1 จำนวนตัวอย่างปลาบู่ที่ศึกษาในครั้งนี้	10
ตารางที่ 2.2 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 ของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง	23
ตารางที่ 2.3 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 ของปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง	31
ตารางที่ 2.4 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 ของปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง	39
ตารางที่ 2.5 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 ของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง	47

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ 2.6 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 ของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง 55

ตารางที่ 2.7 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 ของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซม ดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง 63

ตารางที่ 2.8 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 ของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง 71

ตารางที่ 2.9 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 ของปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*Valenciennea strigata*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง 76

บทที่ 1

1.1 รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของวงศ์ย่อยปลาบู่ (subfamily Gobiinae)

ข้อมูลจากการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของปลามีประโยชน์ต่อการศึกษาด้านวิวัฒนาการและอนุกรมวิธาน อีกทั้งยังเป็นข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนด้านการปรับปรุงพันธุ์สำหรับพันธุ์ปลาเศรษฐกิจ (Gold *et al*., 1979) จากอดีตที่ผ่านมามีหลายเทคนิคที่ใช้เพื่อเตรียมโครโมโซมในระยะ เมทาเฟส (metaphase) เพื่อศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ในปลา ตั้งแต่การเตรียมโครโมโซมโดยวิธีทางตรงจนถึงเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Denton, 1973; Ojima, 1982; Alvarez *et al*., 1991) และเทคนิคที่นิยมใช้มากที่สุด คือ การเตรียมโครโมโซมโดยวิธีทางตรงจากเซลล์เนื้อเยื่อของไตปลา ซึ่งสามารถช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายได้ (Egozcue, 1971; Gold, 1974; Rivlin *et al*., 1985) อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวมีข้อจำกัด คือ ตัวอย่างปลาที่ศึกษาจะต้องมี ชีวิต ซึ่งปลาส่วนใหญ่รวมทั้งปลาบู่เป็นปลาที่ค่อนข้างเสียชีวิตง่ายหากการเก็บตัวอย่างไม่เหมาะสมซึ่งส่งผลเสียต่อการเตรียมโครโมโซม (Ozouf-Costaz and Foresti, 1992; Maddock and Schwartz, 1996)

ปลาเป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายมากที่สุดของสัตว์มีกระดูกสันหลังกว่า 25,000 ชนิด ซึ่งมีความหลากหลายทั้งด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา นิเวศวิทยา ชีวิตประวัติ พฤติกรรม และมีความหลากหลายทางด้านจีโนม (genome) (Smith and Gregory, 2009) อย่างไรก็ตามแม้จะมีรายงานในการประมาณขนาดจีโนมของปลา แต่ข้อมูลพื้นฐาน เช่น จำนวนโครโมโซมและแคริโอไทป์ยังมีข้อมูลน้อยมากเมื่อเทียบกับจำนวนชนิดปลา การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับเซลล์จึงเป็นข้อมูลที่สำคัญในการสนับสนุน และเติมเต็มข้อมูลด้านอื่น ๆ โดยเฉพาะจีโนมของปลาให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น Lagler และคณะ (1977) ได้รวบรวมข้อมูลจำนวนโครโมโซมของปลาครั้งแรกประมาณ 400 ชนิด (1.6%) หลังจากนั้นได้มีการศึกษาและมีรายงานด้านโครโมโซมของปลาเพิ่มมากขึ้น (Klinkhardt *et al*., 1995) และมีรายงานการวิเคราะห์ความหลากหลายของแคริโอไทป์ที่สนับสนุนทฤษฎีการเกิดชนิดพันธุ์ปลาใหม่เกี่ยวกับกลไกการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม และการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (polyploidization) ในสายพันธุ์ปลา (Sola *et al*., 1981) ซึ่งนักวิจัยได้เสนอว่ากลไกดังกล่าวนี้เป็นกระบวนการที่เกิดจากวิวัฒนาการระดับเซลล์ (cyto-evolutionary) (Schultz, 1980) จากข้อมูลสรุปได้ว่าปลาที่เป็นสมาชิกอย่างน้อย 9 อันดับ (order) จากทั้งหมด 45 อันดับในชั้น (class) Teleostomi อาจเป็นชนิดพันธุ์ที่มีวิวัฒนาการทางด้านโครโมโซมแบบการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมซึ่งคิดเป็น 20% จากการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของปลาทะเลพบว่า ปลาทะเลมีจำนวนโครโมโซมแปรผันตั้งแต่ 2*n* (diploid) = 22-26 แท่ง ในปลาทะเลบางชนิดในวงศ์ Nototheniidae ซึ่งเป็นปลาทะเลที่อาศัยในแถบแอนตาร์คติค มีจำนวนโครโมโซม 2*n*=240-260 แท่ง ในปลาที่เป็นสมาชิกในวงศ์ Acipenseridae ซึ่งพบว่ามีจำนวนไมโครโครโมโซมชุดเล็ก (microchromosomes) เป็น จำนวนมาก (Galetti *et al*., 2000) แต่จากการศึกษาพบว่าปลาทะเลโดยส่วนใหญ่มีลักษณะแคริโอไทป์ที่คล้ายกัน ซึ่งปลาบู่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีลักษณะของแคริโอไทป์ที่แตกต่างกัน

จากการตรวจเอกสารรายการการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของวงศ์ปลาบู่ ส่วนใหญ่ศึกษาโครโมโซมด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดา ทั้งนี้ลักษณะจำเพาะหรือความเป็นเอกลักษณ์บนโครโมโซมมีความสำคัญทำให้เราทราบลักษณะ โครงสร้างของโครโมโซมมากขึ้น นอกจากนี้ปลากลุ่มปลาบู่ส่วนใหญ่ในน่านน้ำทะเลของประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษาโครโมโซม จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษา เพื่อจะนำไปสู่การศึกษาต่อยอดในอนาคต (ตารางที่ 1.1)

ตารางที่ 1.1 การศึกษาพันุศาสตร์เซลล์ของปลาบู่วงศ์ย่อย Goniinae (Arai, 2011)

ชนิด	2*n*	NF	สูตรแคริโอไทป์	NOR
Acentrogobius pflaumi	50	98	48m/sm/st+2a	-
	50	86	36m/sm+14st/a	-
Amblygobius phalaena	44	46	2m+42st/a	-
Aphia minuta	44	44	44a	-
	43	44	1st+42a	-
	42	44	1m+1st+40a	-
	42	44	2m+40a	-
	41	44	2m+1st+38a	-
Bathygobius fuscus	48	48	48a	-
	44	44	44a	-
Bathygobius soporator	46	48	-	-
Benthophilus leobergius	44	48	2sm+2st+40a	-
Benthophilus stellatus	44	46	2st+42a	-
Benthophilus leobergius	44	47	1sm2st+41a	-
Caspiosoma caspium	48	82	4sm+30st+14a	-
Favonigobius gymnauchen	48	96	48m/sm	-
Glossogobius giuris	46	46	46a	-
Glossogobius olivaceus	46	68	16sm+6st+24a	-
Gobiodon citrinus	44	46	2m+42st/a	-
	43	44	1m+42st/a	-
Gobiodon quinquestrigatus	44	44	44st/a	-

ตารางที่ 1.1 (ต่อ) การศึกษาพันุศาสตร์เซลล์ของปลาบู่วงศ์ย่อย Goniinae (Arai, 2011)

ชนิด	2*n*	NF	สูตรแคริโอไทป์	NOR
Gobiopsis macrostoma	46	60	10m+4sm+32a	-
Gobiodon rivulatus rivulatus	44	44	44st/a	-
Gobiosoma macrodo	38	38	38a	-
Gobiosoma zebrellus	38	38	38a	-
	37	38	1m+36a	-
Gobius bucchichi	40	46	4m+2sm+34a	-
	44	46	2sm+42a	-
Gobius cobitis	46	46	46a	-
	46	46	46a	-
	46	46	46a	-
Gobius couchi	46	48	2sm+44a	-
Gobius cruentatus	46	48	2st+44a	-
Gobius fallax	38	46	8m/sm+30a	-
	39	46	7m/sm+32a	-
	40	46	6m/sm+34a	1-4
	40	47	7m/sm+33a	-
	41	36	5m/sm+36a	-
	42	46	4m/sm+38a	-
	43	46	3m/sm+40a	-
Gobius niger	46	-	-	-
	50	63	1m+12sm+37a	-
	48	66	4m+4sm+10st+30a	2
	50	68	4m+4sm+10st+32a	-
	51	68	3m+4sm+10st+34a	-

ตารางที่ 1.1 (ต่อ) การศึกษาพันุศาสตร์เซลล์ของปลาบู่วงศ์ย่อย Goniinae (Arai, 2011)

ชนิด	2*n*	NF	สูตรแคริโอไทป์	NOR
Gobius niger jozo	48	64	2m+6sm+8st+32a	-
	50	-	-	-
	52	70	8m/sm+10st+28a+6mc	-
	51	70	9m/sm+10st+26a+6mc	-
	50	70	10m/sm+10st+30a	-
	49	70	11m/sm+10st+28a	-
	52	56	4sm+48st/a	-
	52	57	1m+4sm+47st/a	-
Gobius ophiocephalus	45	46	1m+44a	-
	46	46	46a	-
Gobius paganellus	45	46	1m+44st/a	4
Gobius paganellus	45	48	3m+42st/a	4
	45	47	2m/sm+43st/a	4
	46	46	46st/a	-
	46	47	1m/sm+45st/a	-
	46	48	2m/sm+44st/a	-
	46	48	2m+44a	-
	46	47	1m+45a	-
	47	48	1m/sm+46st/a	-
Gobius paganellus	47	48	1m/sm+46st/a	-
	47	47	47st/a	-
	48	48	48a	-
	48	48	48st/a	-
	48	49	1sm+47a	-
	48	49	1m/sm+47a	-
Gobiusculus flavescens	46	52	6m/sm+40a	2
Mesogobius batrachocephalus	30	46	16m/sm+14a	-
	30	46	16m+14a	-

ตารางที่ 1.1 (ต่อ) การศึกษาพันุศาสตร์เซลล์ของปลาบู่วงศ์ย่อย Goniinae (Arai, 2011)

ชนิด	2*n*	NF	สูตรแคริโอไทป์	NOR
Neogobius cephalargoides	46	46	46a	-
Neogobius constructor	42	46	4m/sm+38a	-
	44	46	2m+42a	-
	44	48	2m+2sm+40a	-
Neogobius cyrius	37	48	9m/sm+2st+26a	-
	38	46	8m/sm+30a	-
	40	46	6m/sm+34a	-
	41	47	5m/sm+1st+35a	-
Neogobius eurycephalus	32	46	12m+2sm+18a	2
	31	46	13m+2sm+16a	2
Neogobius fluviatilis fluviatilis	30	46	14m+2sm+14a	2
	46	46	46a	-
Neogobius fluviatilis	46	46	46a	-
pallasi Neogobius gorlap	46	-	46st/a	-
Neogobius gymnotrachelus	46	46	46a	-
Neogobius kessleri	46	48	2m/st+44a	-
	46	48	1m+1sm+44a	-
Neogobius kessleri kessleri	30	46	14m+2sm+14st/a	-
Neogobius melanostomus	29	-	15m+2sm+12st/a	-
	30	46	14m+2sm+14a	-
	29	46	17m/sm+12a	-
	46	46	46a	-
Neogobius melanostomus affinis	46	46	46a	-
Neogobius melanostomus	46	46	46a	-
Neogobius rhodioni	46	54	46a	-
Padogobius bonelli	46	62	3m+2sm+3st+38a	-
Pomatoschistus lozanoi	37	92	3m+12sm+10st+12a	-

ตารางที่ 1.1 (ต่อ) การศึกษาพันุศาสตร์เซลล์ของปลาบู่วงศ์ย่อย Goniinae (Arai, 2011)

ชนิด	2*n*	NF	สูตรแคริโอไทป์	NOR
Pomatoschistus microps	46	86	30sm+16st	-
	46	82	4m+16sm+20st+6a	-
Pomatoschistus minutus	46	82	4m+16sm+16st+10a	-
	46	82	18sm+18st+10a	2
	46	76	6sm+24st+16a	-
Pomatoschistus norvegicus	32	60	10m+10sm+8st+4a	-
Pomatoschistus pictus	46	80	22m/sm+12st+12a	2
Proterorhinus marmoratus	46	46	46a	-
	46	46	46a	-
Valenciennea muralis	46	46	46a	-
Valenciennea strigata	44	46	2m+42st/a	-
Yongeichthys criniger	50	90	34m/sm+6st+10a	-
Zosterisessor ophiocephalus	46	48	2m+44st/a	2
	46	46	46a	-

หมายเหตุ : 2n = จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์, NF = โครโมโซมพื้นฐาน (จำนวนแขนโครโมโซม) NOR = โครโมโซมเครื่องหมายมีตำแหน่งนอร์ m = โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก sm = โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก st = โครโมโซมชนิดซับเทโลเซนทริก a = โครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก mc = โครโมโซมชุดเล็ก และ - ไม่มีข้อมูล

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยมีภูมิประเทศที่หลากหลายก่อให้เกิดระบบนิเวศที่แตกต่างกัน ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของพืชและสัตว์รวมถึงกลุ่มปลา ซึ่งเป็นกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีความหลากหลายของชนิด (species) มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มอื่น ๆ ปัจจุบันมีการประเมินว่ามีปลาอยู่ทั้งสิ้นมากกว่า 25,000 ชนิด มีรูปร่างและรูปทรงที่หลากหลายทั้งที่เป็นรูปร่างแบนข้าง กลมหรือแบน มีขนาดตั้งแต่ขนาดใหญ่มากความยาว 13-15 เมตร จนถึงขนาดเล็กมากประมาณ 1 เซนติเมตร (ชวลิต วิทยานนท์, 2548) โดยมีการใช้ประโยชน์จากปลาทั้งการบริโภค เพื่อความสวยงามรวมถึงการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้า

นอกจากจะมีความสำคัญทางเศรษฐกิจแล้ว ในด้านนิเวศวิทยาและการอนุรักษ์ปลายังเป็นตัวบ่งชี้ความสมดุลทางธรรมชาติได้ดี โดยจะทราบจากสภาพความหลากชนิดของปลาที่มีอยู่ และพิจารณาจากแนวโน้มความเปลี่ยนแปลง ปลาเป็นกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีวิวัฒนาการต่ำที่สุด และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากทั้งระดับโครโมโซม (chromosome) และระดับยีน (gene) จึงทำให้มีความน่าสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับด้านวิวัฒนาการ (evolution) เซลล์อนุกรมวิธาน (cytotaxonomy) และความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) จากรายงานความหลากชนิดของปลาน้ำจืดและปลาทะเลในประเทศไทย จะเห็นได้ว่าเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากชนิดของปลาอันดับต้น ๆ ของโลก (ชวลิต วิทยานนท์, 2548 และภาสกร แสนจันแดง, 2557)

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม รวมทั้งการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรปลาที่มากเกินไป ขาดการวางแผนการจัดการที่เหมาะสม ขาดองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับปลาและขาดการศึกษาชีววิทยาด้านต่าง ๆ ทำให้ปริมาณปลาลดลงในธรรมชาติเป็นจำนวนมาก ปัจจัยที่ทำให้การอนุรักษ์สัตว์ด้อยประสิทธิภาพ คือ ขาดข้อมูลทางด้านชีววิทยาของสัตว์ชนิดที่ต้องการอนุรักษ์ เพราะการอนุรักษ์สัตว์ชนิดใดก็ตามจำเป็นต้องรู้ข้อมูลพื้นฐานเสียก่อนว่าในสัตว์แต่ละชนิดต้องการอะไร และในช่วงเวลาใด เพื่อนำมาใช้เป็นมาตรการสำหรับป้องกันพื้นที่อาศัย แหล่งอาหาร และพื้นที่ผสมพันธุ์ได้อย่างถูกต้อง ข้อมูลด้านลักษณะของโครโมโซมจึงเป็นข้อมูลพื้นฐานอย่างหนึ่งที่จำเป็นต่อการนำไปใช้ประโยชน์ด้านการอนุรักษ์ (วีรยุทธ์ เลาหะจินดา, 2557) การศึกษาด้านพันธุกรรมของปลาส่วนใหญ่ของประเทศไทยยังมีข้อมูลที่น้อยมาก โดยเฉพาะข้อมูลเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ (cytogenetics) ของปลา เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาพื้นฐาน และพันธุกรรมของปลาของประเทศไทยอย่างเร่งด่วน

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเกิดจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของสิ่งมีชีวิต ส่งผลให้เกิดความแตกต่างในระดับพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันมียีนที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดโปรตีนและกระบวนการชีวเคมีที่ต่างกันออกไป สิ่งมีชีวิตจึงมีความหลากหลายในทางพันธุกรรมที่ปรากฏออกมา ความหลากหลายทางพันธุกรรมปรากฏออกมาใน 2 ระดับ คือ ระดับโครโมโซม และระดับดีเอ็นเอ (DNA, deoxyribonucleic acid) ในระดับโครโมโซมสามารถตรวจสอบด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ และในระดับโมเลกุล ได้แก่ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน สามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล เช่น polymerase chain reaction (PCR), electrophoresis, Southern blotting, Northern blotting, Western blotting รวมทั้งการใช้เทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) เป็นต้น (ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ, 2546 และสมพร ประเสริฐส่งสกุล, 2547)

ปลาในวงศ์ปลาบู่เป็นปลาที่มีความสำคัญอีกกลุ่มหนึ่ง เนื่องจากเป็นปลาที่เนื้อมีรสชาติดี มีก้างน้อย ปลากลุ่ม นี้จึงเป็นปลาที่นิยมนำมาประกอบอาหารได้หลายชนิด บางชนิดของปลาบู่ทะเลนั้นยังมี

ความสวยงามสามารถเลี้ยงเป็นปลาตู้ได้ นอกจากนี้ปลาบู่มีความสำคัญทางด้านการประมง และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยอีกชนิดหนึ่ง ปัจจุบันมีการวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาสายพันธุ์ปลาบู่ และการเพาะเลี้ยงเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามในช่วงสองถึงสามทศวรรษที่ผ่านมานี้ได้มีการวิจัยที่เน้นไปทางด้านพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับงานด้านระบบอนุกรมวิธาน การกลายพันธุ์ และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การศึกษาแคริโอไทป์เป็นการศึกษาถึงองค์ประกอบของพันธุกรรมในระดับโครโมโซมที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด หรือเป็นตัวแทนพันธุกรรมของประชากรสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ ในด้านขนาด ลักษณะและจำนวนของโครโมโซม ในทางทฤษฎีเซลล์ร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้นก็จะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันในทุกเซลล์ ดังนั้นจำนวน ขนาดและลักษณะของโครโมโซมจึง ใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ในการจำแนกชนิด และแสดงถึงความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันของปลาแต่ละสกุลหรือแต่ละวงศ์ได้

มีการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์อย่างกว้างขวางในสัตว์หลายชนิด ทำให้มีการพัฒนาเทคนิคหลาย ๆ อย่างเพื่อให้การวิจัยได้บรรลุผลที่ต้องการ รวมถึงการปรับเทคนิคให้เข้ากับชนิดสัตว์ที่ศึกษา เนื่องจากวิธีการและสารเคมีที่เหมาะสมสำหรับใช้ในสัตว์แต่ละชนิดไม่เหมือนกัน การศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ในกลุ่มปลาในประเทศไทยยังมีน้อยมาก จำนวนมากชนิดยังไม่มีข้อมูลในระดับสากล ปัจจุบันการศึกษาทางพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ในปลากำลังเป็นที่สนใจของนักพันธุศาสตร์ เนื่องจากข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นเครื่องมือเพิ่มเติมสำหรับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน ในกรณีที่มีความยุ่งยากในการจัดจำแนก ข้อมูลด้านเหล่านี้ยังช่วยให้เราเข้าใจวิถีการเกิดวิวัฒนาการของกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง เนื่องจากปลาเป็นจุดเริ่มต้นของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ปลาหลายชนิดมีความแตกต่างผันแปรทางด้านพันธุกรรมค่อนข้างมาก การวิเคราะห์ลักษณะโครโมโซมและในระดับยีน สามารถทำให้เราเข้าใจกระบวนการเกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ (speciation) การปรับปรุงสายพันธุ์ และการเพาะเลี้ยงปลาทะเล ยังสามารถใช้ความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์เข้าช่วยการคัดเลือกพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์ปลา และการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปลา รวมถึงการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมในธรรมชาติ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเอกลักษณ์ ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทาง วิวัฒนาการของปลาวงศ์ปลาบู่ด้านพันธุศาสตร์ระดับเซลล์จำนวน 8 ชนิด ที่พบได้ในทะเลของประเทศไทย โดย เทคนิคการเตรียมโครโมโซมทางตรงจากไต และการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว การย้อมสีแบบธรรมดา และแถบสีแบบนอร์ การจัดทำแคริโอไทป์ (karyotype) และอิดิโอแกรม (idiogram) มาตรฐาน การดูโครโมโซมเครื่องหมาย โดยมีเป้าหมายที่จะตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิชาการในระดับนานาชาติที่อยู่ในฐานข้อมูลสากล (ISI และ SCOPUS) จำนวน 2 เรื่อง เพื่อให้ใช้เป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมปลาบู่ในเขตน่านน้ำไทยที่ได้ทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงหรือพัฒนาสายพันธุ์และการ อนุรักษ์ สายพันธุ์ดั้งเดิมต่อไป

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อระบุชนิดของวงศ์ย่อยปลาบู่ (subfamily Gobiinae) ที่นำมาจากแหล่งที่มาต่าง ๆ กัน ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และวิธีการทางพันธุศาสตร์ระดับเซลล์

1.2.2 เพื่อทำการเปรียบเทียบจำนวน (diploid number, 2*n*) ชนิด (type) ขนาด (size) ของโครโมโซม จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number, NF) และโครโมโซมเครื่องหมาย (chromosome marker) ของปลาบู่ จำนวน 8 ชนิด

1.2.3 เพื่อจัดคาริโอไทป์ (karyotype) มาตรฐานของปลาบู่ จำนวน 8 ชนิด

1.2.4 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการศึกษาด้านการปรับปรุงสายพันธุ์ การคัดเลือกพ่อ-แม่พันธุ์ปลา เพื่อการเพาะเลี้ยง การอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมในธรรมชาติ

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการศึกษาสัณฐานวิทยา และพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของวงศ์ย่อยปลาบู่จากแหล่งที่มาต่าง ๆ กัน และจากลูกพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงได้

บทที่ 2

2.1 วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ การเก็บตัวอย่าง การเตรียมโครโมโซม การย้อมสีโครโมโซม การตรวจสอบโครโมโซม และการจัดคาริโอไทป์มาตรฐาน

2.1.1 การเก็บตัวอย่าง

2.1.1.1 เก็บตัวอย่างวงศ์ย่อยปลาบู่ จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ ปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) ปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) ปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) ปลาตีน (*Glossogobius giuris*) ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) ปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*V. muralis*) และปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*V. strigata*) จำนวนตัวอย่างปลาแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ .1 (รวมตัวอย่างวงศ์ย่อยปลาบู่ทั้งหมด 83 ตัว) ตัวอย่างปลาที่เก็บมาได้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ตัวอย่างสำหรับตรวจสอบเอกลักษณ์ปลา และตัวอย่างสำหรับเตรียมโครโมโซม

ตารางที่ 2.1 จำนวนตัวอย่างปลาบู่ที่ศึกษาในครั้งนี้

ชนิดปลา	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	รวม (ตัว)
ปลาบู่กุ้งยักษ์	4	4	8
ปลาบู่ หัวโต	5	5	10
ปลาบู่ แก้มตกสะเก็ด	5	6	10
ปลาบู่หินดำ	6	6	12
ปลาตีน	5	5	10
ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า	7	5	12
ปลาบู่ทรายเส้นชมพู	5	6	11
ปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า	5	5	10

2.1.1.2 นำตัวอย่างปลาที่เก็บได้มาเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการเรือนสัตว์ทดลอง โดยเลี้ยงในตู้เลี้ยงปลาขนาด 60x120x50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ให้ก๊าซออกซิเจนตลอดเวลา และให้อาหารวันละ 1 ครั้ง เลี้ยงไว้อย่างน้อย 7 วัน

2.1.1.3 นำตัวอย่างปลามาตรวจสอบและระบุชนิด ใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่เป็นที่ยอมรับยึดตามฐานข้อมูลออนไลน์ Catalog of Fishes (Eschmeyer, 2016) ลักษณะที่ใช้ตรวจสอบได้แก่ ลักษณะความยาวลำตัวต่อความลึก ความยาวของครีบอกต่อความยาวลำตัว จำนวนเกล็ด สีของลำตัว จำนวนกระดูกเหงือก จำนวนซี่เหงือก ความยาวและความกว้างของส่วนหัว เป็นต้น และทำการถ่ายภาพตัวอย่างปลาแต่ละชนิด

2.1.2 การเตรียมโครโมโซม

2.1.2.1 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 ชั่วโมงฉีดโคลชิซิน 0.05% ขนาด 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เข้าไปในกล้ามเนื้อ (intramusculary injection) ของปลา 1 ชั่วโมง สลบปลาโดยใช้น้ำแข็ง นำเฉพาะส่วนของไตมา ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และบดโดยเติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.075 โมลาร์ (KCl 0.075 M) กรองเศษเซลล์ขนาดใหญ่ออกด้วยตะแกรงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร เทตะกอนเซลล์ขนาดเล็กลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 นาที นำตะกอนเซลล์ไปปั่นที่ 1,200-1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสข้างบน เติมน้ำยาตรึงสภาพ (fixative) ที่มีส่วนผสมของเมทานอล 3 ส่วนต่อกรดอะซิติก 1 ส่วน (methanol: acetic acid; 3:1) ที่เตรียมใหม่ ๆ และเย็นจัด นำสารละลายไปปั่นที่ 1,200-1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสข้างบน เติมน้ำยาตรึงสภาพลงไป 7-8 มิลลิลิตร ปั่นอีกครั้ง ทำซ้ำเพื่อล้างตะกอนเซลล์ให้สะอาด เก็บตะกอนเซลล์ในสารละลาตรึงเซลล์ไว้ที่ -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 เติมสารละลายโคลซิซิน 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 เติมสารละลาย KCl เข้มข้น 0.075 M 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้การกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง แล้วนำไปบ่มที่ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นอีกรอบ และทิ้งสารละลายส่วนบนเหลือแต่ตะกอนเซลล์ ค่อย ๆ เติมน้ำยาตรึงสภาพที่

เตรียมใหม่ ๆ และเย็นจัด ทีละหยด นำไปปั่น 3-4 ครั้งจนได้ตะกอนเซลล์สีขาว เก็บตะกอนเซลล์ในสารละลายตรึงเซลล์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.1.2.2 เตรียมโดยทางอ้อม (indirect method)

โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cell culture) ใช้วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวปริมาณน้อย ดัดแปลงจากวิธีของ Fujiwara *et al*. (2001) มีวิธีการ ดังนี้

เก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณใต้เส้นข้างลำตัว หรือจากหัวใจโดยใช้เข็มที่ติดกับกระบอกฉีดยาปลอดเชื้อที่เคลือบสารโซเดียมเฮพาริน เก็บตัวอย่างเลือดในน้ำแข็ง หรือ 4 องศาเซลเซียส เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM media ที่เย็น 5 มิลลิลิตร ลงในเลือด 0.1 มิลลิลิตรในหลอดปลอดเชื้อ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นที่ 1,250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บเม็ดเลือดขาวที่อยู่บริเวณชั้นบนของเซลล์เม็ดเลือดแดงใช้ปิเปตดูดวนเบา ๆ โดยแตะปลายปิเปตที่ข้างหลอด และย้ายไปลงในหลอดใหม่ เติมอาหาร DMEM media ไปจนมีปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ปั่นที่ 1,500 รอบต่อนาที นำตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวมาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM media (Gibco) หรือ m-199 (Gibco) ที่ประกอบด้วย ไฟโต ฮีแมกกลูตินิน ความเข้มข้น 4-6%, ฟีทัลโบไวน์ซีรัม (fetal bovine serum: FBS) 10%, ยาปฏิชีวนะ และยาฆ่าเชื้อราซึ่งประกอบด้วย เพนนิซิลิน และสเตรปโตไมซิน (penicillin streptomycin) 3% และแอมโฟ- เทอริซินบี (Amphothericin B) 250 นาโนกรัม บ่มที่ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน เขย่าเลือดทุกวันวันละ 2 ครั้ง ก่อนเก็บเกี่ยว 1.5 ชั่วโมง เติมโคลชิซิน 0.01% 50 ไมโครลิตร เมื่อครบเวลา นำไปปั่นที่ 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย KCl ความเข้มข้น 0.075 M บ่มที่ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นและดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง เติมน้ำยาตรึงสภาพที่เตรียมใหม่ ๆ และเย็นจัด แล้วนำมาปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง เติมน้ำยาตรึงสภาพอีก เพื่อล้างตะกอนเซลล์ 3 ครั้ง หรือจนตะกอนเซลล์สะอาด แล้วเก็บตะกอนเซลล์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.1.3 การเตรียมสไลด์โครโมโซม และการย้อมสีโครโมโซม

เตรียมสไลด์โครโมโซมโดยนำตะกอนเซลล์ที่เตรียมไว้แล้วมาหยดบนสไลด์ที่สะอาด 1-2 หยด โดยหยดห่างจากสไลด์ 10 เซนติเมตร ปล่อยให้แห้งในอากาศ การเตรียมสไลด์จะเตรียมจากตัวอย่างปลาตัวละ 10 สไลด์ การย้อมสีโครโมโซม โดยเทคนิคการย้อมแบบธรรมดาและการย้อมแถบสีแบบนอร์

การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา

ย้อมสไลด์ด้วยสีจิมซ่า ความเข้มข้นร้อยละ 10 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 (pH 6.8) เป็นเวลา 30-45 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การย้อมแถบสีแบบนอร์

ดัดแปลงจากวิธีการของ Howell and Black (1980) ดังนี้ อบสไลด์ที่ 60 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 วัน หยดซิลเวอร์ไนเตรท 50% (50%$AgNO_3$) ลงบนสไลด์ 4 หยด และหยด เจลลาติน 4% ลงบน

สไลด์ 2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำเข้าตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หรือจนกว่าสไลด์จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม (ห้ามทิ้งไว้นานจนสไลด์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลโดยเด็ดขาด) ล้างซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ผึ่งสไลด์ให้เกือบแห้ง นำไปย้อมด้วยสีจิมซ่า 10% ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ผึ่งให้แห้งนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 40X

2.1.4 การตรวจสอบโครโมโซม การจัดคาริโอไทป์และอิดิโอแกรมมาตรฐาน

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

1. การตรวจสอบโครโมโซม เลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมระยะเมทาเฟสกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน 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) เพื่อระบุชนิดของโครโมโซม และนำค่าที่ได้ไปใช้ประกอบในการจัดทำแคริโอไทป์ และอิดิโอแกรม

2. การจัดทำแคริโอไทป์ ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยการกำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ วัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง จัดเรียงแคริโอไทป์ ให้เรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้ายเสมอ ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่าง วางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง

การจัดทำแคริโอไทป์มาตรฐาน

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

2. ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยกำหนดตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ จากนั้นวัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง การวัดค่าความยาวของโครโมโซมอาจจะใช้วิธีการตัดโครโมโซมออกมาจากรูปถ่ายทีละแท่ง กำหนดหมายเลขให้โครโมโซมทุกแท่ง

ก่อนการวัด เมื่อวัดความยาวเสร็จแล้วจึงจับคู่โครโมโซมที่มีความยาวของแขนแต่ละข้าง และความยาวทั้งแท่งใกล้เคียงกันมากที่สุด

1) การคำนวณหาค่า relative length (RL) คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

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

การใช้ค่า RL นี้สามารถช่วยในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซม เพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ในทุก ๆ เซลล์ ส่วนค่าความยาวของโครโมโซมจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละเซลล์

2) 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

3) การกำหนดขนาดของโครโมโซม แบ่งขนาดของโครโมโซมออกเป็น 3 ขนาด โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุดเป็นโครโมโซมคู่สุดท้าย

โครโมโซมขนาดใหญ่ (large=L) คือ โครโมโซมที่มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

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

โครโมโซมขนาดกลาง (medium=M) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

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

โครโมโซมขนาดเล็ก (small=S) ได้แก่ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุด

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

4) จัดเรียงแคริโอไทป์ ให้เรียงตามชนิดโครโมโซมก่อน แล้วค่อยเรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้าย ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่างวางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง และนิยมวางแท่งโครโมโซมให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ตรงกัน

การทำอิดิโอแกรมมาตรฐาน

อิดิโอแกรม คือ ไดอะแกรมแสดงแคริโอไทป์ของโครโมโซม 1 ชุดแฮพลอยด์ (haploid set, *n*) ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ โดยใช้ข้อมูลค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซม รูปร่างของโครโมโซม และตำแหน่งเซนโทรเมียร์ อิดิโอแกรมจากเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา ใช้เซลล์ระยะเมทาเฟสชนิดละ 20 เซลล์ นำมาจัดแคริโอไทป์ แล้ววัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาวและแขนโครโมโซมข้างสั้นของโครโมโซมทุกคู่ด้วยเวอร์เนียร์ (vernier) จัดทำภาพวาดอิดิโอแกรมด้วยคอมพิวเตอร์ โดยการนำค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่มาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel XP/2003 ให้แกนตั้ง (Y) เป็นความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ และแกนนอน (X) เป็นลำดับของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่เล็กที่สุด ยกเว้นโครโมโซมเพศจัดเป็นคู่สุดท้าย แล้วนำมาปรับรูปร่างของโครโมโซมโดยใช้โปรแกรม Microsoft Word XP/2003 หรือ Microsoft Powerpoint XP/2003

2.2 ผลการวิจัย

การศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของวงศ์ย่อยปลาบู่ (subfamily Gobiinae) ที่พบในประเทศไทย จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ ปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) ปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) ปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) ปลาตีน (*Glossogobius giuris*) ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) ปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*V. muralis*) และปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*V. strigata*) พบว่าวงศ์ย่อยปลาบู่แต่ละชนิดมีมาตรฐานลักษณะแคริโอไทป์ที่เป็นลักษณะประจำพันธุ์ ดังนี้

2.2.1 ปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.)

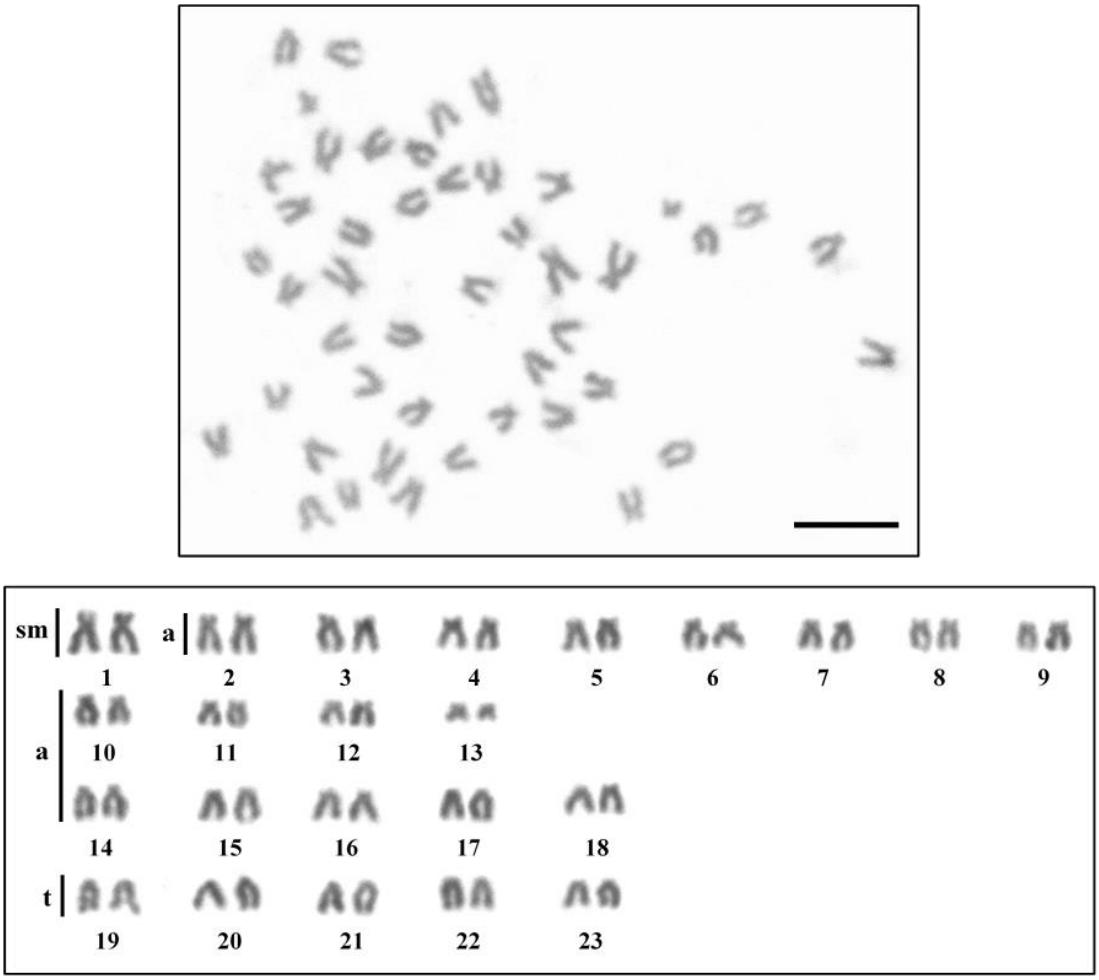
เป็นรายงานครั้งแรก (first report) ของการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของปลาบู่กุ้งยักษ์ (ภาพที่ 2.1 พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (diploid) เท่ากับ 46 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number, NF) เท่ากับ 82 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่กุ้งยักษ์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 10 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดกลาง 22 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง และอะโครเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง (ภาพที่ 2.2 และ 2.3) มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 ชนิดซับเมทาเซนทริก และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 18 ชนิดอะโครเซนทริก โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุด

ประมาณ 2 เท่า จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ (nucleolar organizer regions, NORs) จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นบริเวณเทโลเมียร์ (telomeric regions) ของโครโมโซมคู่ที่ 16 (ภาพที่ 2.4 และ 2.5) ปลาบู่กุ้งยักษ์มีแคริโอไทป์แบบไม่สมมาตร (asymmetrical karyotype) โดยมีโครโมโซม 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดซับเมทาเซนทริก อะโครเซนทริก และเทโลเซนทริก ภาพอิดิโอแกรมจากการย้อมสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์แสดงไว้ดังภาพที่ 2.6 และ 2.7 ตามลำดับ 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 ขนาดและชนิดของโครโมโซมแสดงไว้ดังตารางที่ 2.2 ปลาบู่กุ้งยักษ์มีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

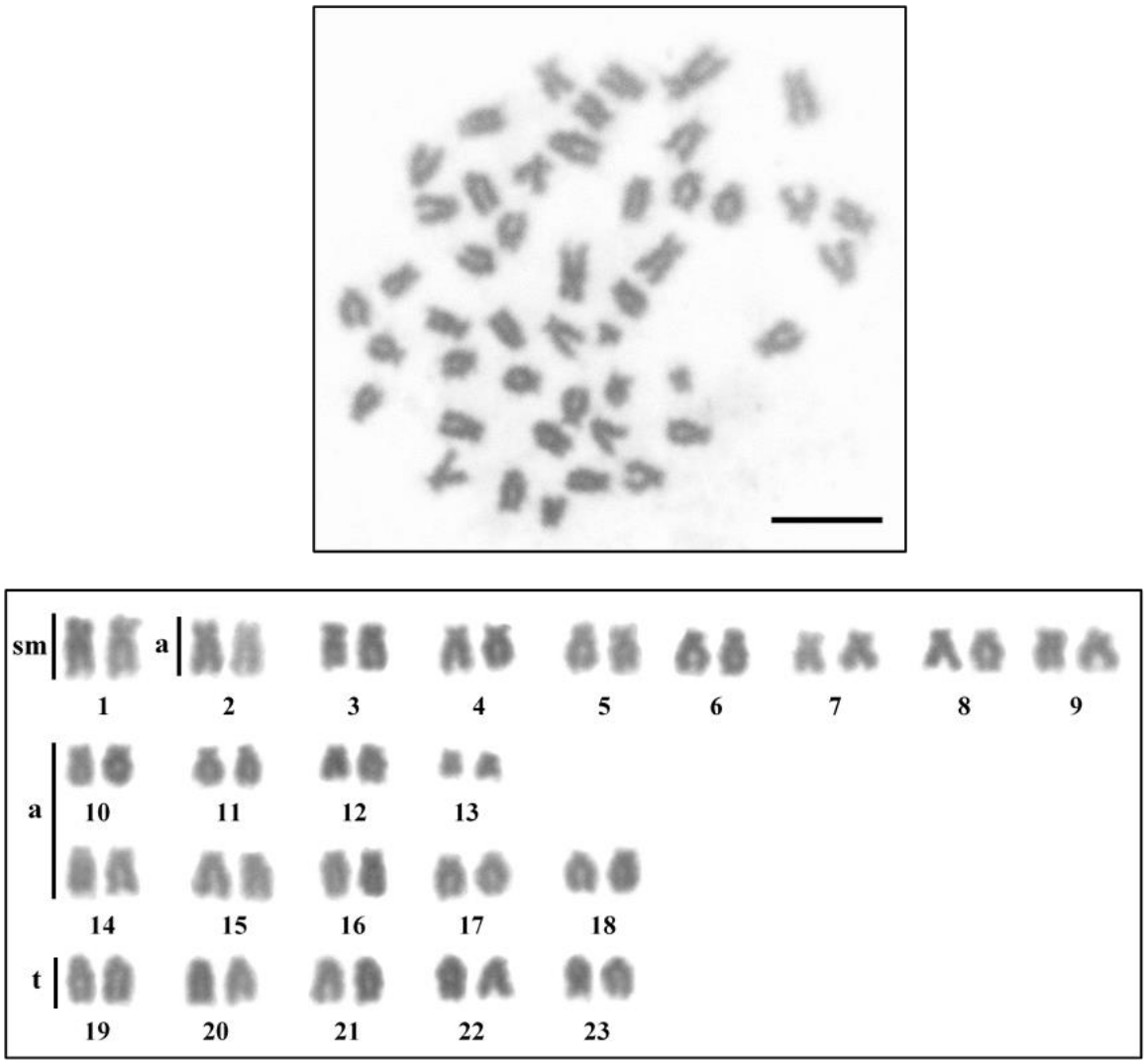
ปลาบู่กุ้งยักษ์ $2n$ (diploid) 46 = $L^{sm}_{2} + L^{a}_{10} + L^{t}_{6} + M^{a}_{22} + M^{t}_{4} + S^{a}_{2}$

หรือ = 2sm + 34a + 10t

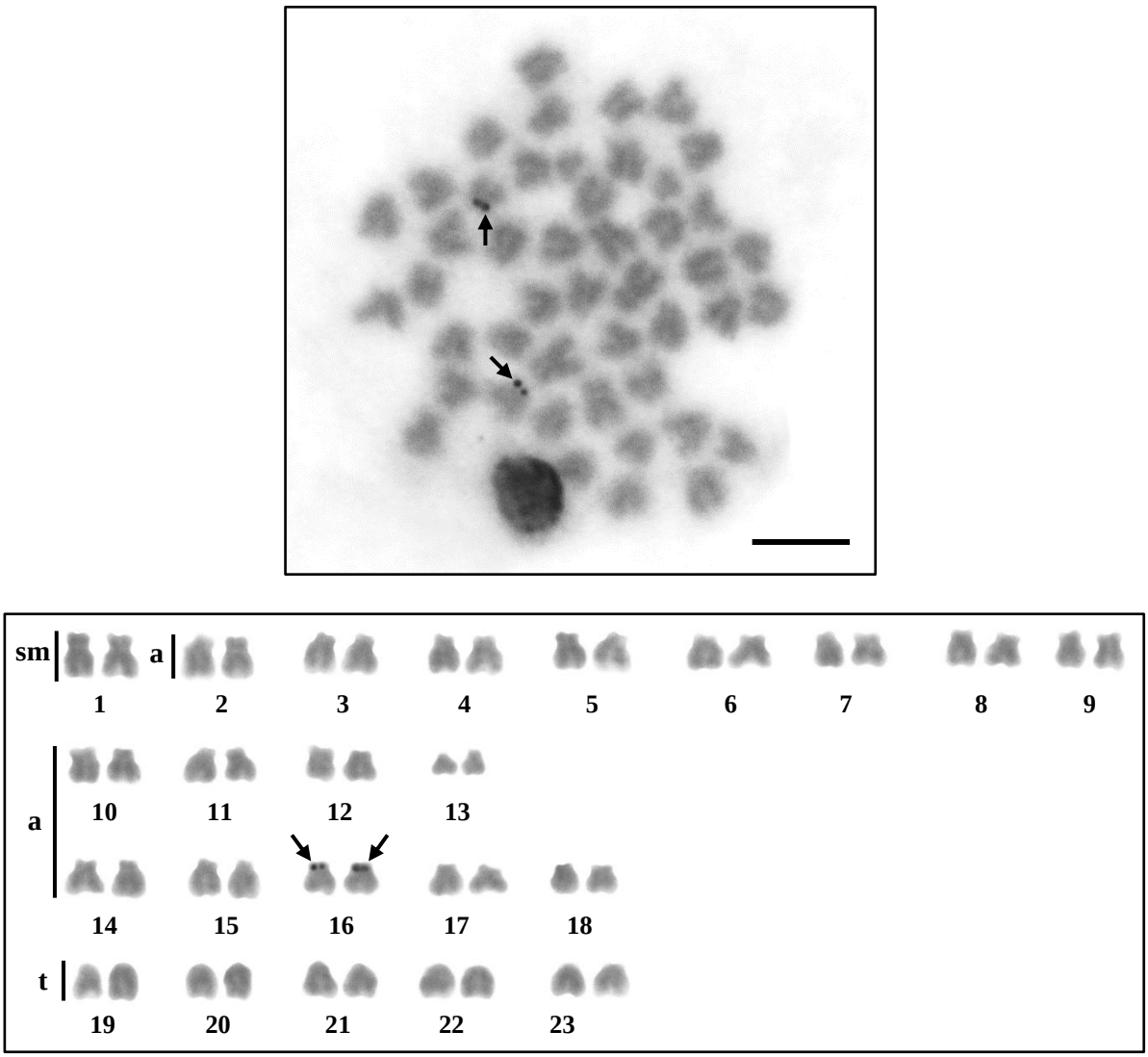
ภาพที่ 2.1 ลักษณะภายนอกของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) สเกลบาร์เท่ากับ 3 เซนติเมตร



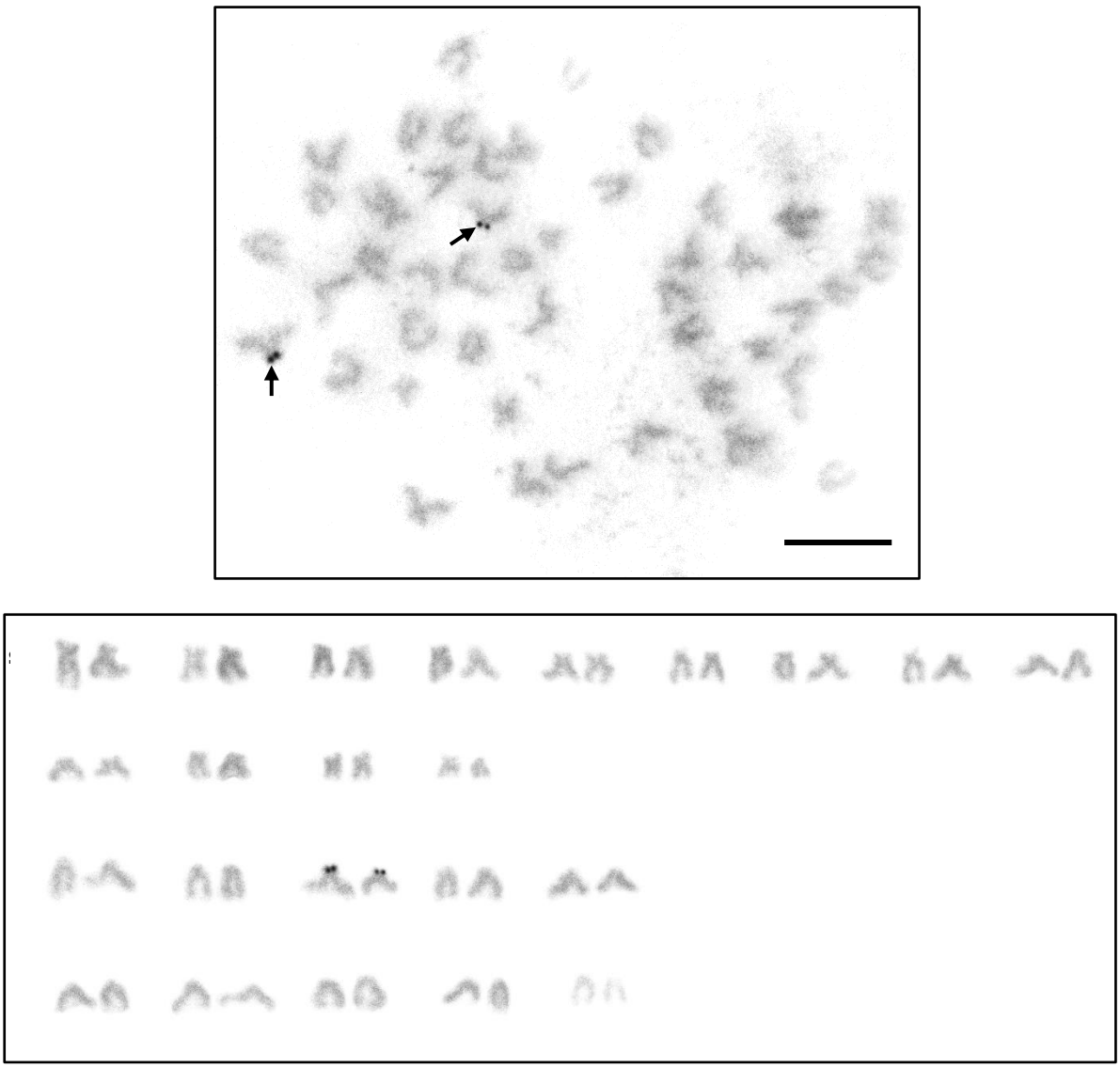
ภาพที่ 2.2 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



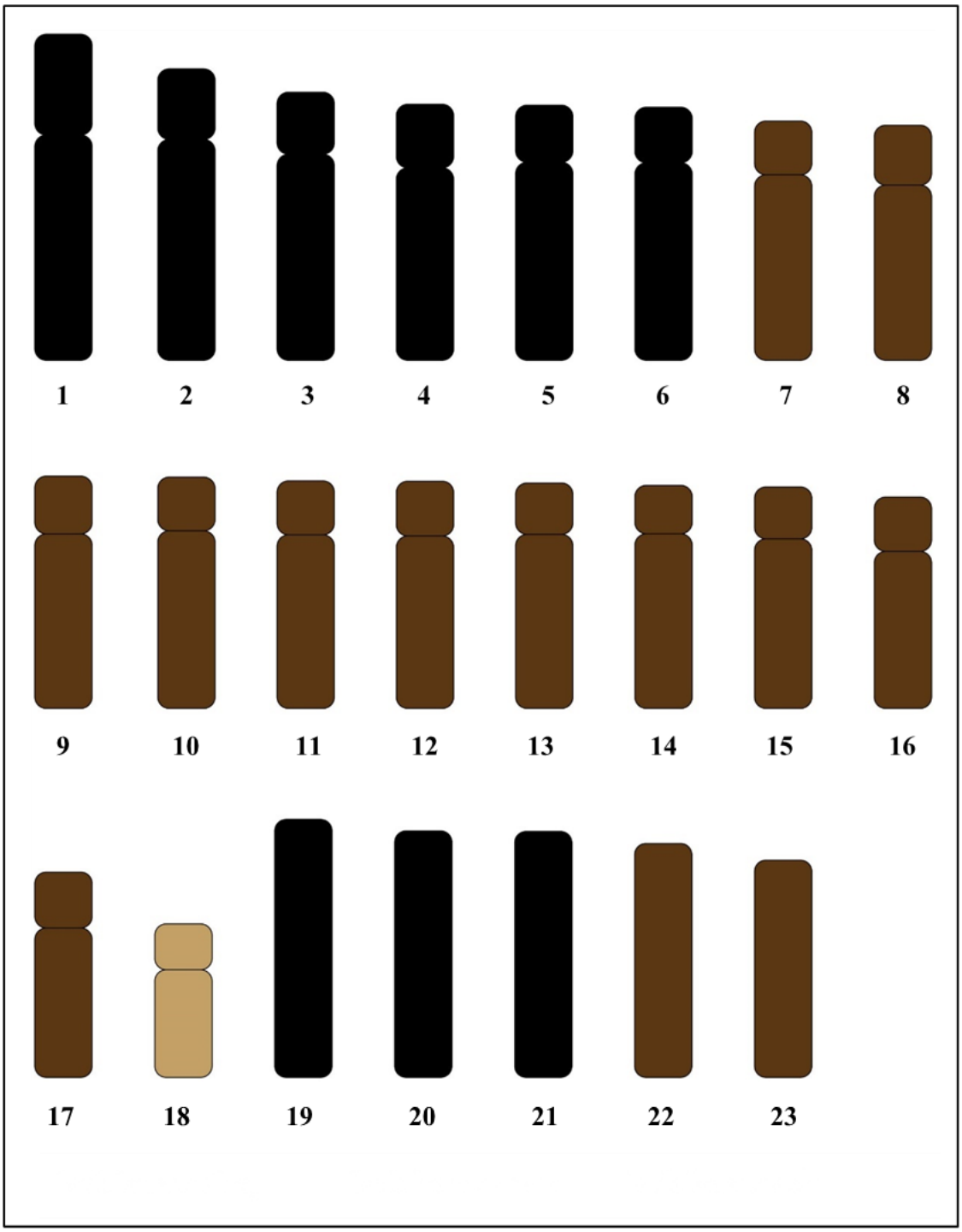
ภาพที่ 2.3 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



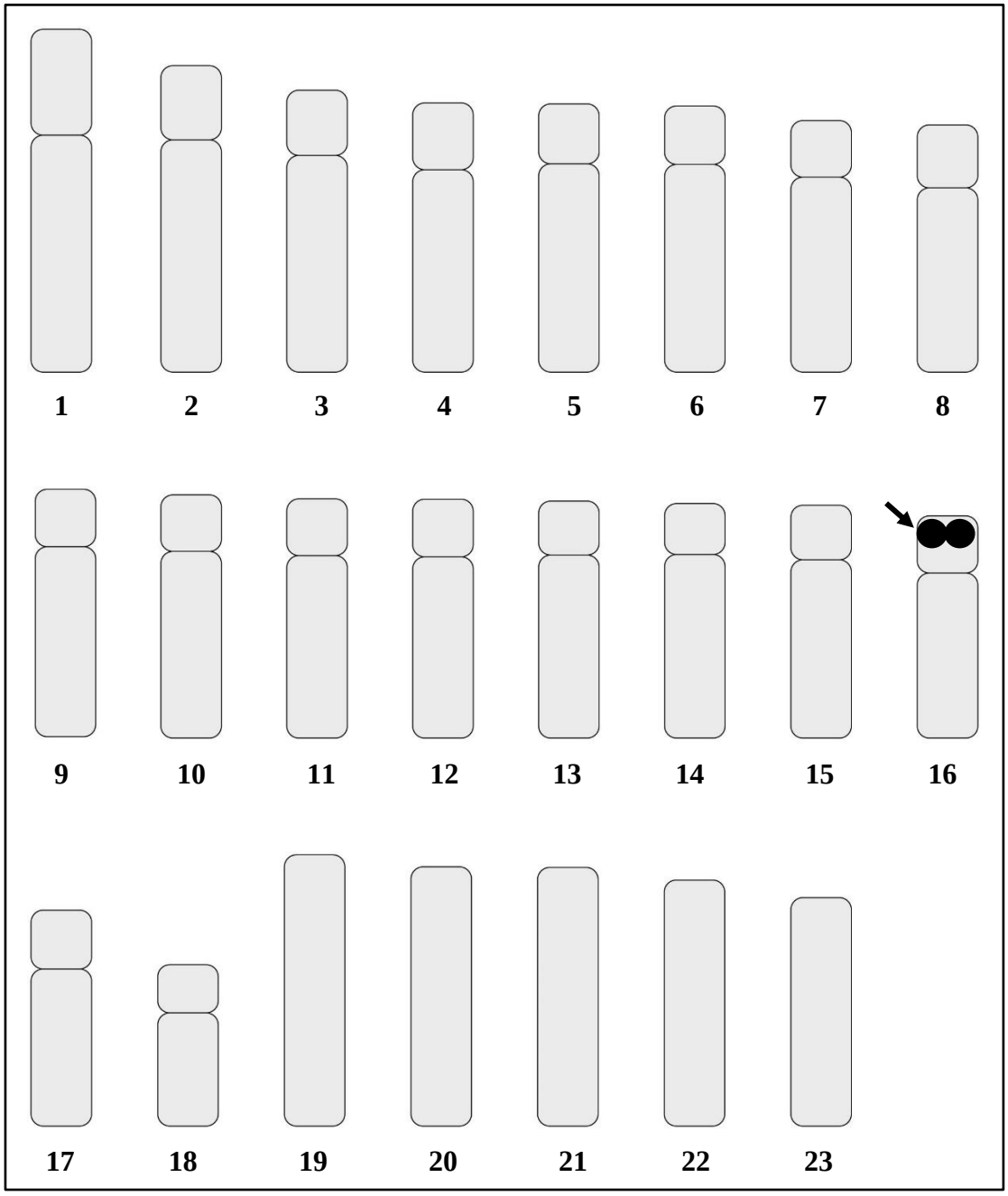
ภาพที่ 2.4 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.5 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.6 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 2.7 อิดิโอแกรมของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์

ตารางที่ 2.2 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 ของปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	**Ls**	**Ll**	**LT**	**RL±SD**	**CI±SD**	**ขนาด**	**ชนิด**
1	0.840	1.879	2.720	0.041±0.000	0.691±0.009	ใหญ่	ซับเมทาเซนทริก
2	0.588	1.843	2.431	0.04±0.000	0.757±0.034	ใหญ่	อะโครเซนทริก
3	0.517	1.719	2.237	0.038±0.002	0.769±0.005	ใหญ่	อะโครเซนทริก
4	0.530	1.606	2.136	0.035±0.002	0.751±0.02	ใหญ่	อะโครเซนทริก
5	0.475	1.652	2.128	0.036±0.004	0.776±0.004	ใหญ่	อะโครเซนทริก
6	0.463	1.648	2.112	0.036±0.001	0.781±0.003	ใหญ่	อะโครเซนทริก
7	0.449	1.547	1.996	0.034±0.001	0.775±0.006	กลาง	อะโครเซนทริก
8	0.499	1.462	1.961	0.032±0.000	0.746±0.008	กลาง	อะโครเซนทริก
9	0.482	1.456	1.938	0.032±0.000	0.751±0.002	กลาง	อะโครเซนทริก
10	0.448	1.481	1.930	0.035±0.003	0.779±0.028	กลาง	อะโครเซนทริก
11	0.449	1.448	1.898	0.032±0.000	0.764±0.014	กลาง	อะโครเซนทริก
12	0.457	1.438	1.896	0.031±0.002	0.758±0.023	กลาง	อะโครเซนทริก
13	0.428	1.452	1.881	0.032±0.002	0.771±0.017	กลาง	อะโครเซนทริก
14	0.404	1.457	1.861	0.032±0.002	0.782±0.005	กลาง	อะโครเซนทริก
15	0.433	1.415	1.848	0.031±0.001	0.765±0.015	กลาง	อะโครเซนทริก
16*	0.453	1.310	1.763	0.028±0.002	0.745±0.02	กลาง	อะโครเซนทริก
17	0.466	1.246	1.713	0.027±0.003	0.728±0.002	กลาง	อะโครเซนทริก
18	0.382	0.898	1.280	0.02±0.001	0.703±0.045	เล็ก	อะโครเซนทริก
19	0.000	2.152	2.152	0.047±0.000	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
20	0.000	2.057	2.057	0.045±0.000	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
21	0.000	2.052	2.052	0.045±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
22	0.000	1.952	1.952	0.043±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
23	0.000	1.813	1.813	0.039±0.003	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก

หมายเหตุ: * โครโมโซมเครื่องหมายที่มีตำแหน่งนอร์ (nucleolar organizer region)

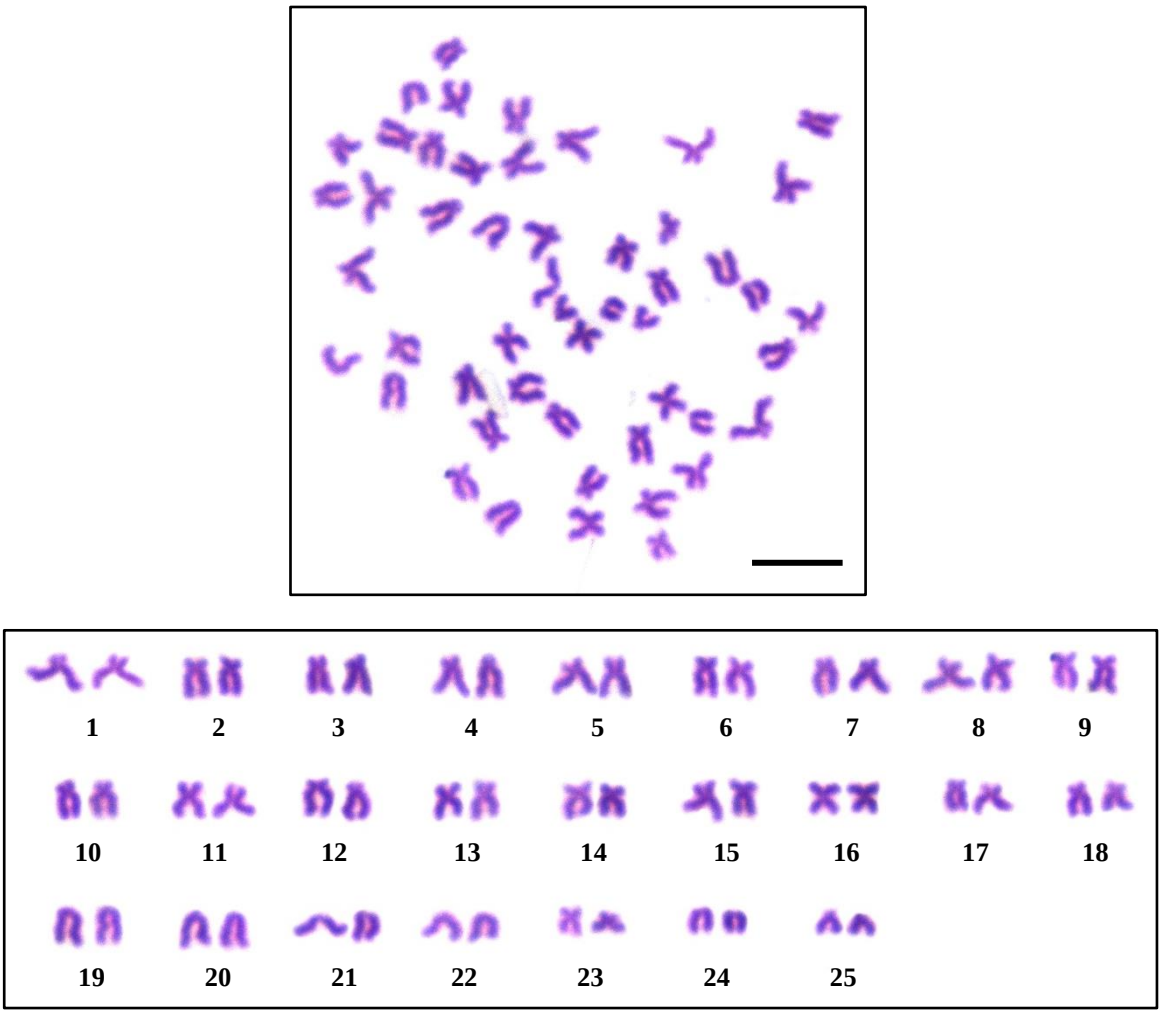
2.2.2 ปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*)

เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของปลาบู่หัวโต (ภาพที่ 2.8) พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอด์ เท่ากับ 50 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 88 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่หัวโต ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 36 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดล็ก 2 แท่ง (ภาพที่ 2.9 และ 2.10) มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 ชนิดอะโครเซนทริก และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 25 ชนิดเทโลเซนทริก โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุดประมาณ 2 เท่า จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 1 (ภาพที่ 2.11 และ 2.12) ปลาบู่หัวโต มีแคริโอไทป์แบบไม่สมมาตร โดยมีโครโมโซม 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดซับเมทาเซนทริก อะโครเซนทริก และเทโลเซนทริก ภาพอิดิโอแกรมจากการย้อมสีแบบธรรมดา และแถบสีแบบนอร์แสดงไว้ดังภาพที่ 2.13 และ 2.14 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ ค่า relative length ค่า centromeric index ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า RL, CI ขนาดและชนิดของโครโมโซมแสดงไว้ดังตารางที่ 2.3 ปลาบู่หัวโต มีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

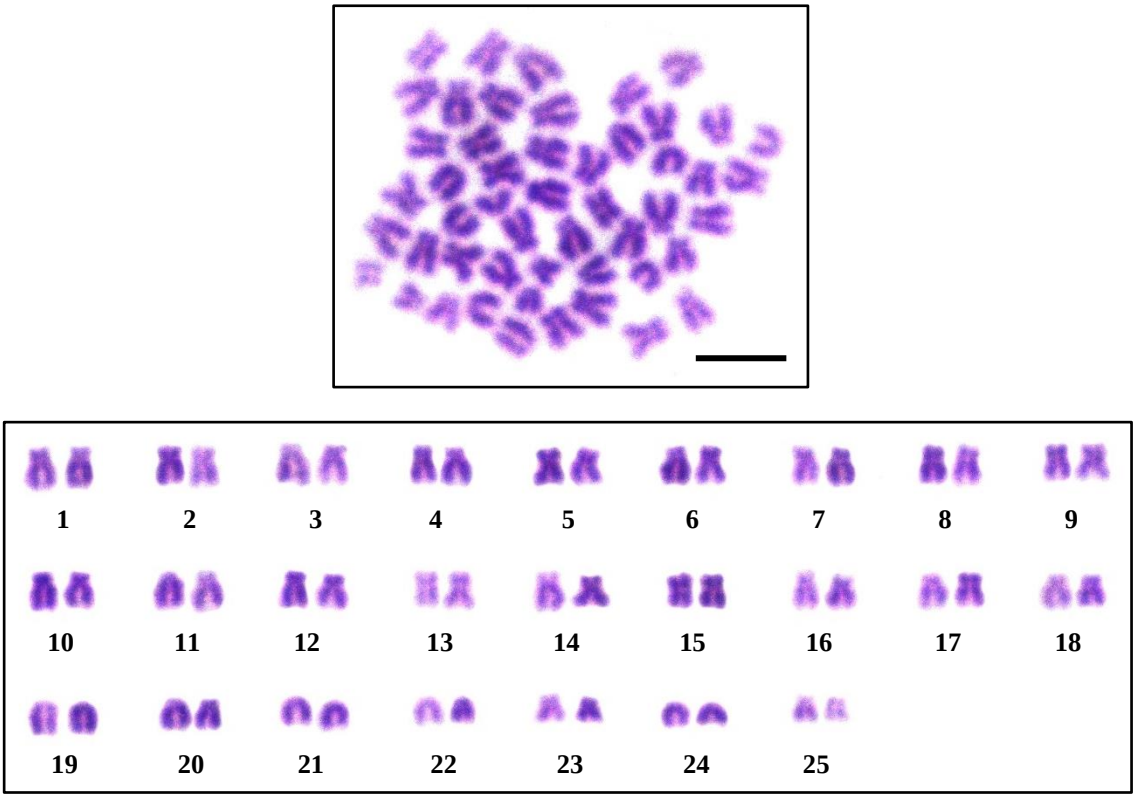
ปลาบู่ หัวโต 2*n* (diploid) 50 = $L^{a}_{36} + L^{t}_{6} + M^{sm}_{2} + M^{t}_{4} + S^{a}_{2}$

หรือ = 2sm + 36a + 12t

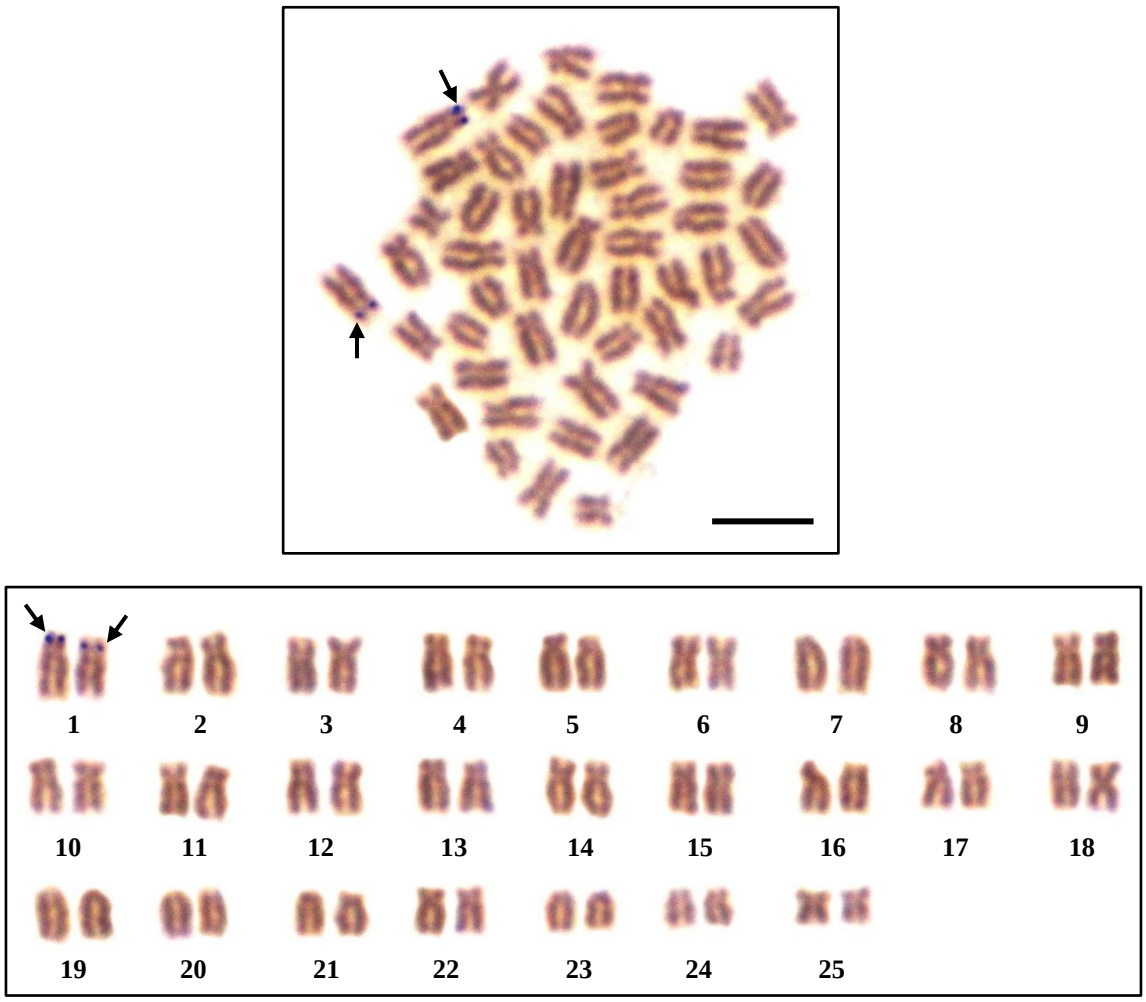
ภาพที่ 2.8 ลักษณะภายนอกของปลาบู่หัวโต (*A. viridipunctatus*) สเกลบาร์เท่ากับ 3 เซนติเมตร



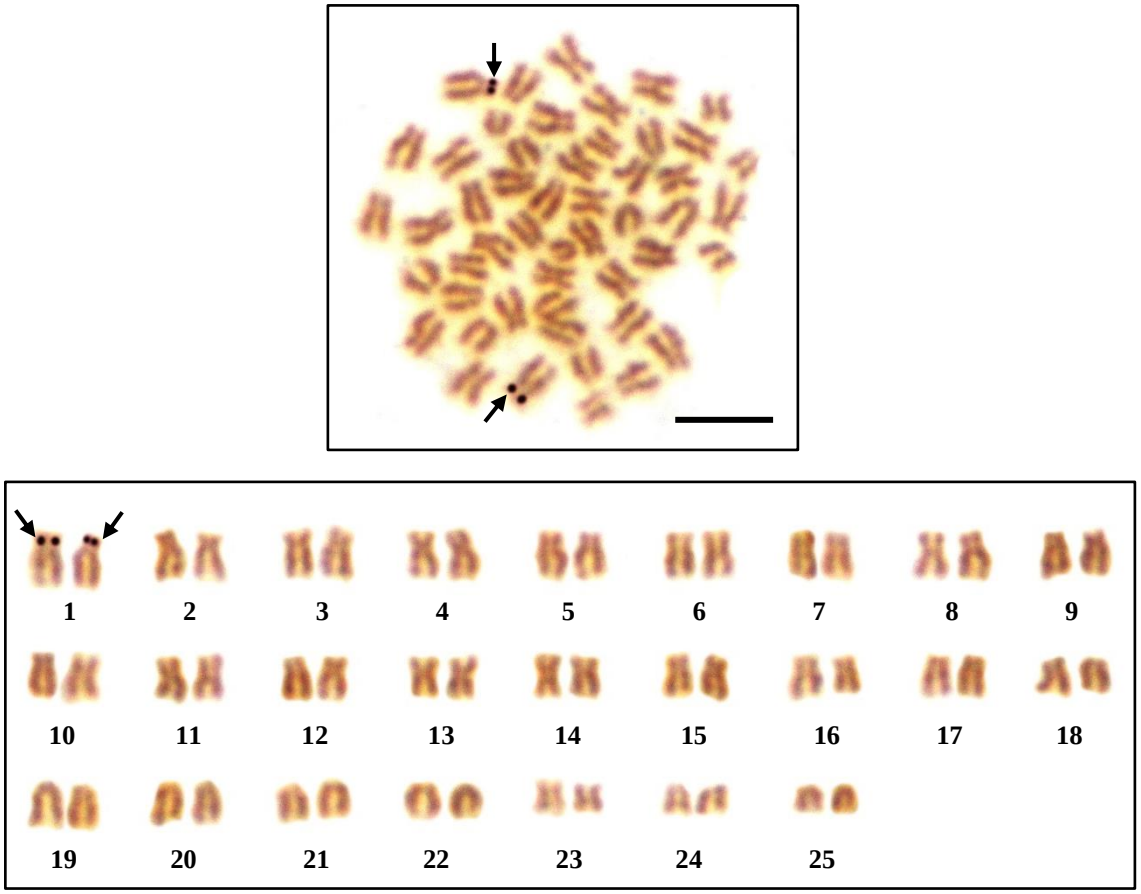
ภาพที่ 2.9 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



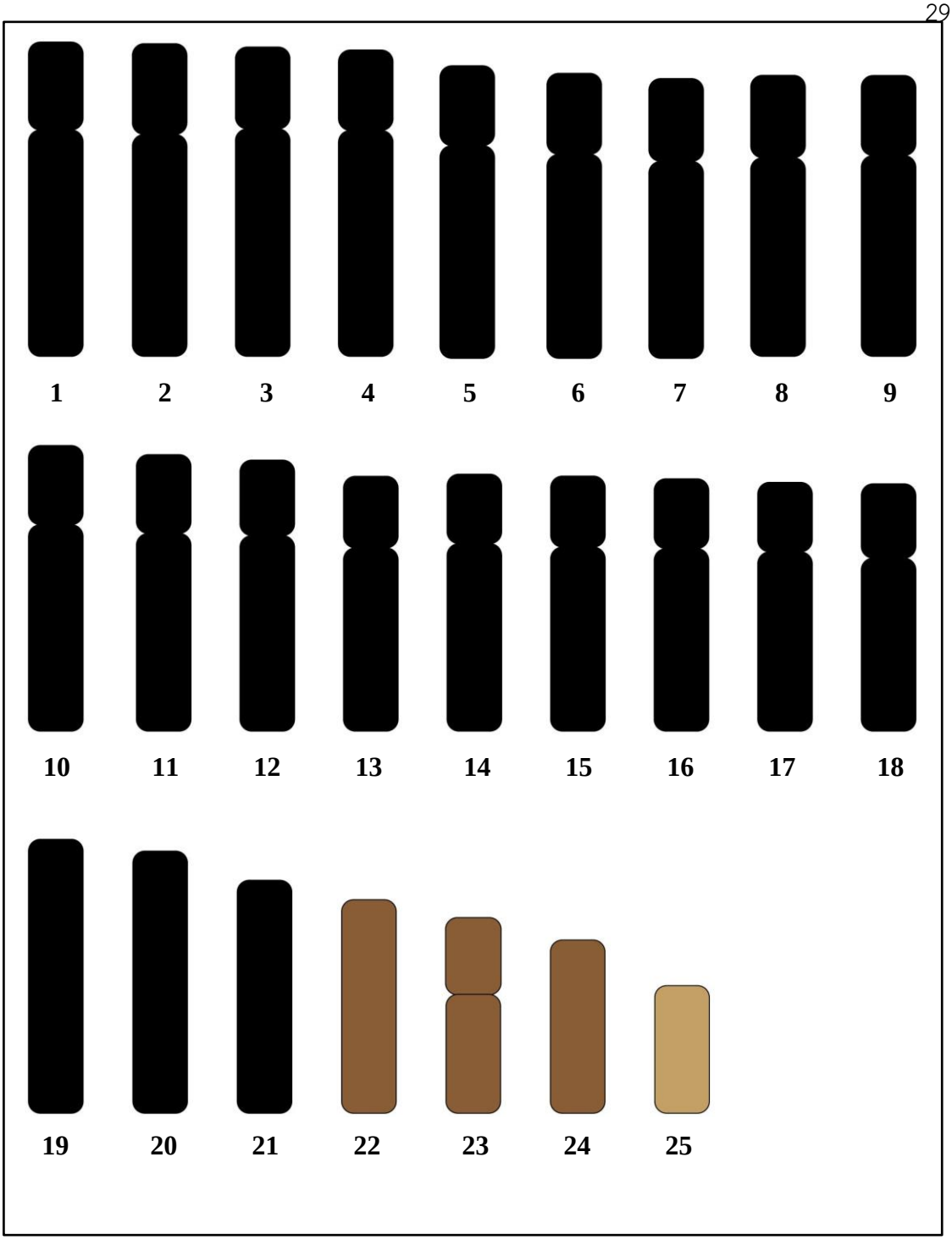
ภาพที่ 2.10 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



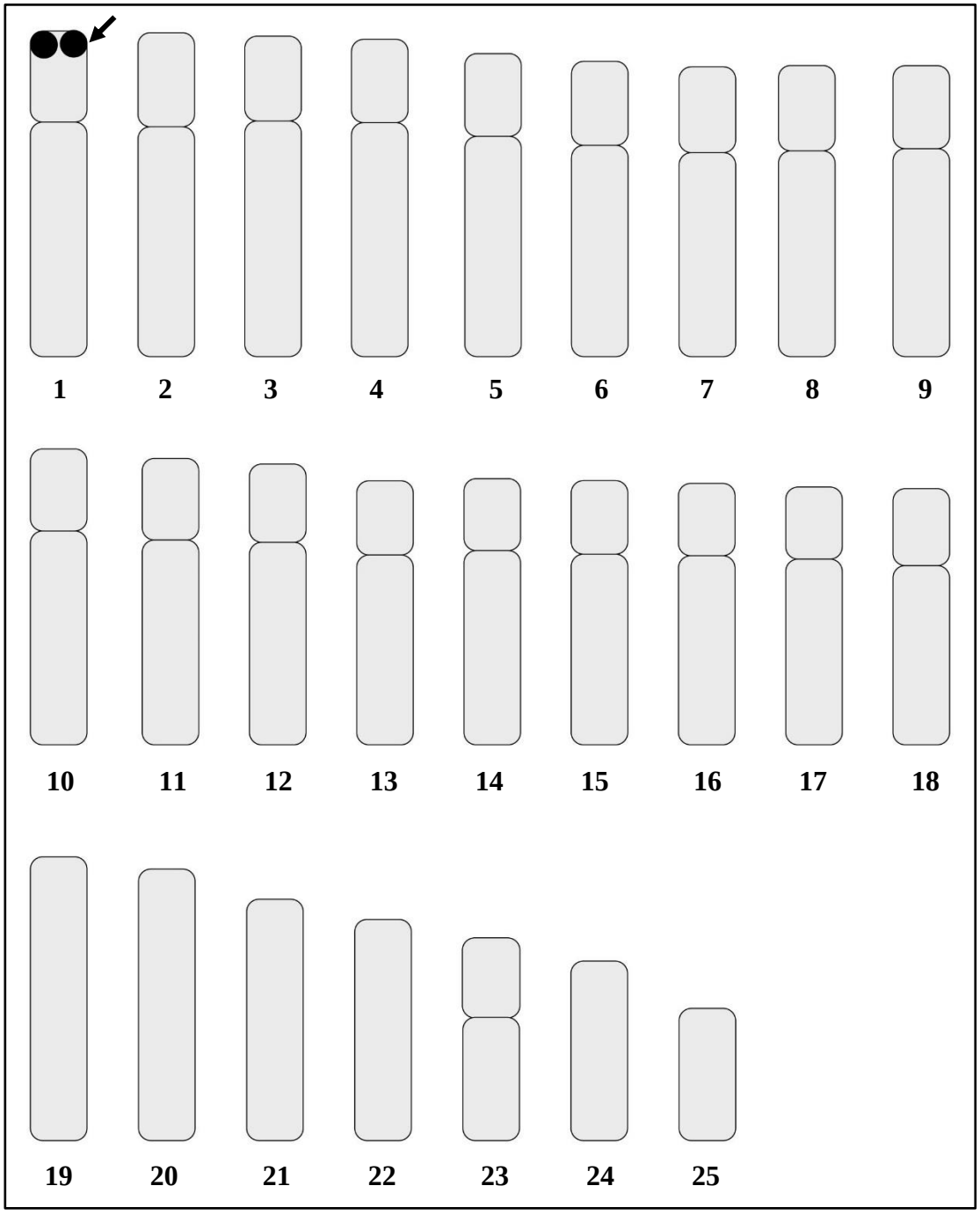
ภาพที่ 2.11 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius. viridipunctatus*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.12 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.13 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 2.14 อิดิโอแกรมของปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์

ตารางที่ 2.3 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 ของปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	**Ls**	**Ll**	**LT**	**RL**±SD	**CI**±SD	**ขนาด**	**ชนิด**
1*	0.886	2.282	3.168	0.035±0.003	0.723±0.032	ใหญ่	อะโครเซนทริก
2	0.915	2.237	3.152	0.034±0.001	0.71±0.002	ใหญ่	อะโครเซนทริก
3	0.825	2.293	3.118	0.035±0.002	0.738±0.028	ใหญ่	อะโครเซนทริก
4	0.811	2.277	3.087	0.034±0.003	0.736±0.008	ใหญ่	อะโครเซนทริก
5	0.835	2.065	2.899	0.03±0.001	0.704±0.000	ใหญ่	อะโครเซนทริก
6	0.805	2.044	2.848	0.033±0.001	0.726±0.008	ใหญ่	อะโครเซนทริก
7	0.817	2.004	2.821	0.031±0.001	0.715±0.008	ใหญ่	อะโครเซนทริก
8	0.811	2.002	2.813	0.031±0.001	0.718±0.012	ใหญ่	อะโครเซนทริก
9	0.785	2.024	2.809	0.031±0.002	0.713±0.002	ใหญ่	อะโครเซนทริก
10	0.779	1.985	2.763	0.032±0.000	0.719±0.001	ใหญ่	อะโครเซนทริก
11	0.774	1.973	2.747	0.031±0.003	0.716±0.012	ใหญ่	อะโครเซนทริก
12	0.761	1.971	2.732	0.031±0.003	0.728±0.018	ใหญ่	อะโครเซนทริก
13	0.752	1.847	2.599	0.028±0.000	0.717±0.019	ใหญ่	อะโครเซนทริก
14	0.700	1.890	2.590	0.029±0.001	0.711±0.008	ใหญ่	อะโครเซนทริก
15	0.716	1.855	2.571	0.028±0.001	0.712±0.015	ใหญ่	อะโครเซนทริก
16	0.704	1.840	2.545	0.028±0.002	0.704±0.000	ใหญ่	อะโครเซนทริก
17	0.701	1.807	2.508	0.028±0.001	0.704±0.006	ใหญ่	อะโครเซนทริก
18	0.749	1.744	2.493	0.027±0.001	0.703±0.003	ใหญ่	อะโครเซนทริก
19	0.000	2.761	2.761	0.042±0.004	1.000±1.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
20	0.000	2.642	2.642	0.04±0.004	1.000±1.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
21	0.000	2.348	2.348	0.036±0.000	1.000±1.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
22	0.000	2.152	2.152	0.033±0.000	1.000±1.000	กลาง	เทโลเซนทริก
23	0.768	1.199	1.967	0.018±0.002	0.609±0.014	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
24	0.000	1.746	1.746	0.027±0.000	1.000±1.000	กลาง	เทโลเซนทริก
25	0.000	1.286	1.286	0.02±0.001	1.000±1.000	เล็ก	เทโลเซนทริก

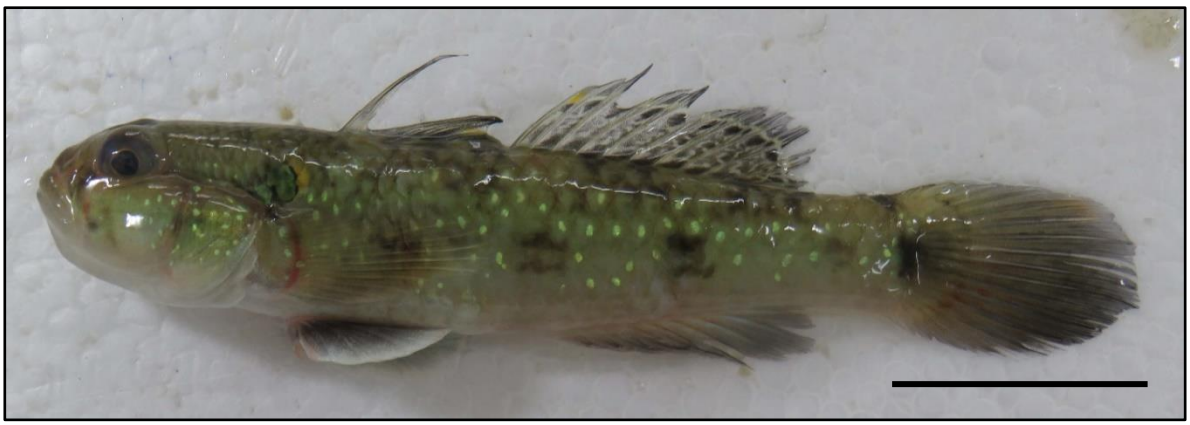
หมายเหตุ: * โครโมโซมเครื่องหมายที่มีตำแหน่งนอร์ (nucleolar organizer region)

2.2.3 ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*)

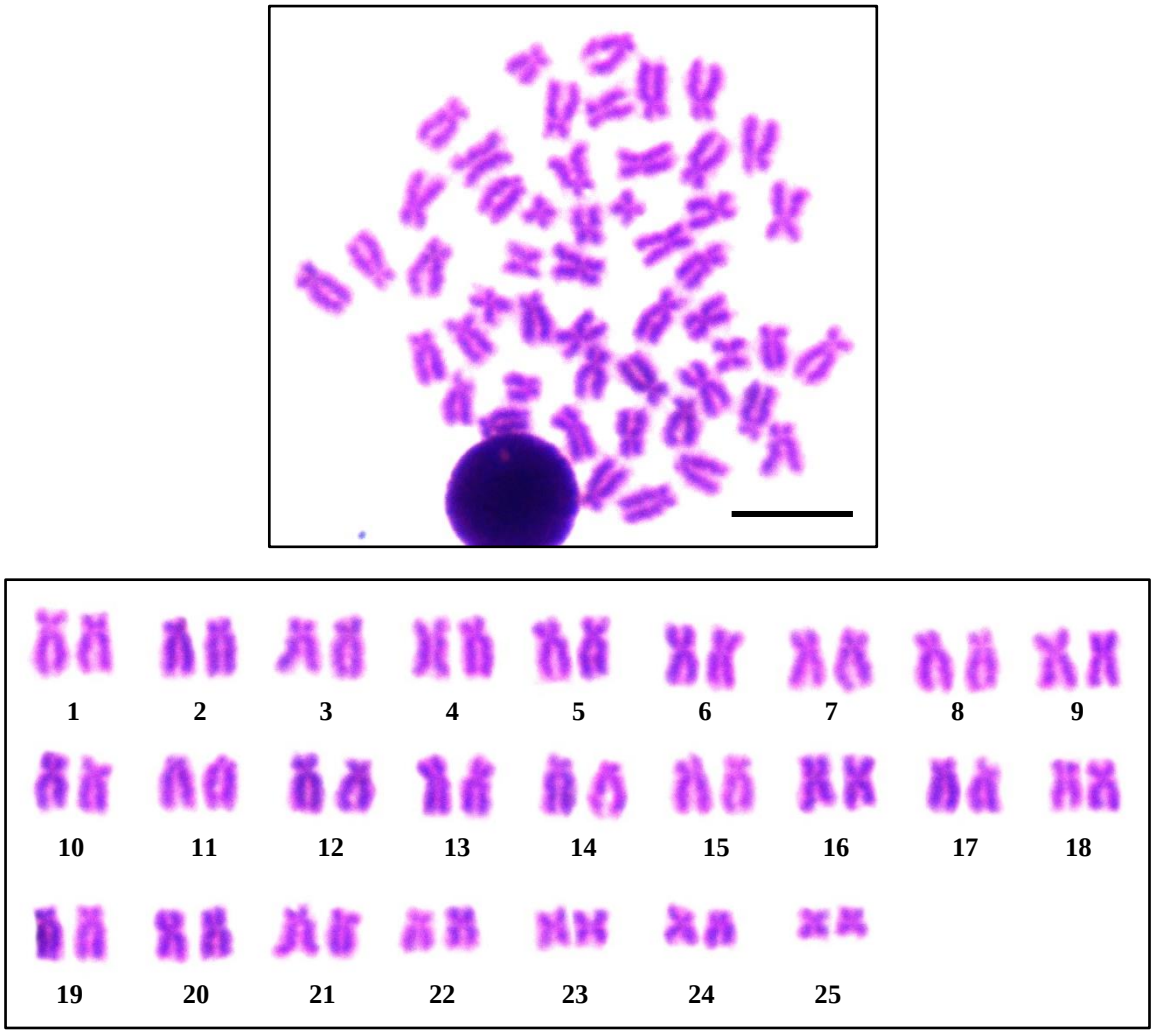
เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (ภาพที่ 2.15) พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอด์ เท่ากับ 50 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 100 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่แก้มตกสะเก็ด ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง ซับเมทาทริกขนาดใหญ่ 10 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 26แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง และเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง (ภาพที่ 2.16 และ 2.17) มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 ชนิดเมทาเซนทริก และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 25 ชนิดเมทาเซนทริก โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุดประมาณ 2 เท่า จากการย้อมแถบสีแบบนอร์ พบตำแหน่งนอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 6 (ภาพที่ 2.18 และ 2.19) ปลาบู่ แก้มตกสะเก็ด มีแคริโอไทป์แบบไม่สมมาตร โดยมีโครโมโซม 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดเมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก และอะโครเซนทริก ภาพอิดิโอแกรมจากการย้อมสีแบบธรรมดา และแถบสีแบบนอร์แสดงไว้ดังภาพที่ 2.20 และ 2.21 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ ค่า relative length ค่า centromeric index ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า RL, CI ขนาดและชนิดของโครโมโซมแสดงไว้ดังตารางที่ 2.4 ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด มีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด *2n* (diploid) 50 = $L^{m}_{6} + L^{sm}_{10} + L^{a}_{26} + M^{m}_{4} + M^{sm}_{2} + S^{m}_{2}$

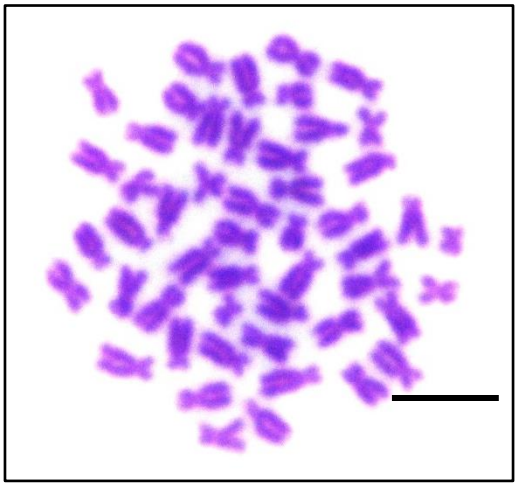
หรือ = 12sm + 12sm + 26a

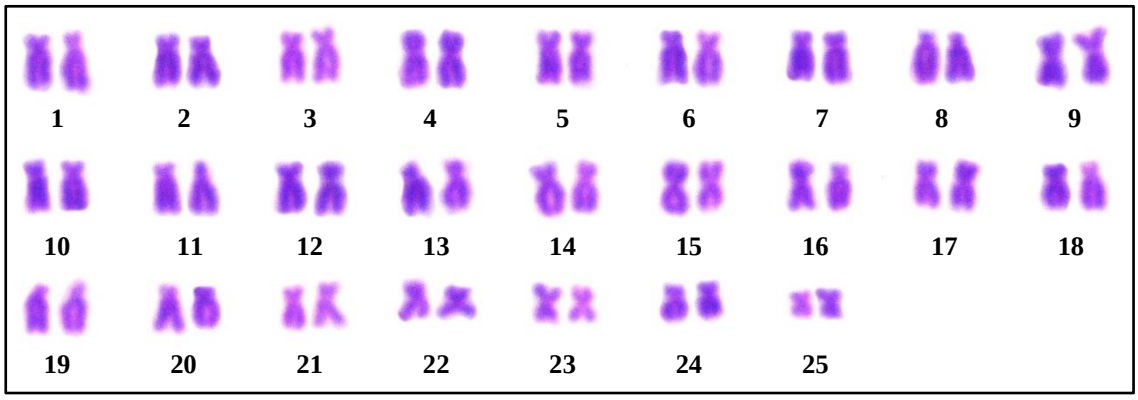


ภาพที่ 2.15 ลักษณะภายนอกของปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) สเกลบาร์เท่ากับ 3 เซนติเมตร

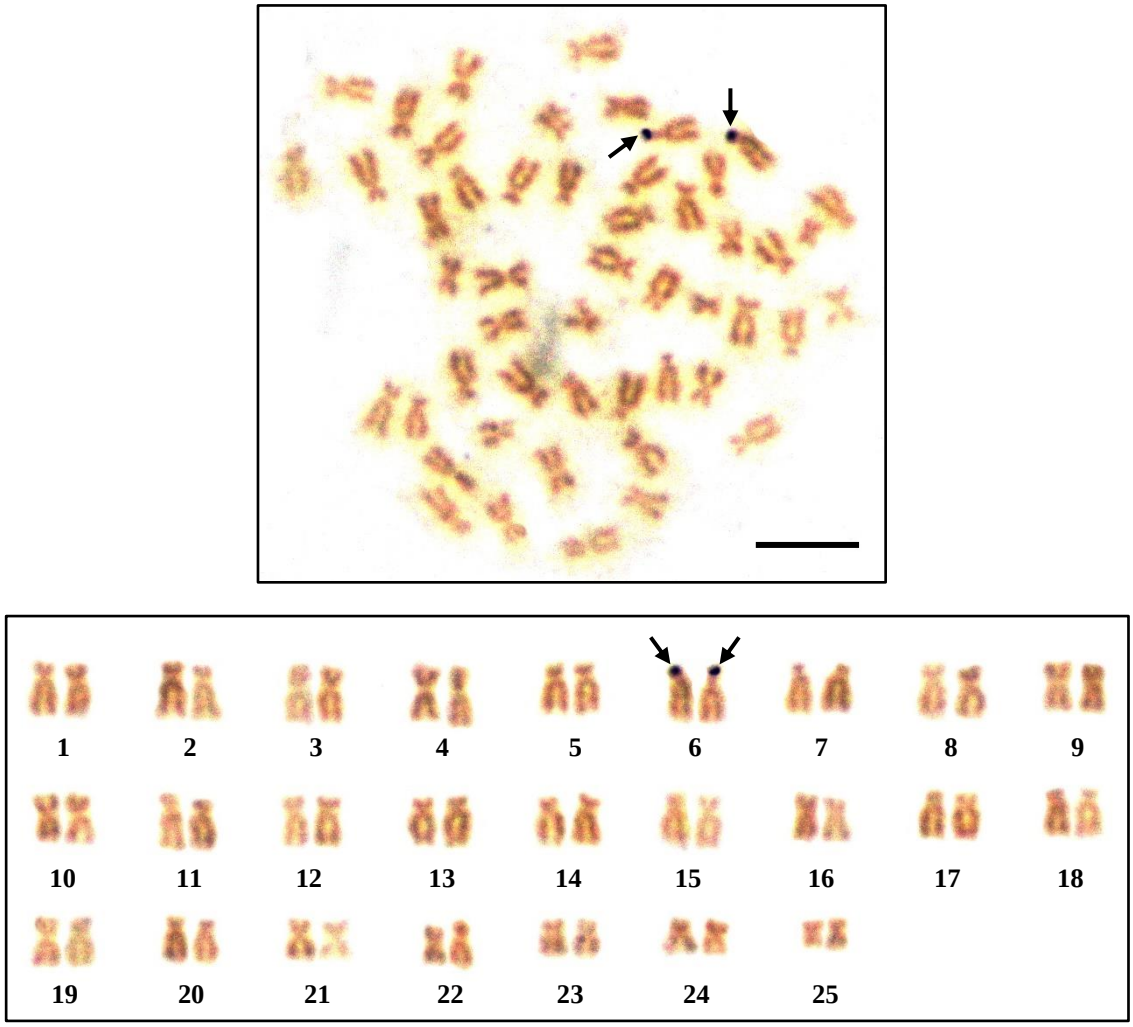


ภาพที่ 2.16 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)

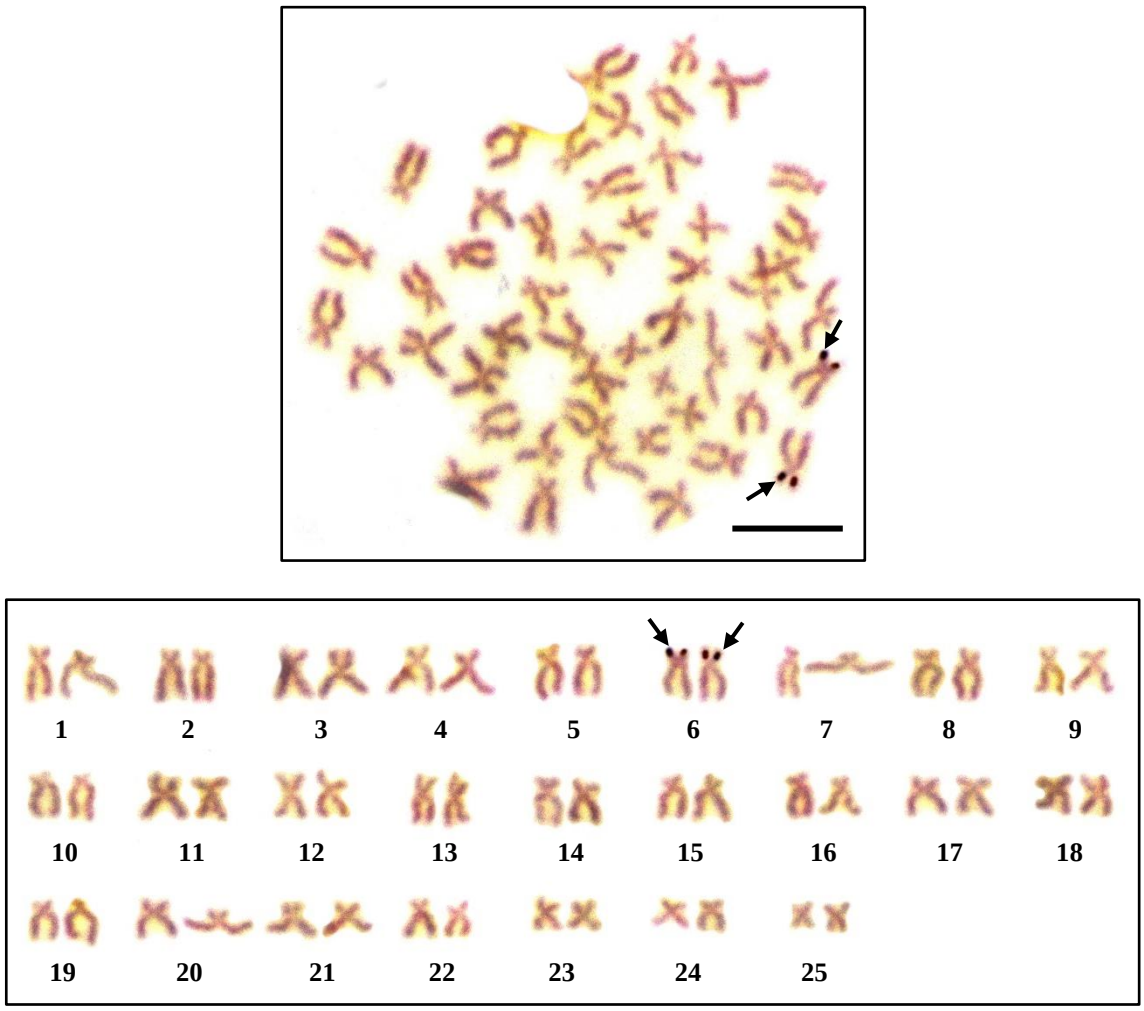




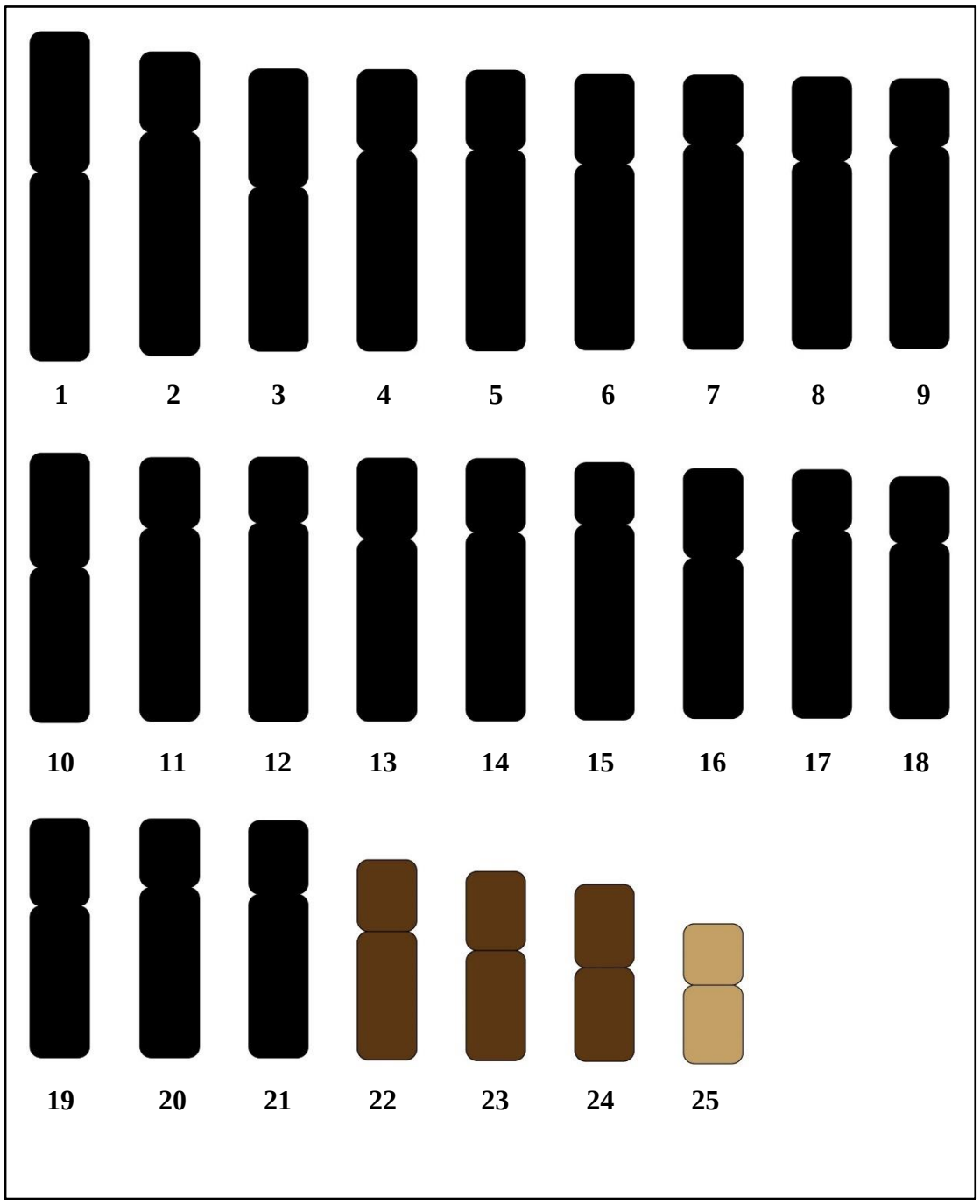
ภาพที่ 2.17 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



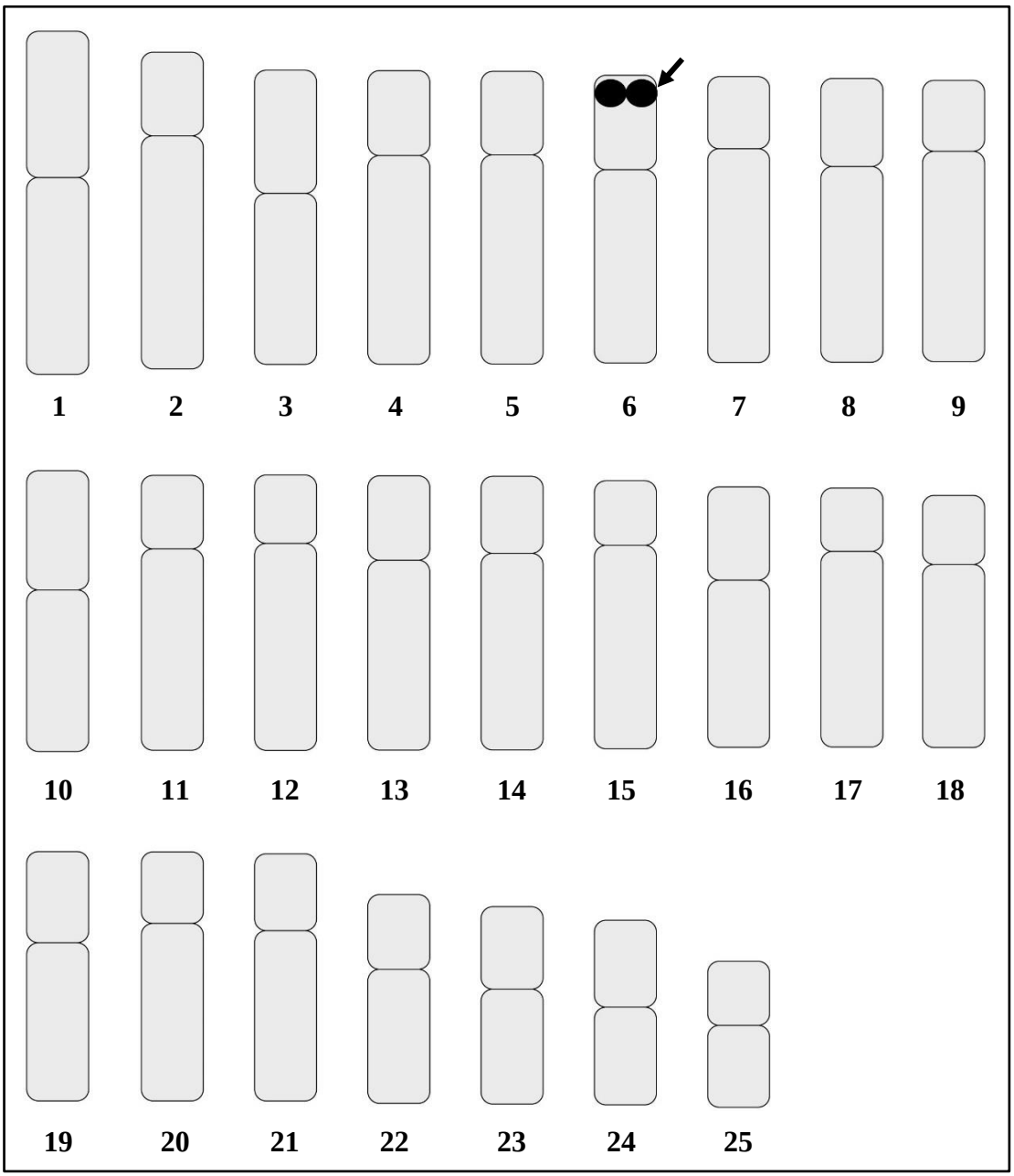
ภาพที่ 2.18 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของ ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.19 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.20 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 2.21 อิดิโอแกรมของปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 50 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์

ตารางที่ 2.4 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 ของปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	**Ls**	**Ll**	**LT**	**RL±SD**	**CI±SD**	**ขนาด**	**ชนิด**
1	1.837	2.472	2.309	0.030±0.001	0.572±0.032	ใหญ่	เมาทาเซนทริก
2	1.050	2.928	3.978	0.036±0.001	0.736±0.006	ใหญ่	อะโครเซนทริก
3	1.547	2.147	3.694	0.026±0.000	0.579±0.029	ใหญ่	เมาทาเซนทริก
4	1.066	2.621	3.687	0.032±0.002	0.71±0.010	ใหญ่	อะโครเซนทริก
5	1.048	2.628	3.676	0.032±0.001	0.713±0.016	ใหญ่	อะโครเซนทริก
6*	1.186	2.428	3.614	0.03±0.002	0.674±0.023	ใหญ่	ซับเมทาเซนทริก
7	0.905	2.687	3.592	0.033±0.001	0.751±0.025	ใหญ่	อะโครเซนทริก
8	1.107	2.458	3.565	0.03±0.000	0.690±0.004	ใหญ่	ซับเมทาเซนทริก
9	0.892	2.643	3.535	0.032±0.000	0.747±0.008	ใหญ่	อะโครเซนทริก
10	1.498	2.029	3.526	0.025±0.001	0.574±0.034	ใหญ่	เมาทาเซนทริก
11	0.923	2.530	3.453	0.031±0.001	0.731±0.013	ใหญ่	อะโครเซนทริก
12	0.859	2.600	3.459	0.032±0.002	0.751±0.017	ใหญ่	อะโครเซนทริก
13	1.060	2.386	3.446	0.029±0.001	0.692±0.001	ใหญ่	ซับเมทาเซนทริก
14	0.967	2.471	3.437	0.030±0.001	0.717±0.019	ใหญ่	อะโครเซนทริก
15	0.811	2.557	3.368	0.031±0.003	0.753±0.057	ใหญ่	อะโครเซนทริก
16	1.171	2.100	3.271	0.026±0.003	0.646±0.055	ใหญ่	ซับเมทาเซนทริก
17	0.797	2.457	3.254	0.03±0.002	0.754±0.021	ใหญ่	อะโครเซนทริก
18	0.867	2.300	3.167	0.028±0.004	0.722±0.028	ใหญ่	อะโครเซนทริก
19	1.145	1.986	3.131	0.024±0.001	0.652±0.005	ใหญ่	ซับเมทาเซนทริก
20	0.898	2.229	3.127	0.026±0.001	0.706±0.001	ใหญ่	อะโครเซนทริก
21	0.965	2.140	3.106	0.026±0.003	0.702±0.002	ใหญ่	อะโครเซนทริก
22	0.939	1.684	2.622	0.021±0.000	0.640±0.030	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
23	1.036	1.443	2.479	0.018±0.001	0.581±0.020	กลาง	เมาทาเซนทริก
24	1.091	1.228	2.320	0.015±0.001	0.530±0.004	กลาง	เมาทาเซนทริก
25	0.805	1.029	1.834	0.013±0.000	0.561±0.001	เล็ก	เมาทาเซนทริก

หมายเหตุ: * โครโมโซมเครื่องหมายที่มีตำแหน่งนอร์ (nucleolar organizer region)

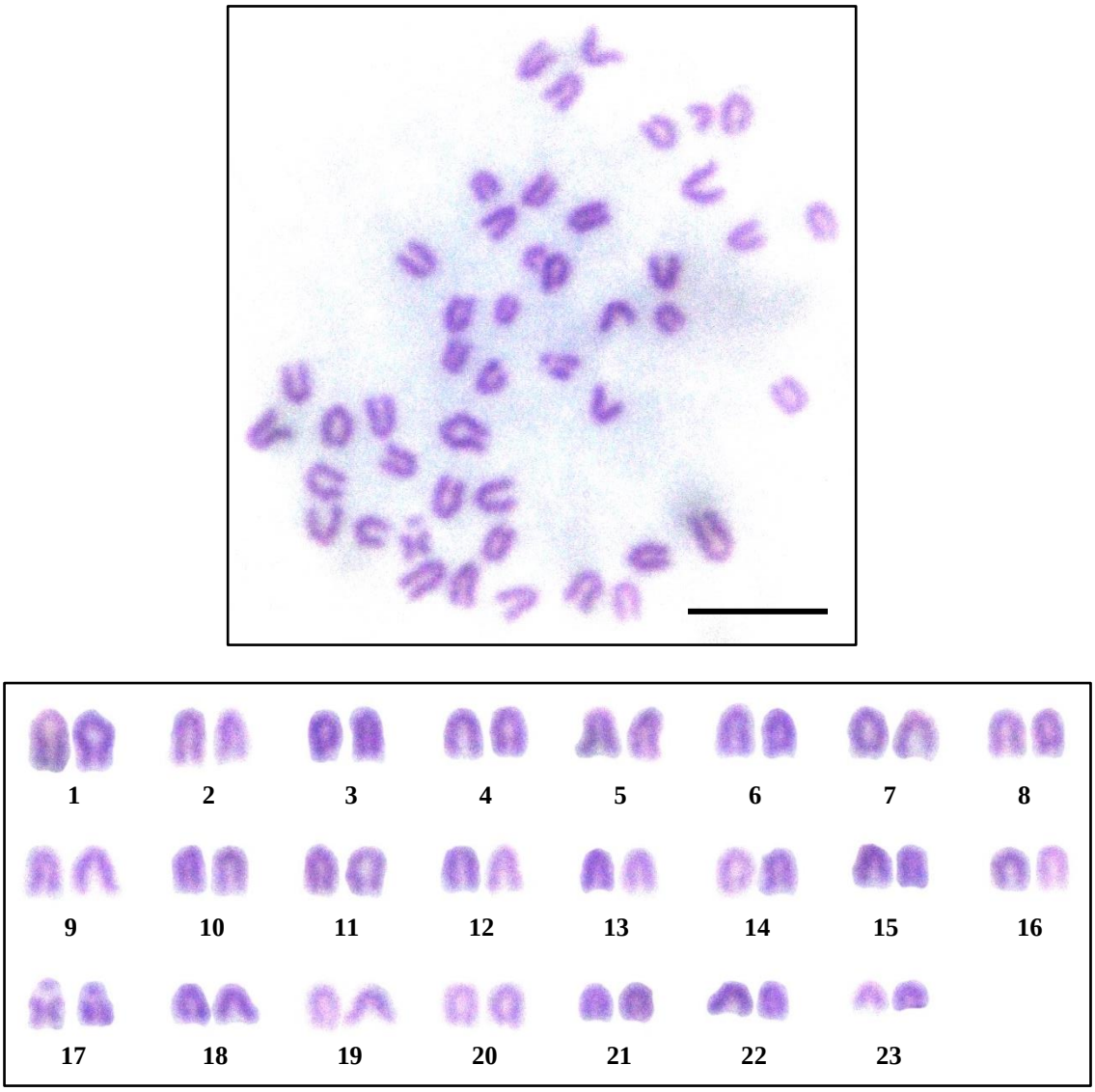
2.2.4 ปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*)

เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) (ภาพที่ 2.22) พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 46 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 46 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่ หินดำ ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลทริกขนาดใหญ่ 24 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 20 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง (ภาพที่ 2.23 และ 2.24) มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 ชนิดเทโลเซนทริก และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 23 ชนิดเทโลเซนทริก โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุดประมาณ 2 เท่า จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นบริเวณใกล้เทโลเมียร์ (subtelomeric regions) ของโครโมโซมคู่ที่ 17 (ภาพที่ 2.25 และ 2.26) ปลาบู่หินดำมีแคริโอไทป์แบบไม่สมมาตร โดยมีโครโมโซมเพียงชนิดเดียว คือ ชนิดเทโลเซนทริก ภาพอิดิโอแกรมจากการย้อมสีแบบธรรมดา และแถบสีแบบนอร์แสดงไว้ดังภาพที่ 2.27 และ 2.28 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ ค่า relative length ค่า centromeric index ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า RL, CI ขนาดและชนิดของโครโมโซมแสดงไว้ดังตารางที่ 2.5 ปลาบู่หินดำ มีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

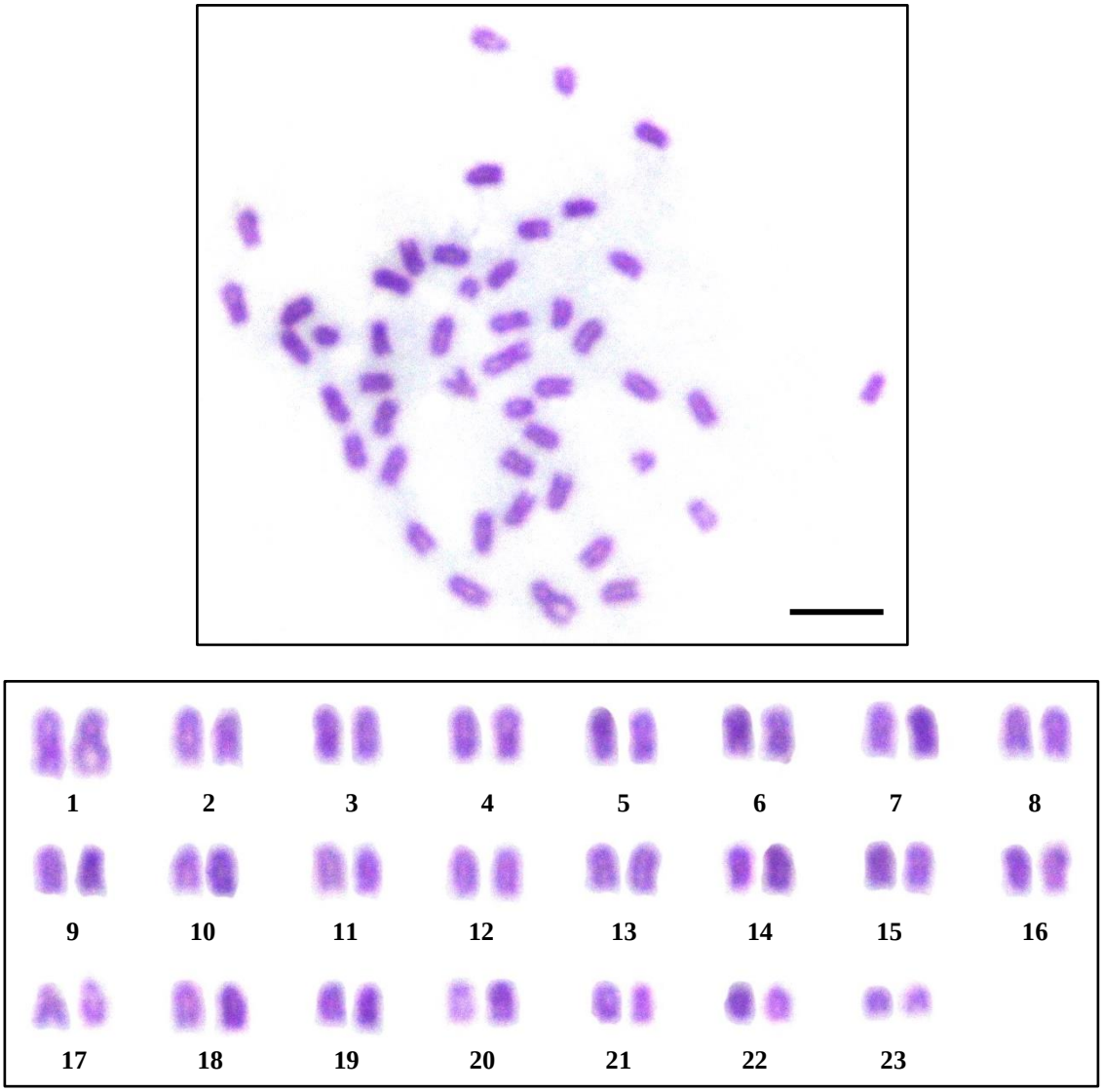
ปลาบู่หินดำ 2*n* (diploid) 46 = L^t_{24}+ M^t_{20} + S^t_2

หรือ = 46t

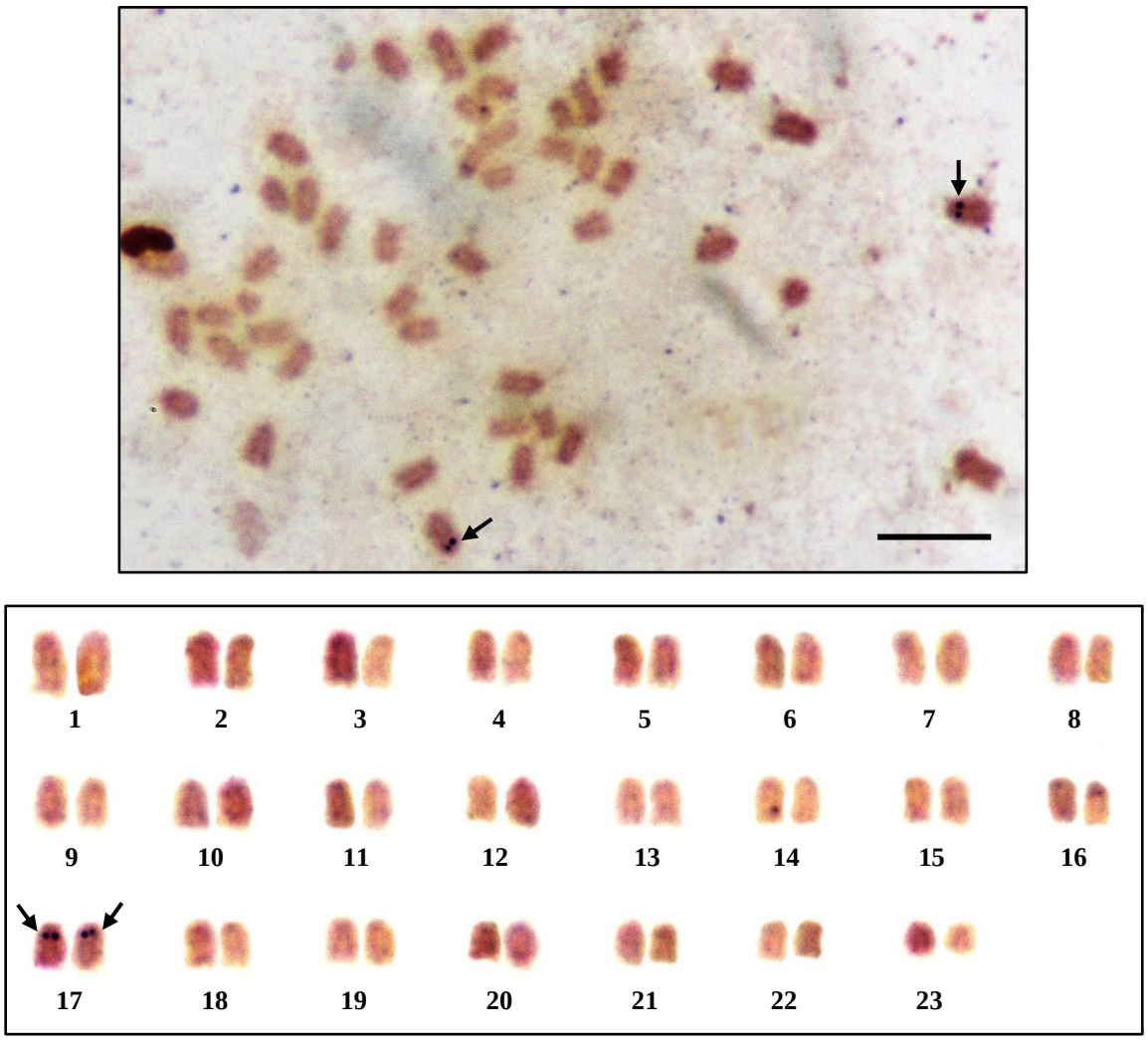
ภาพที่ 2.22 ลักษณะภายนอกของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) สเกลบาร์เท่ากับ 3 เซนติเมตร



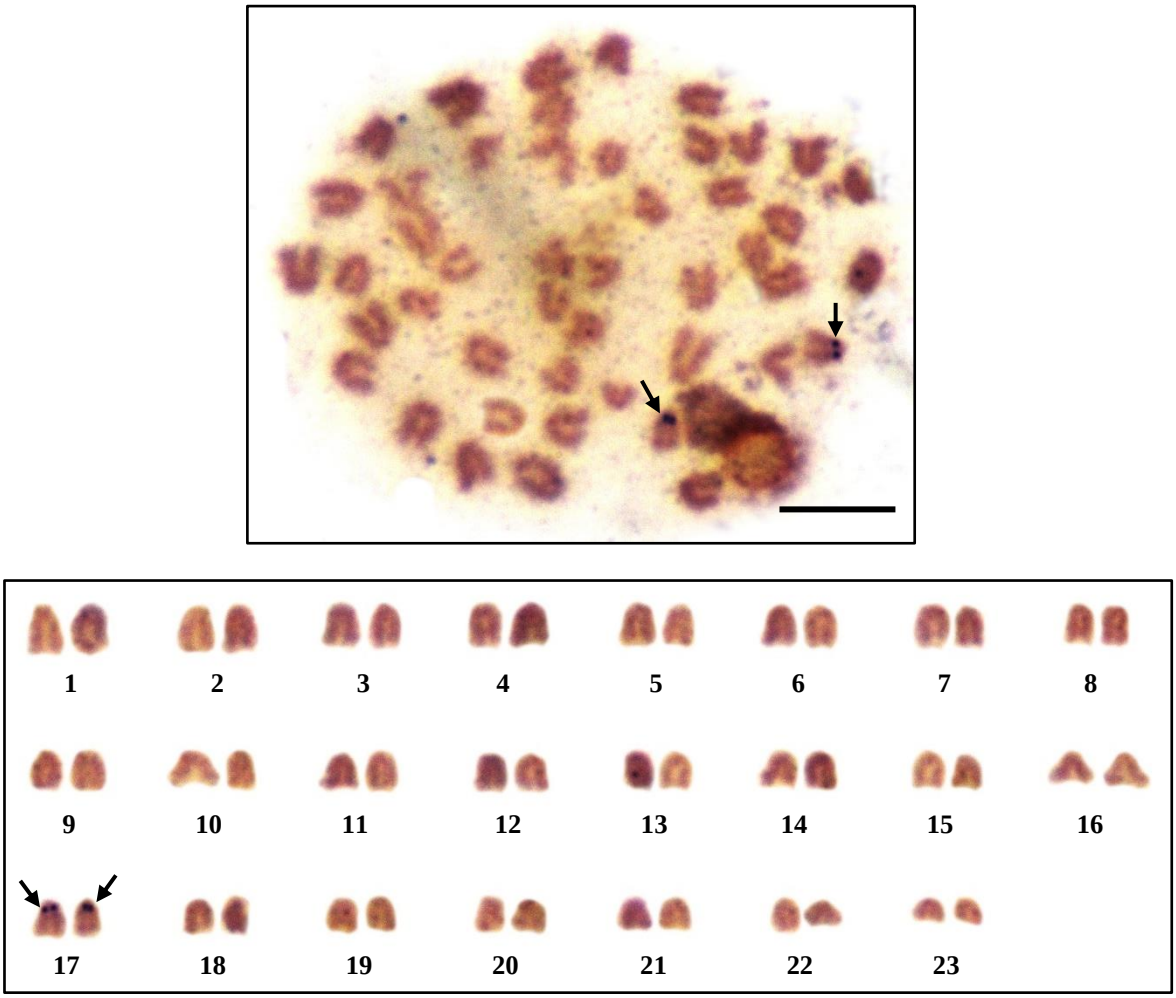
ภาพที่ 2.23 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



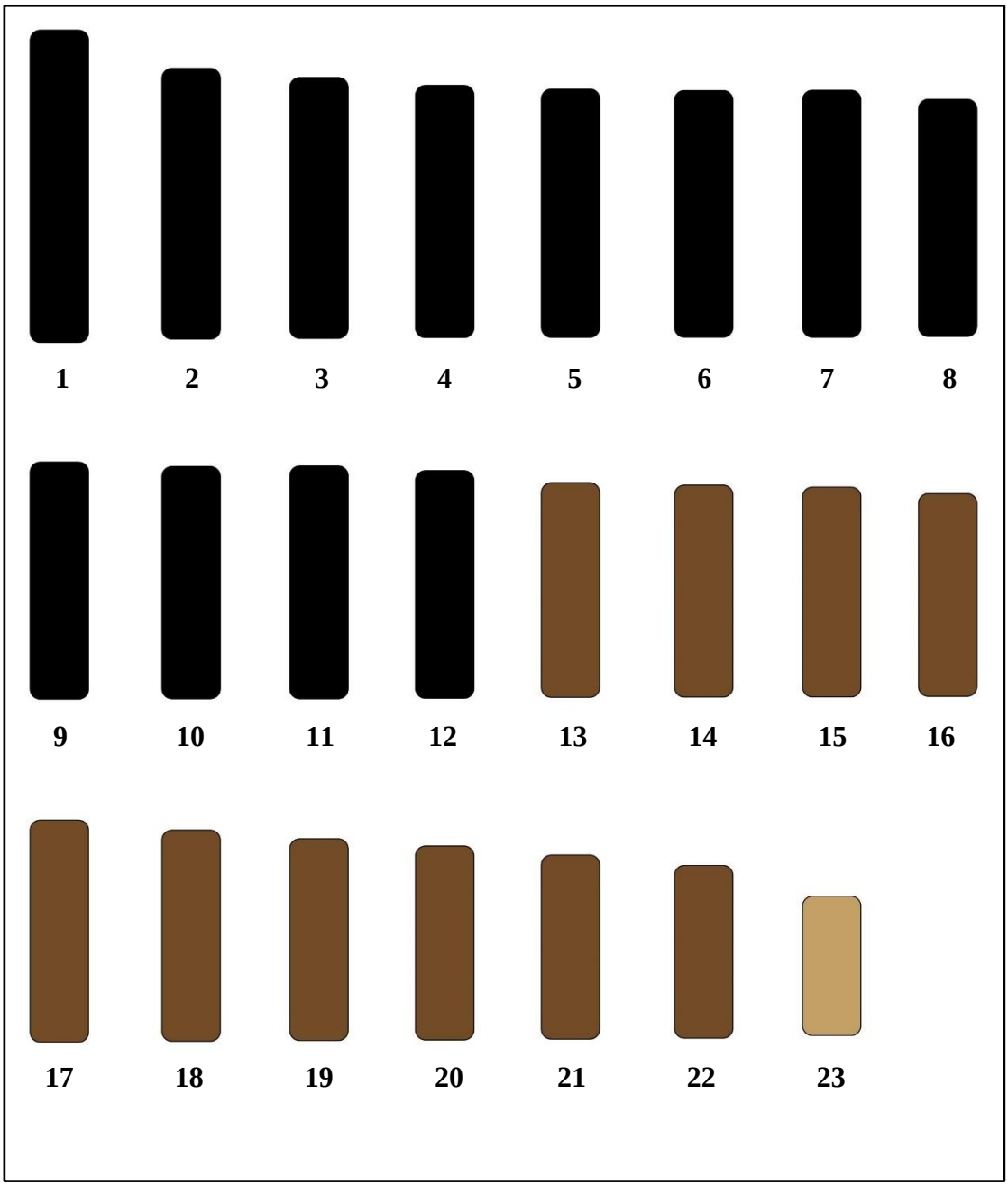
ภาพที่ 2.24 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



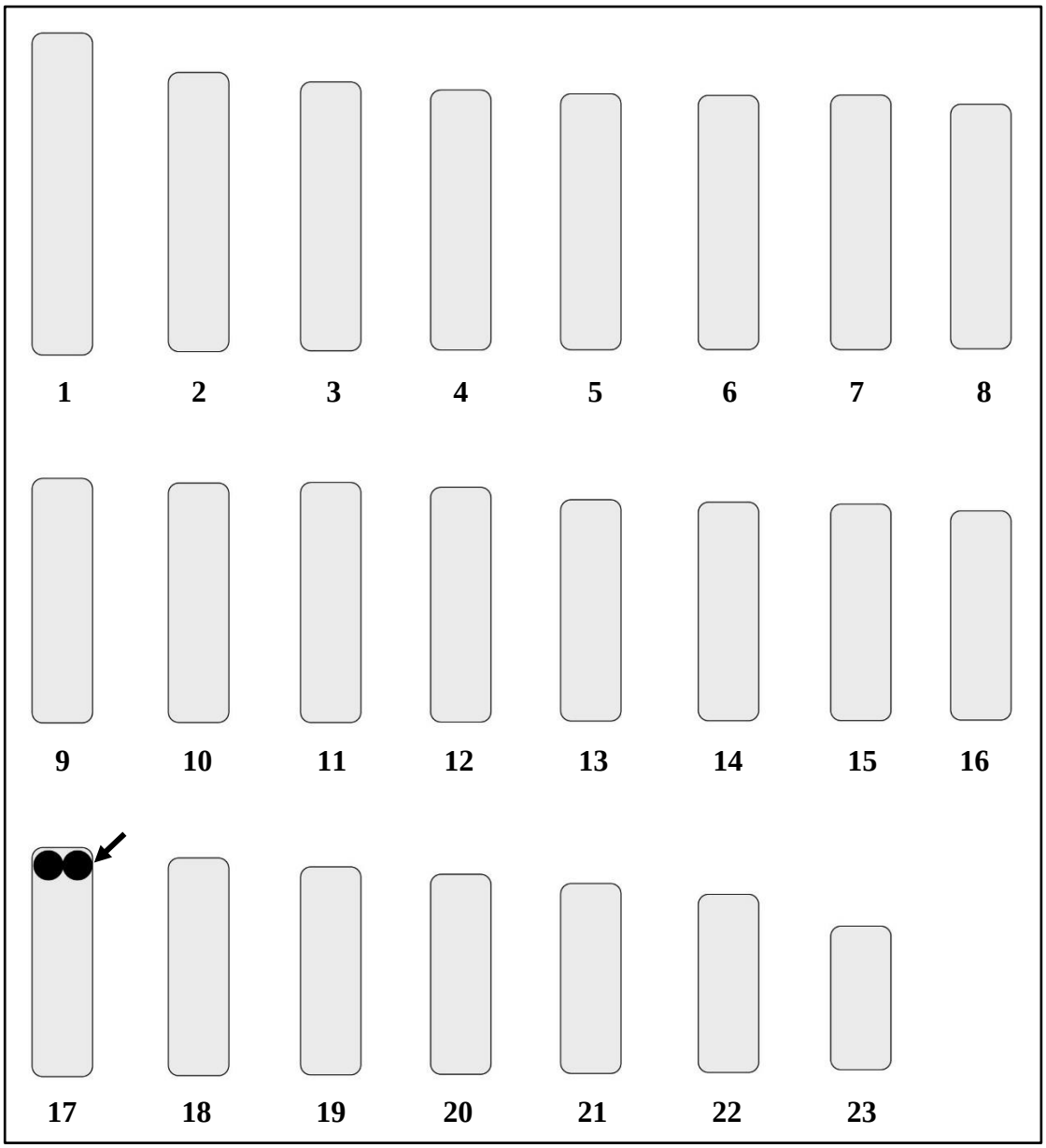
ภาพที่ 2.25 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.26 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.27 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 2.28 อิดิโอแกรมของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์

ตารางที่ 2.5 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 ของปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	**Ls**	**Ll**	**LT**	**RL±SD**	**CI±SD**	**ขนาด**	**ชนิด**
1	0.000	3.558	3.558	0.06±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
2	0.000	3.085	3.085	0.052±0.002	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
3	0.000	2.972	2.972	0.05±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
4	0.000	2.875	2.875	0.049±0.002	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
5	0.000	2.830	2.830	0.048±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
6	0.000	2.812	2.812	0.048±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
7	0.000	2.811	2.811	0.048±0.000	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
8	0.000	2.704	2.704	0.046±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
9	0.000	2.701	2.701	0.046±0.000	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
10	0.000	2.660	2.660	0.045±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
11	0.000	2.597	2.597	0.045±0.002	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
12	0.000	2.595	2.595	0.044±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
13	0.000	2.445	2.445	0.041±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
14	0.000	2.437	2.437	0.041±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
15	0.000	2.423	2.423	0.041±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
16	0.000	2.403	2.403	0.039±0.003	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
17*	0.000	2.399	2.399	0.043±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
18	0.000	2.376	2.376	0.041±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
19	0.000	2.299	2.299	0.039±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
20	0.000	2.210	2.210	0.038±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
21	0.000	2.099	2.099	0.036±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
22	0.000	1.971	1.971	0.033±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
23	0.000	1.588	1.588	0.027±0.001	1.000±0.000	เล็ก	เทโลเซนทริก

หมายเหตุ: * โครโมโซมเครื่องหมายที่มีตำแหน่งนอร์ (nucleolar organizer region)

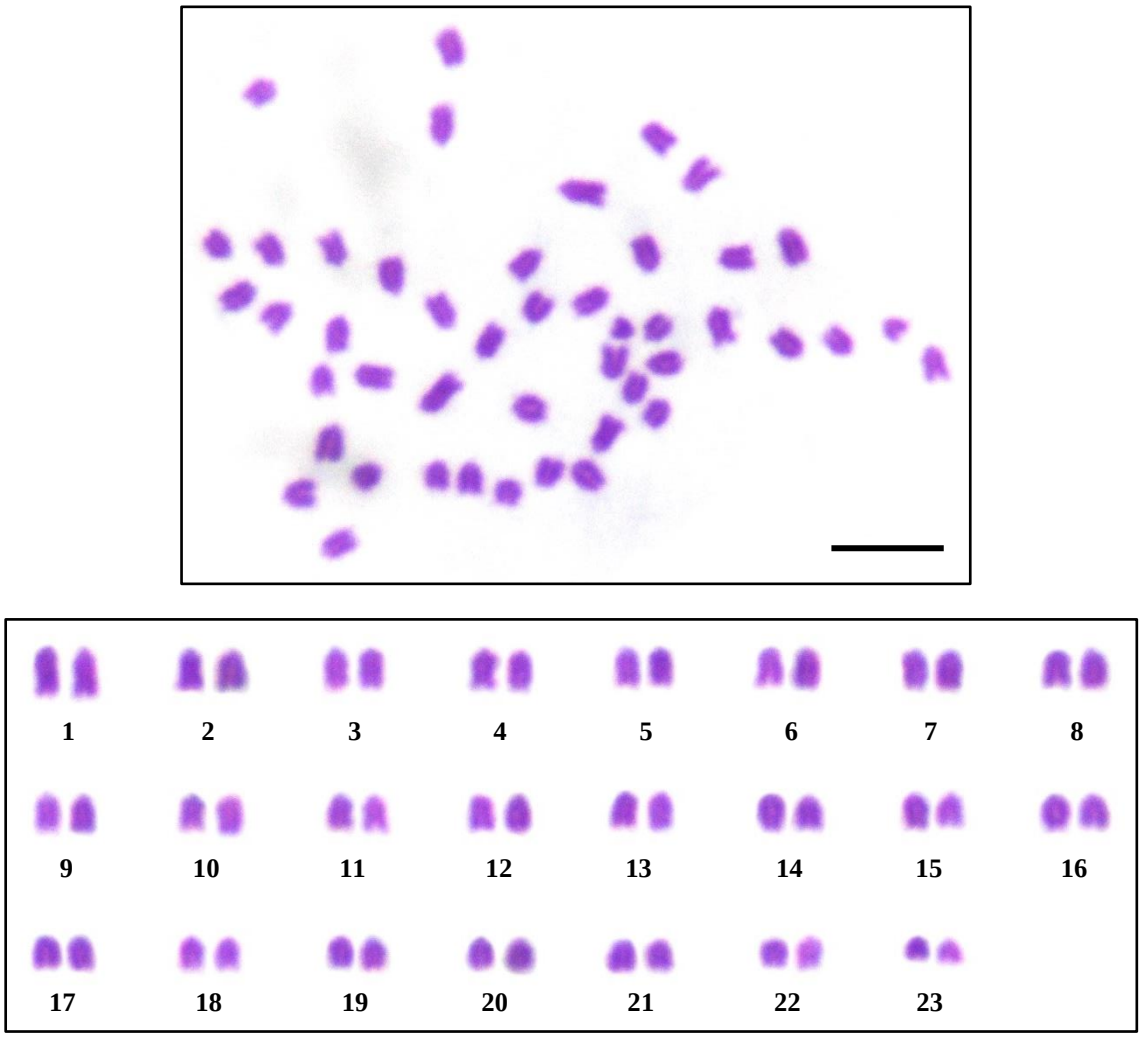
2.2.5 ปลาตีน (*Glossogobius giuris*)

การศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) (ภาพที่ 2.29) พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอด์ เท่ากับ 46 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 46 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาตีนประกอบด้วยโครโมโซมชนิด เทโลทริกขนาดใหญ่ 26 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 18 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง (ภาพที่ 2.30 และ 2.31) มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 ชนิดเทโลเซนทริก และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 23 ชนิดเทโลเซนทริก โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุดประมาณ 2 เท่า จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 2 (ภาพที่ 2.32 และ 2.33) ปลาตีนมีแคริโอไทป์แบบไม่สมมาตร โดยมีโครโมโซมเพียงชนิดเดียว คือ ชนิดเทโลเซนทริก ภาพอิดิโอแกรมจากการย้อมสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์แสดงไว้ดังภาพที่ 2.34 และ 2.35 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ ค่า relative length ค่า centromeric index ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า RL, CI ขนาดและชนิดของโครโมโซมแสดงไว้ดังตารางที่ 2.6 ปลาตีนมีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

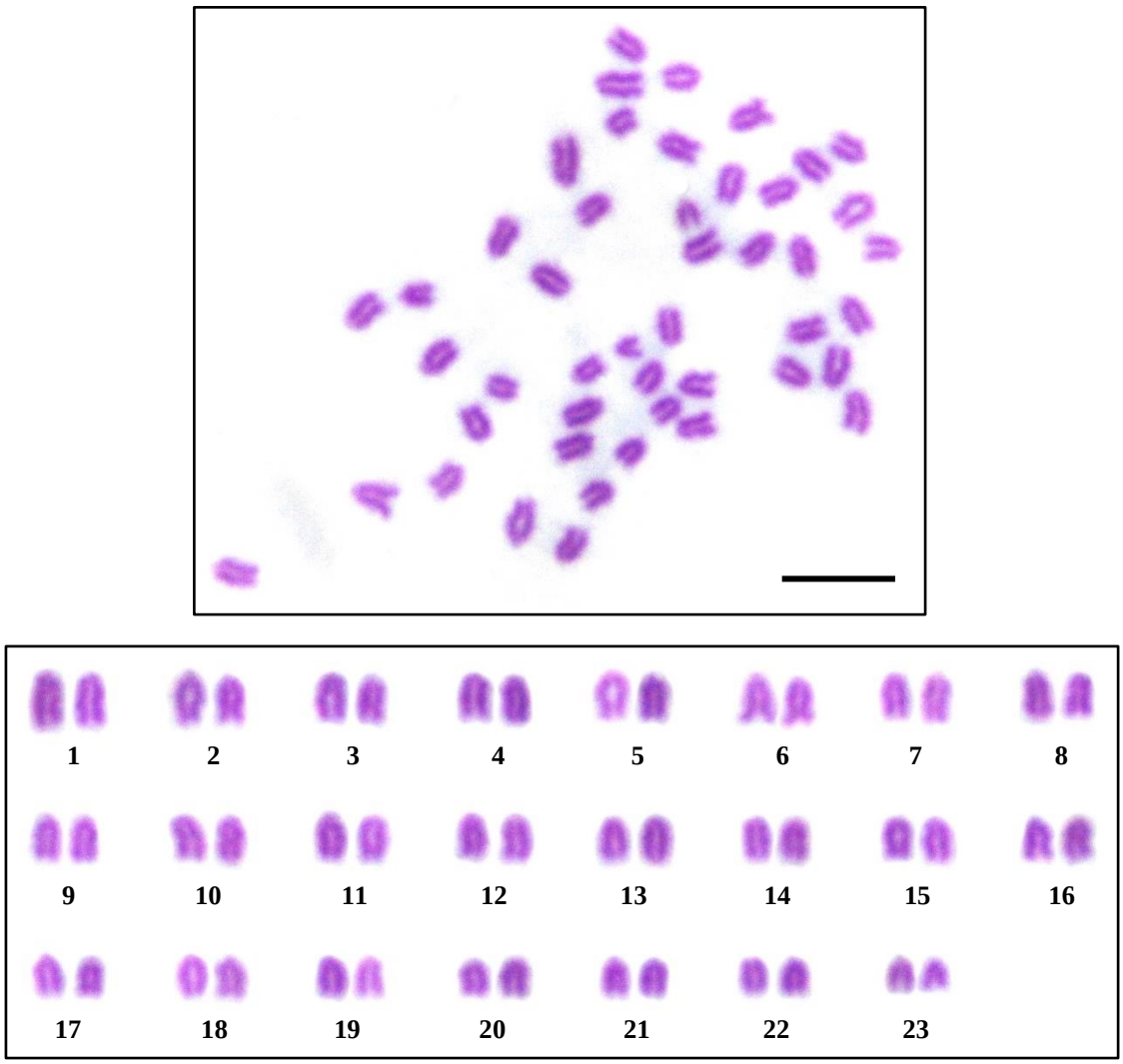
ปลาตีน 2*n* (diploid) 46 = L^t_{26}+ M^t_{18} + S^t_2

หรือ = 46t

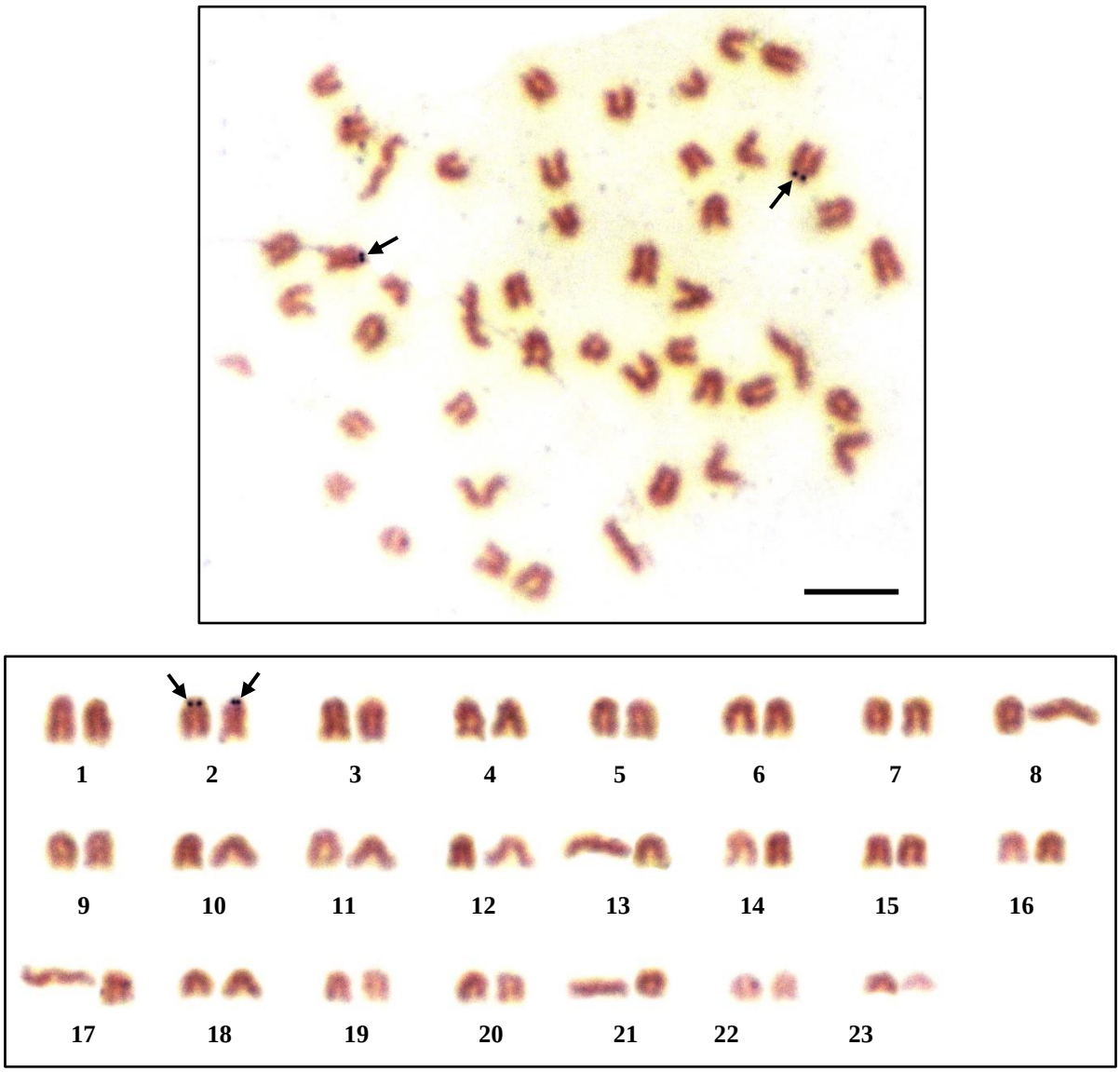
ภาพที่ 2.29 ลักษณะภายนอกของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) สเกลบาร์เท่ากับ 3 เซนติเมตร



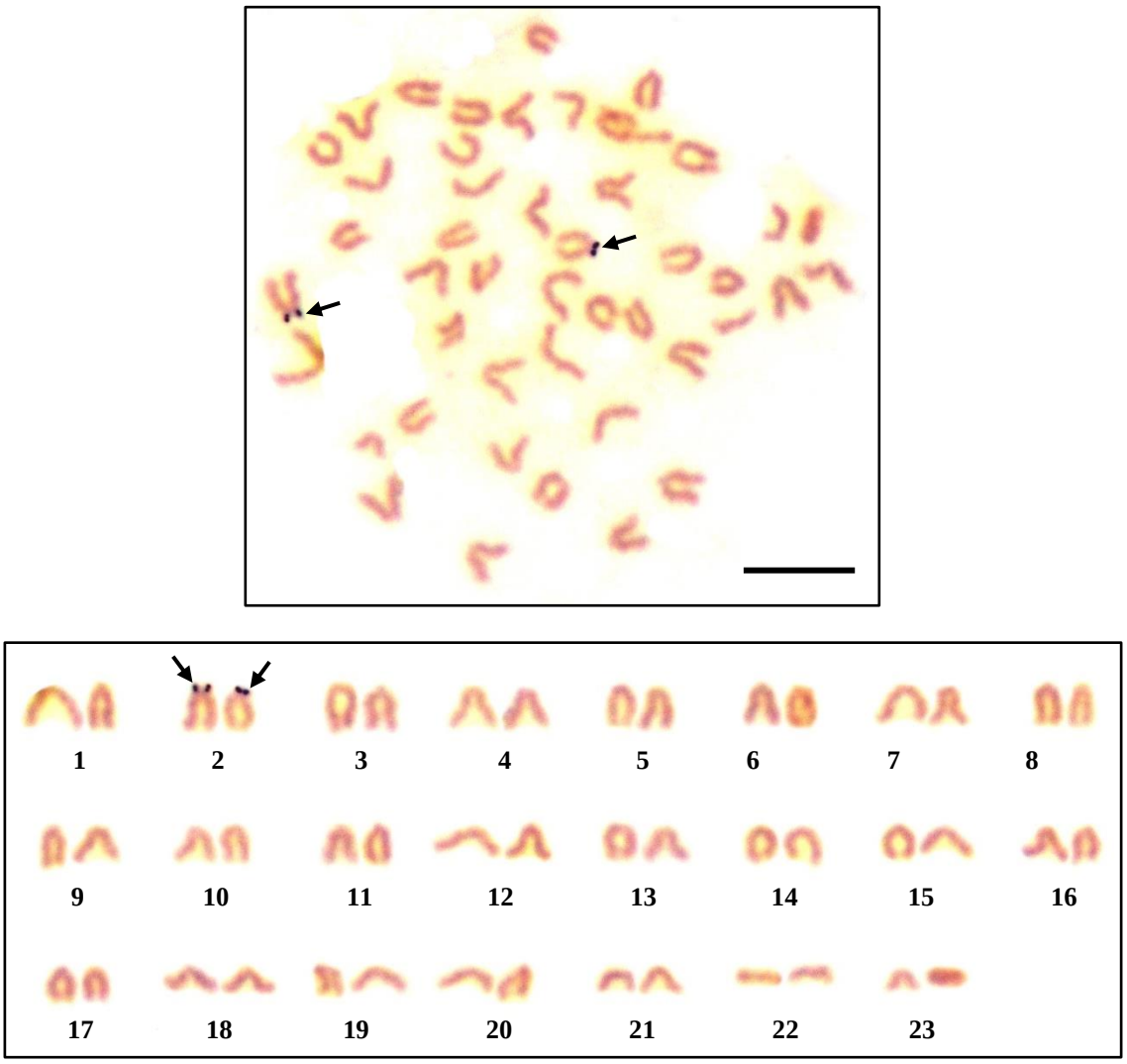
ภาพที่ 2.30 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



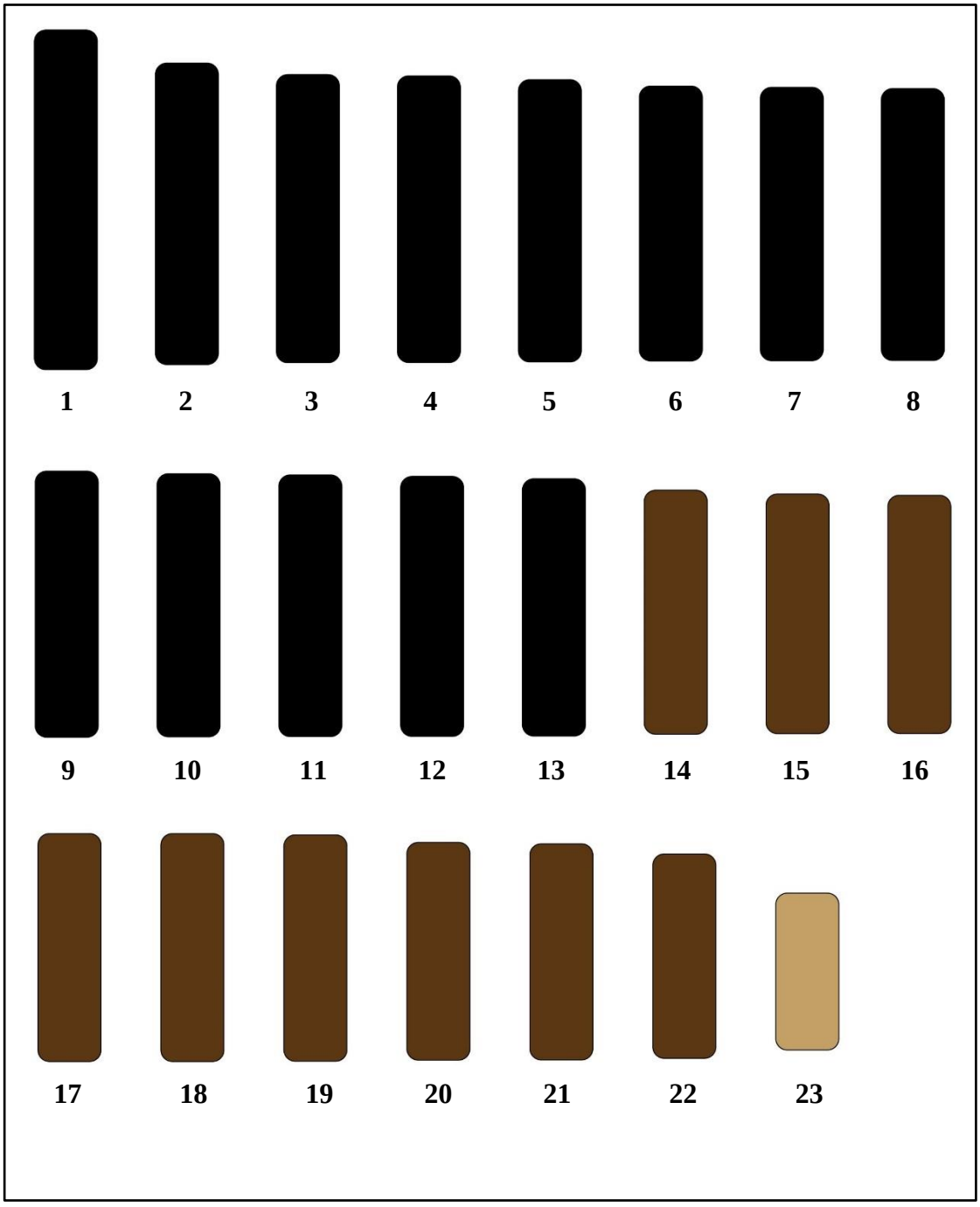
ภาพที่ 2.31 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



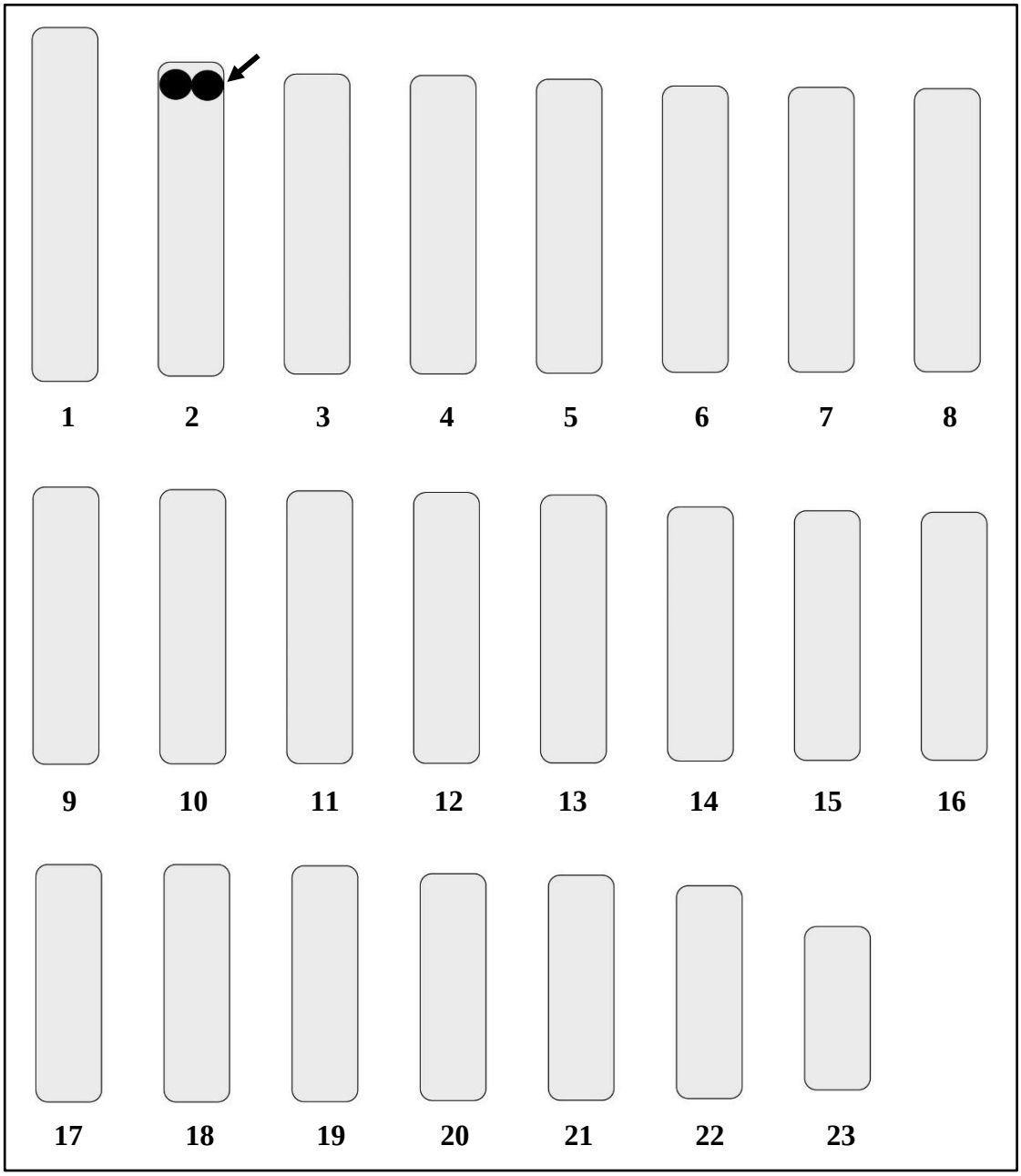
ภาพที่ 2.32 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.33 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.34 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาตีน (*Glossogobius giuris*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 2.35 อิดิโอแกรมของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์

ตารางที่ 2.6 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 ของปลาตีน (*Glossogobius giuris*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	**Ls**	**Ll**	**LT**	**RL±SD**	**CI±SD**	**ขนาด**	**ชนิด**
1	0.000	3.300	3.300	0.059±0.003	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
2*	0.000	2.929	2.929	0.052±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
3	0.000	2.800	2.800	0.05±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
4	0.000	2.786	2.786	0.049±0.002	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
5	0.000	2.743	2.743	0.048±0.000	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
6	0.000	2.671	2.671	0.047±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
7	0.000	2.657	2.657	0.047±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
8	0.000	2.643	2.643	0.047±0.000	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
9	0.000	2.585	2.585	0.045±0.003	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
10	0.000	2.557	2.557	0.045±0.000	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
11	0.000	2.543	2.543	0.045±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
12	0.000	2.526	2.526	0.045±0.000	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
13	0.000	2.500	2.500	0.044±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
14	0.000	2.371	2.371	0.042±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
15	0.000	2.329	2.329	0.041±0.000	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
16	0.000	2.314	2.314	0.041±0.000	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
17	0.000	2.214	2.214	0.039±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
18	0.000	2.214	2.214	0.039±0.000	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
19	0.000	2.200	2.200	0.039±0.000	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
20	0.000	2.115	2.115	0.038±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
21	0.000	2.100	2.100	0.037±0.003	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
22	0.000	1.985	1.985	0.035±0.000	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
23	0.000	1.524	1.524	0.027±0.001	1.000±0.000	เล็ก	เทโลเซนทริก

หมายเหตุ: * โครโมโซมเครื่องหมายที่มีตำแหน่งนอร์ (nucleolar organizer region)

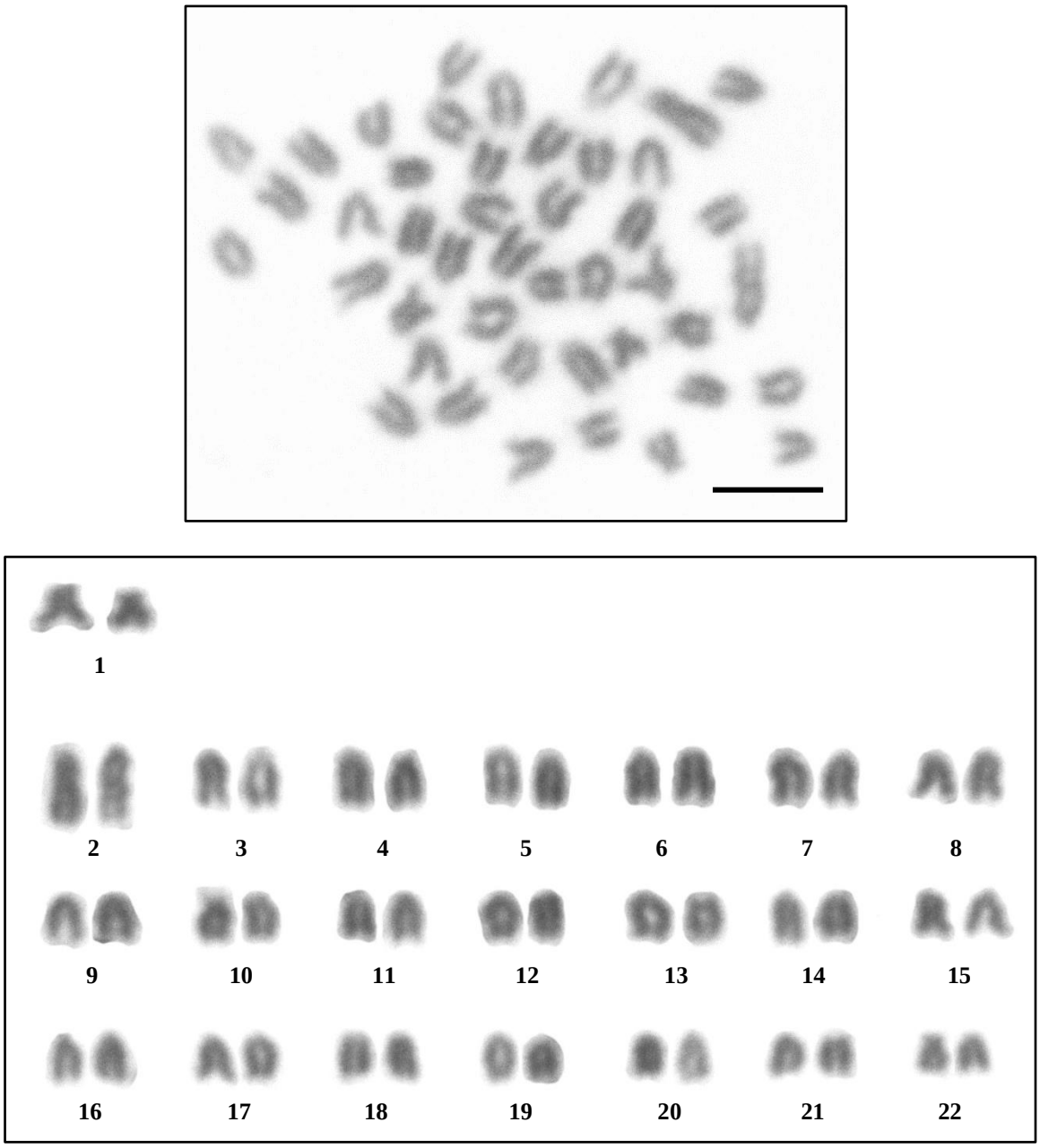
2.2.6 ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*)

เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) (ภาพที่ 2.36) พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 44 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 46 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลทริกขนาดใหญ่ 12 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดกลาง 30 แท่ง (ภาพที่ 2.37 และ 2.38) มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 2 ชนิดเทโลเซนทริก และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 22 ชนิดเทโลเซนทริก โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุดประมาณ 2 เท่า จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 18 (ภาพที่ 2.39 และ 2.40) ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้ามีแคริโอไทป์แบบไม่สมมาตร โดยมีโครโมโซมเพียง 2 ชนิด คือ ชนิดเมทาเซนทริก และเทโลเซนทริก ภาพอิดิโอแกรมจากการย้อมสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์แสดงไว้ดังภาพที่ 2.41 และ 2.42 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ ค่า relative length ค่า centromeric index ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า RL, CI ขนาดและชนิดของโครโมโซมแสดงไว้ดังตารางที่ 2.7 ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้ามีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

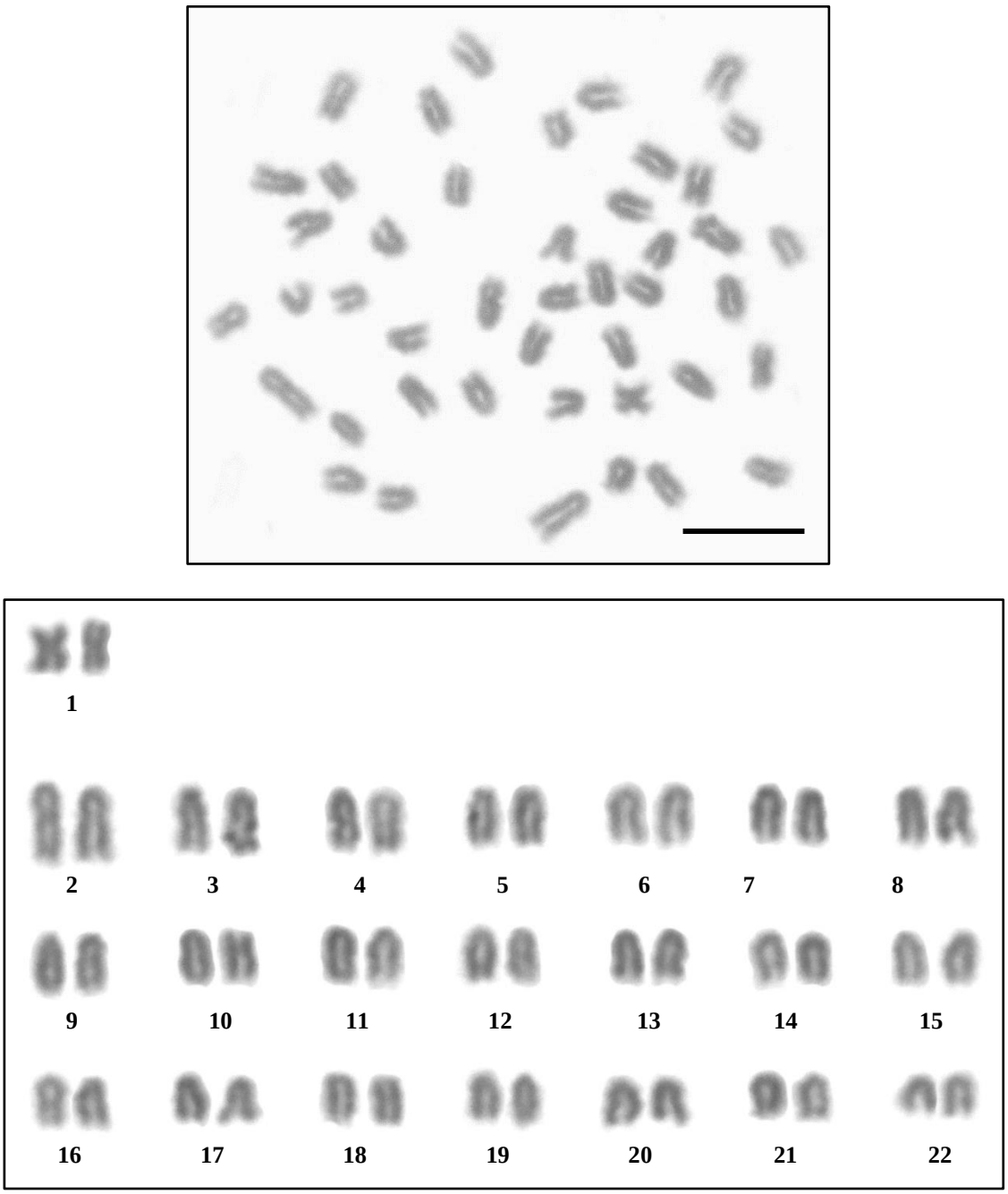
ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า 2*n* (diploid) 46 = L^{t}_{12}+ M^{m}_{2} + M^{t}_{30}

หรือ = 2m + 42t

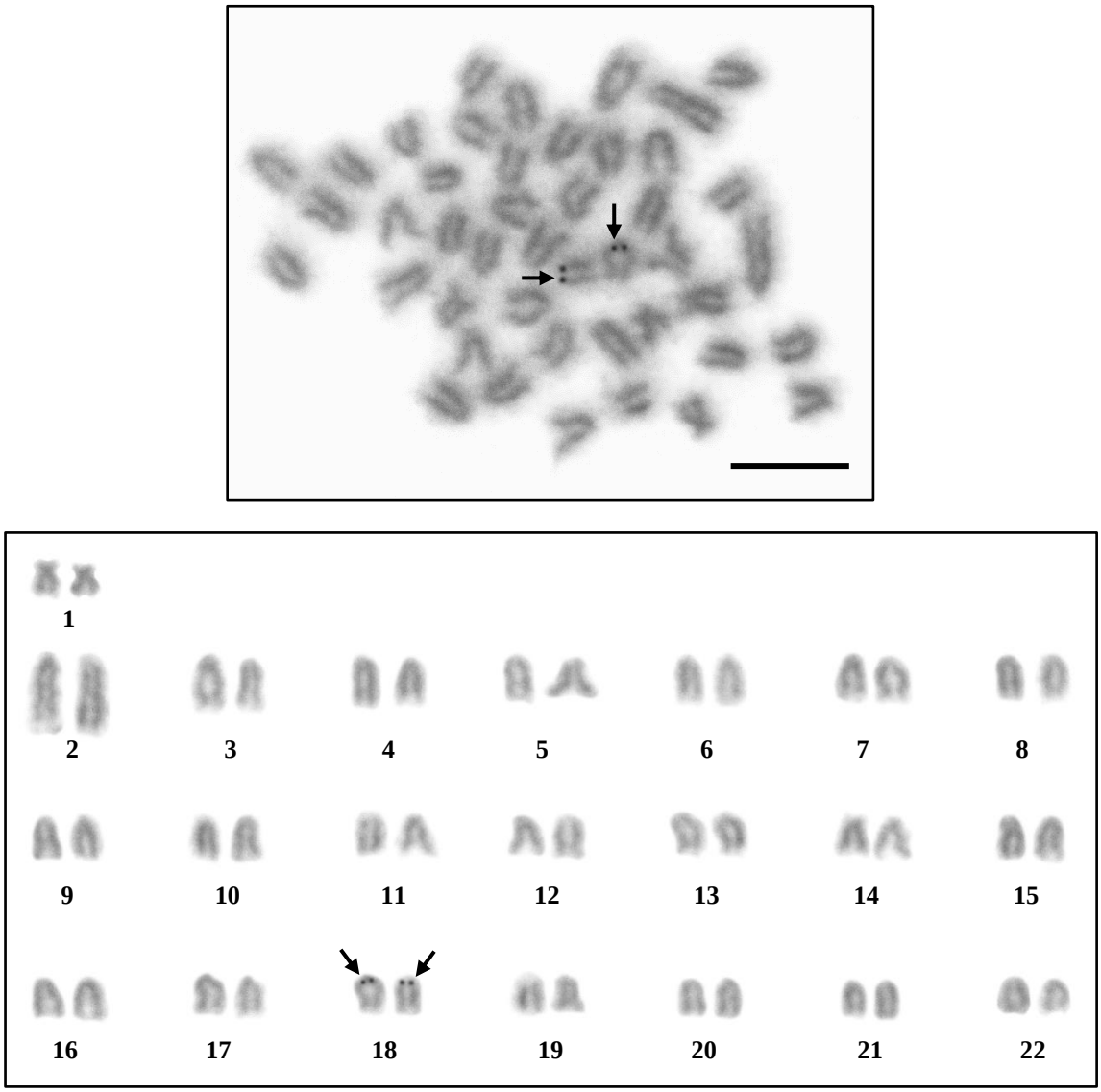
ภาพที่ 2.36 ลักษณะภายนอกของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) สเกลบาร์เท่ากับ 3 เซนติเมตร



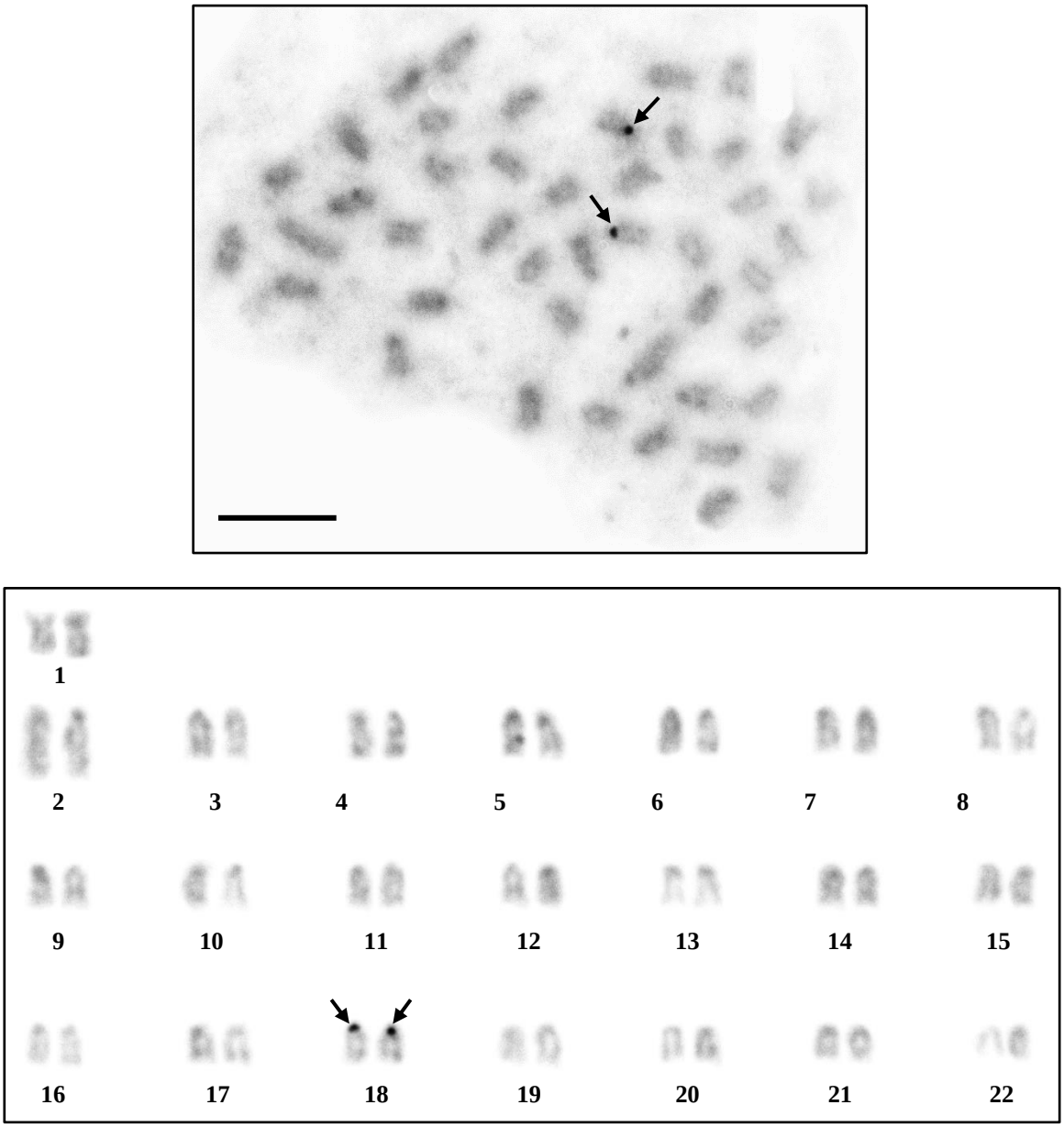
ภาพที่ 2.37 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



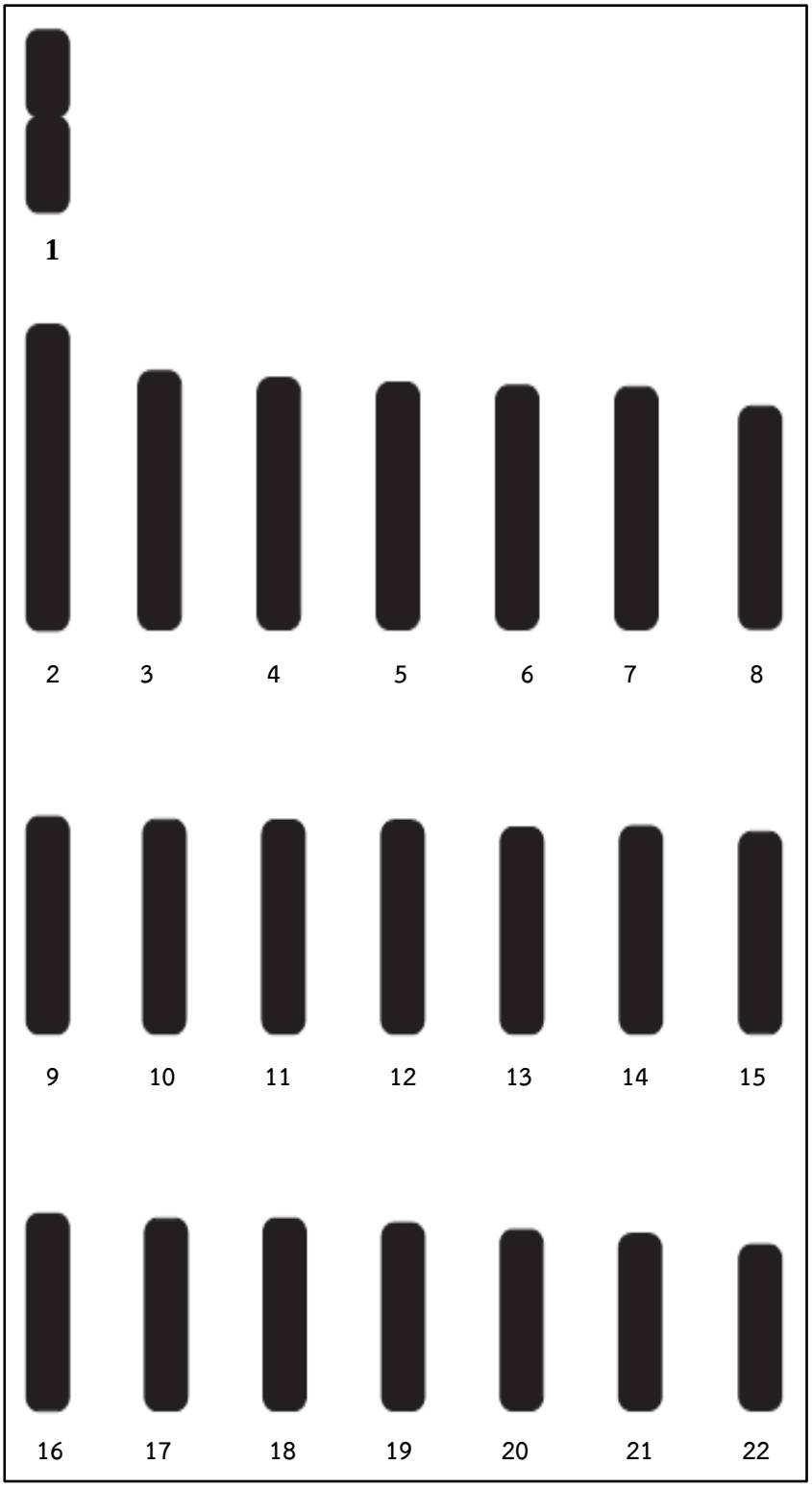
ภาพที่ 2.38 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



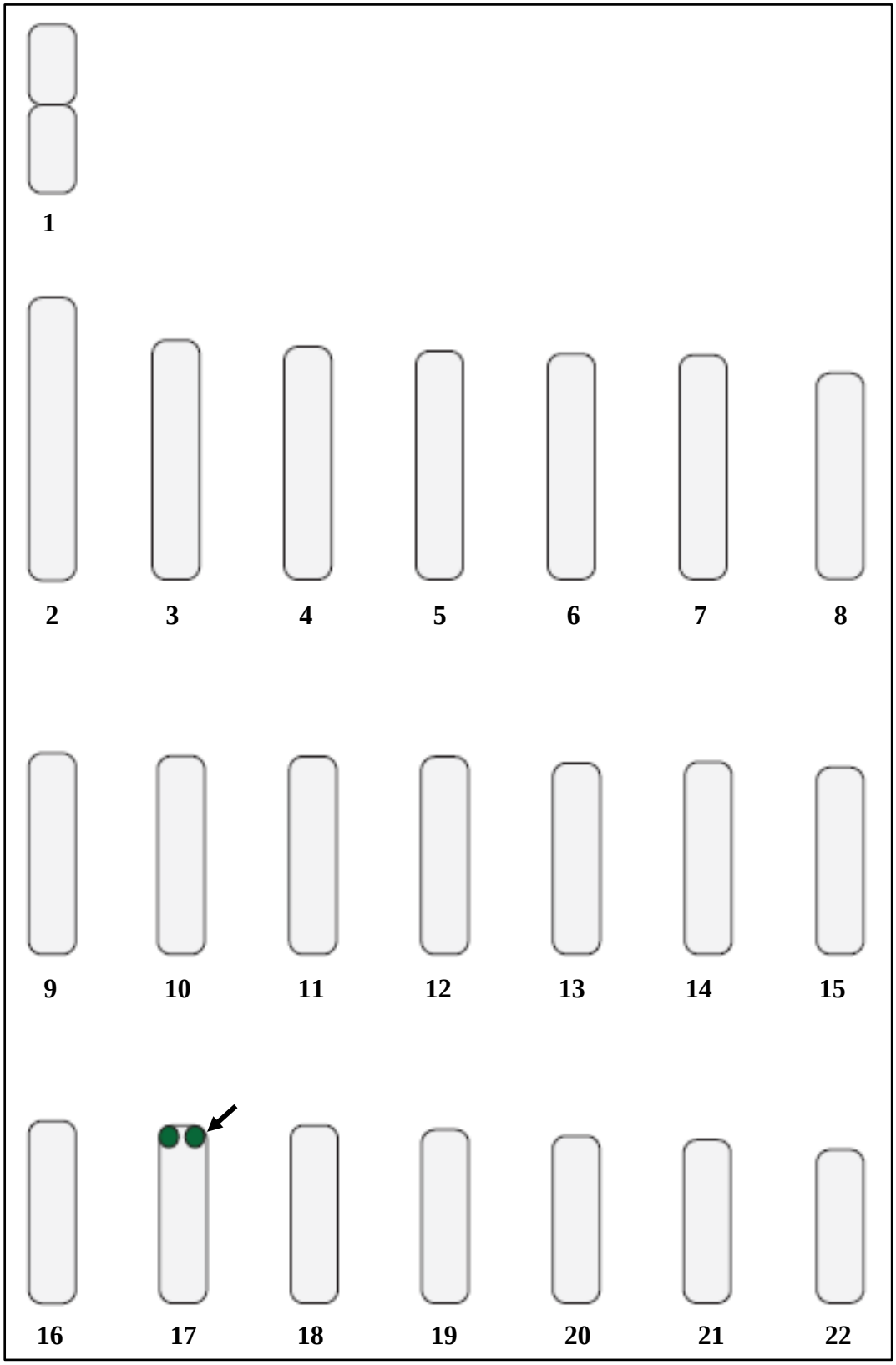
ภาพที่ 2.39 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.40 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.41 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 2.42 อิดิโอแกรมของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์

ตารางที่ 2.7 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 ของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซม ดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	**Ls**	**Ll**	**LT**	**RL±SD**	**CI±SD**	**ขนาด**	**ชนิด**
1	1.144	1.259	2.403	0.039±0.004	0.523±0.023	กลาง	เมทาเซนทริก
2	0.000	2.024	2.024	0.065±0.005	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
3	0.000	3.402	3.402	0.055±0.002	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
4	0.000	3.310	3.310	0.053±0.002	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
5	0.000	3.248	3.248	0.052±0.002	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
6	0.000	3.208	3.208	0.052±0.002	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
7	0.000	3.189	3.189	0.051±0.002	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
8	0.000	2.928	2.928	0.047±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
9	0.000	2.862	2.862	0.046±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
10	0.000	2.821	2.821	0.045±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
11	0.000	2.815	2.815	0.045±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
12	0.000	2.809	2.809	0.044±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
13	0.000	2.719	2.719	0.044±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
14	0.000	2.733	2.733	0.044±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
15	0.000	2.656	2.656	0.043±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
16	0.000	2.594	2.594	0.042±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
17	0.000	2.527	2.527	0.041±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
18*	0.000	2.531	2.531	0.041±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
19	0.000	2.467	2.467	0.04±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
20	0.000	2.377	2.377	0.038±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
21	0.000	2.321	2.321	0.037±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
22	0.000	2.176	2.176	0.035±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก

หมายเหตุ: * โครโมโซมเครื่องหมายที่มีตำแหน่งนอร์ (nucleolar organizer region)

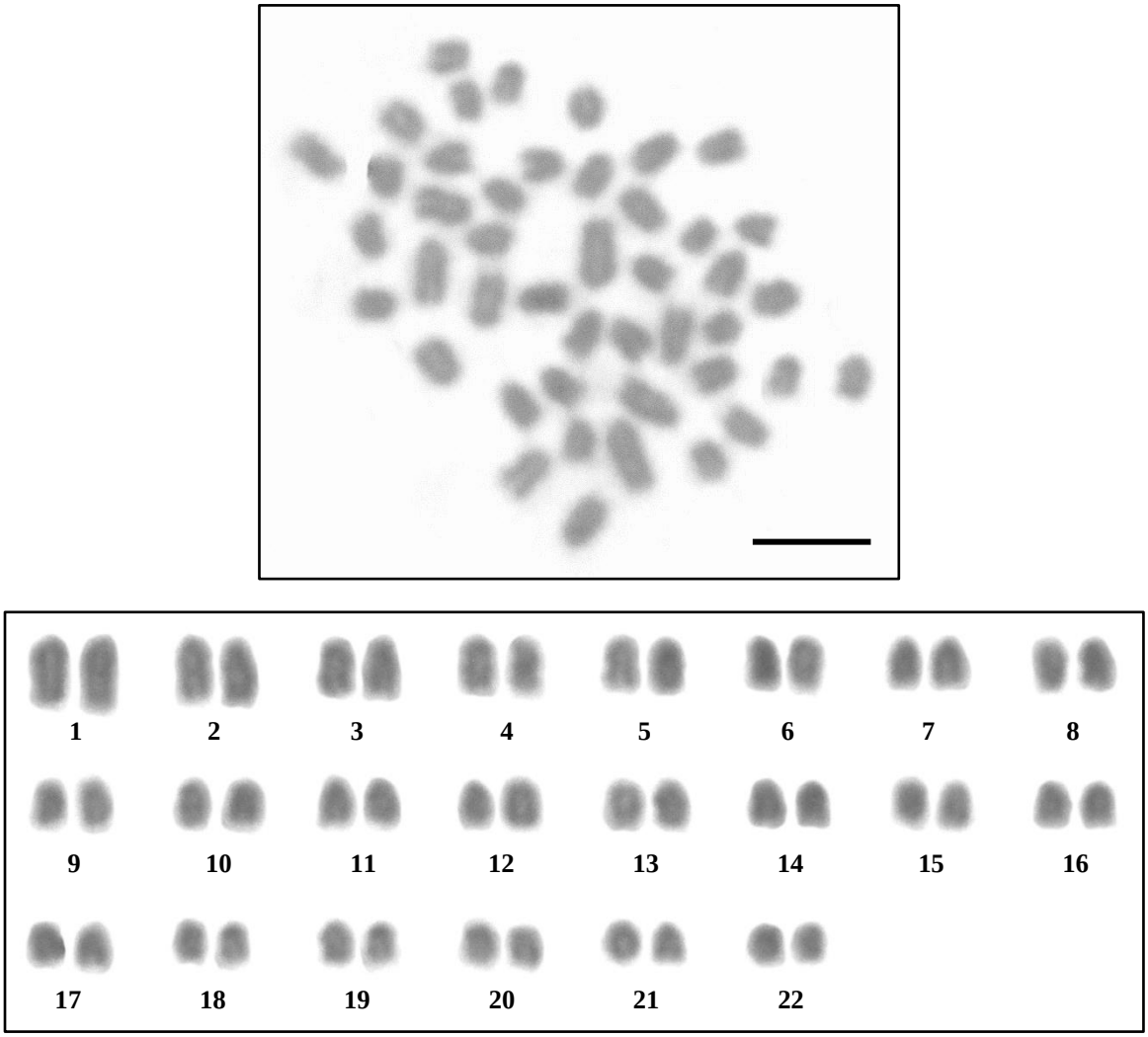
2.2.7 ปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*)

เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) (ภาพที่ 2.43) พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอด์ เท่ากับ 44 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 44 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่ทรายเส้นชมพู ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลทริกขนาดใหญ่ 10 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดกลาง 34 แท่ง (ภาพที่ 2.44 และ 2.45) มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 ชนิดเทโลเซนทริก และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 22 ชนิดเทโลเซนทริก โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุดประมาณ 2 เท่า จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นใกล้บริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 1 (ภาพที่ 2.46 และ 2.47) ปลาบู่ทรายเส้นชมพูมีแคริโอไทป์แบบไม่สมมาตร โดยมีโครโมโซมเพียงชนิดเดียว คือ ชนิดเทโลเซนทริก ภาพอิดิโอแกรมจากการย้อมสีแบบธรรมดา และแถบสีแบบนอร์แสดงไว้ดังภาพที่ 2.48 และ 2.49 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ ค่า relative length ค่า centromeric index ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า RL, CI ขนาดและชนิดของโครโมโซมแสดงไว้ดังตารางที่ 2.8 ปลาบู่ทรายเส้นชมพูมีสูตรแคริโอไทป์ดังนี้

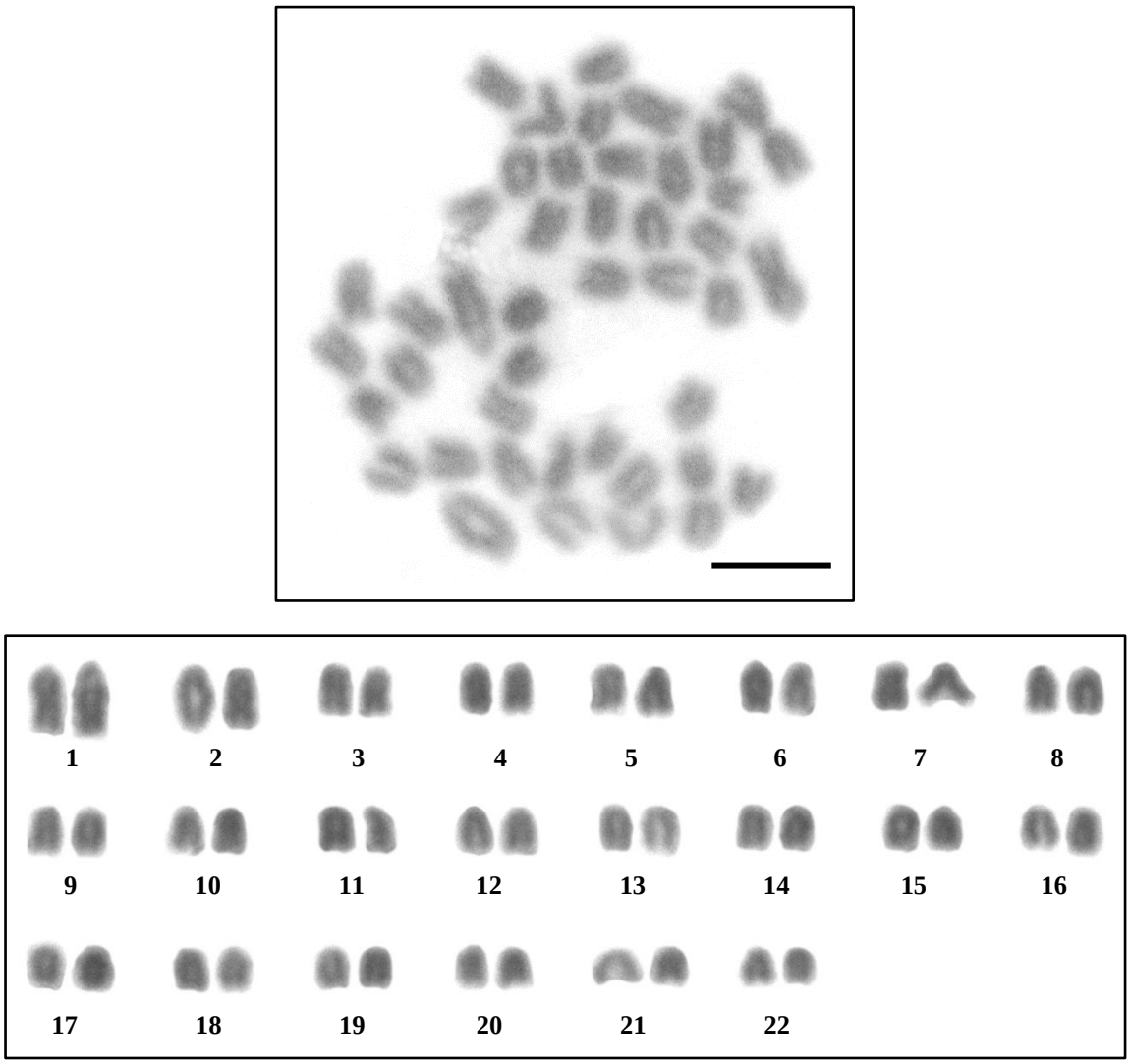
ปลาบู่ทรายเส้นชมพู $2n$ (diploid) 44 = $L^{t}_{10} + M^{t}_{34}$

หรือ = 44t

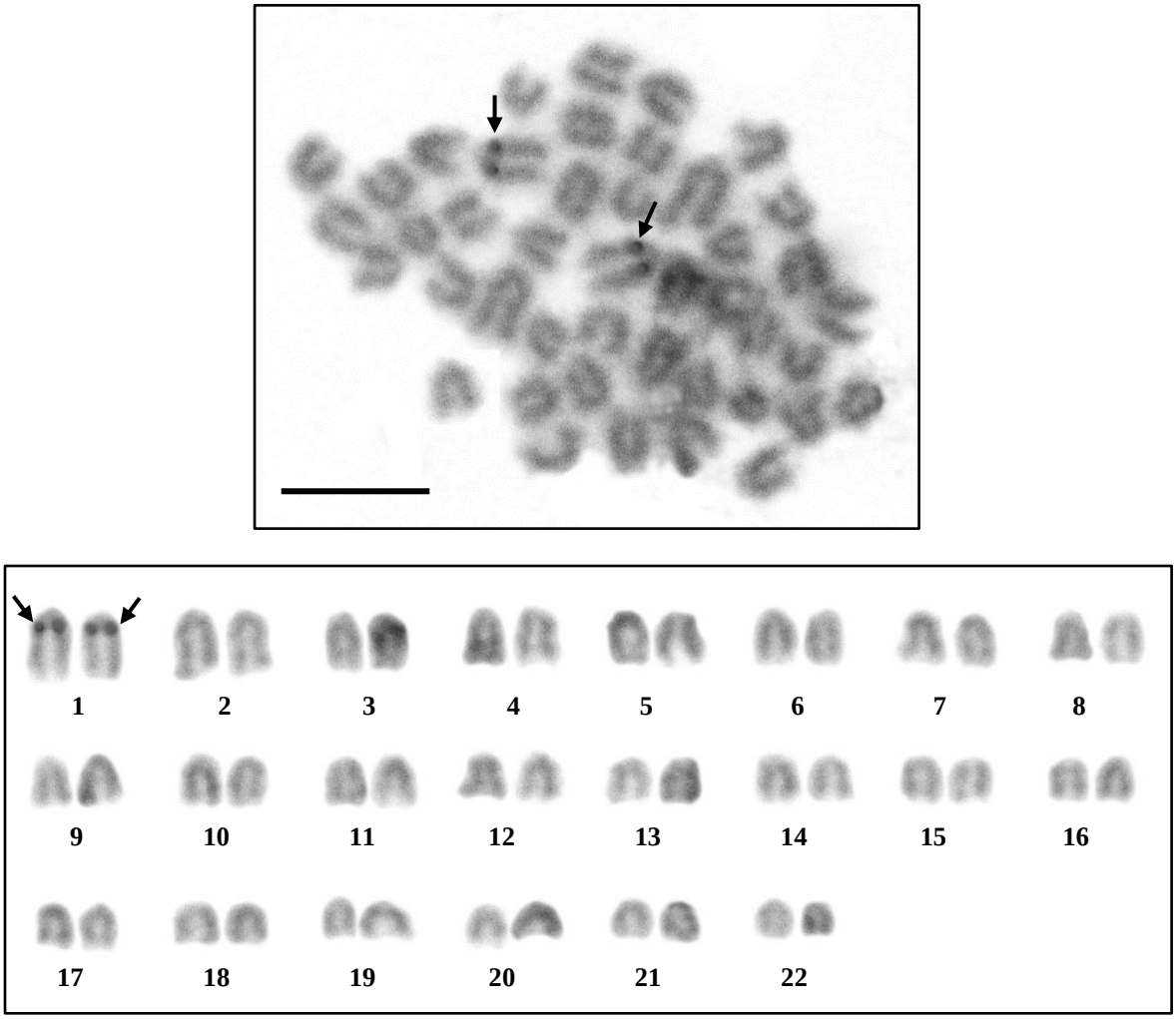
ภาพที่ 2.43 ลักษณะภายนอกของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) สเกลบาร์เท่ากับ 3 เซนติเมตร



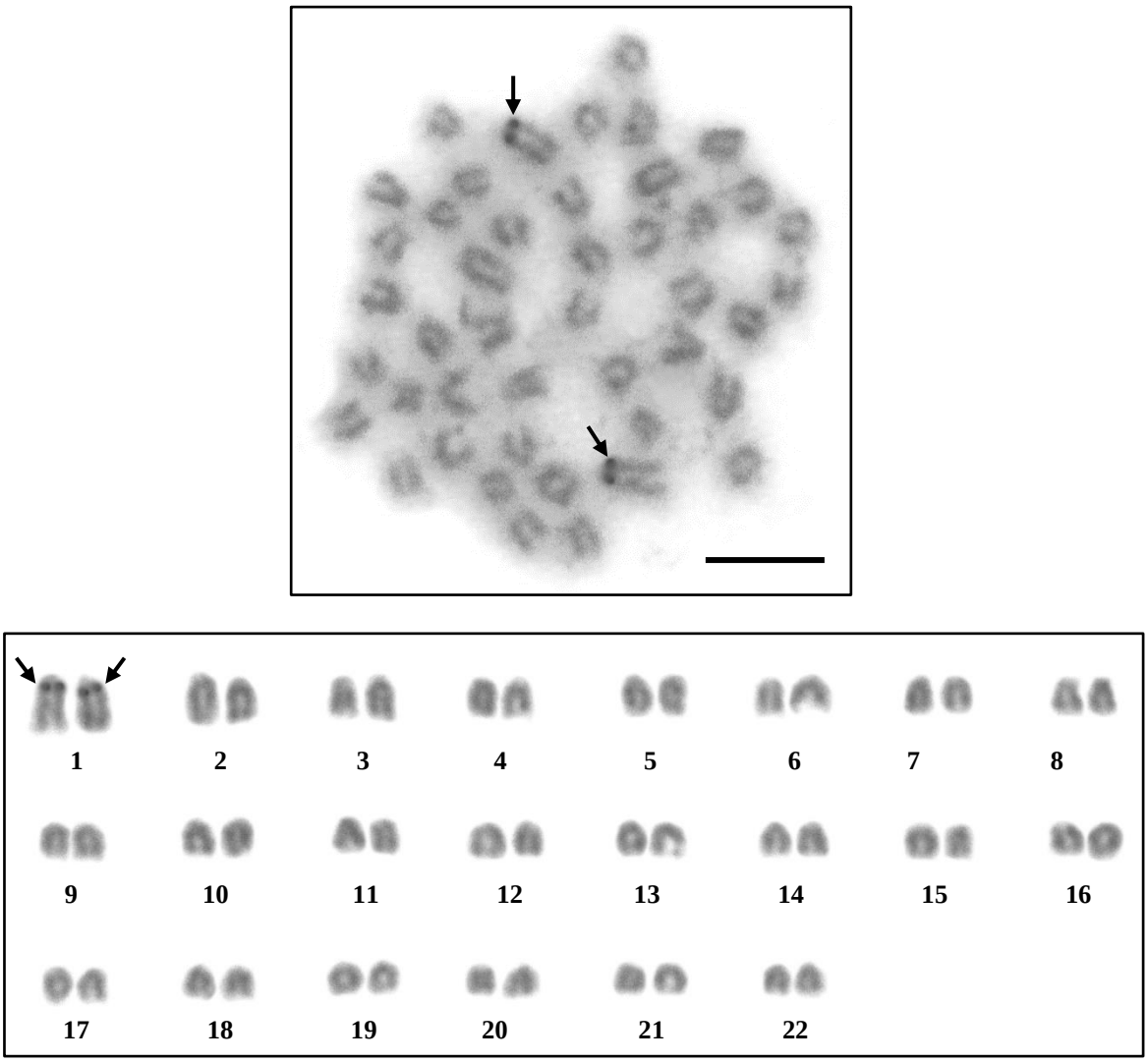
ภาพที่ 2.44 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



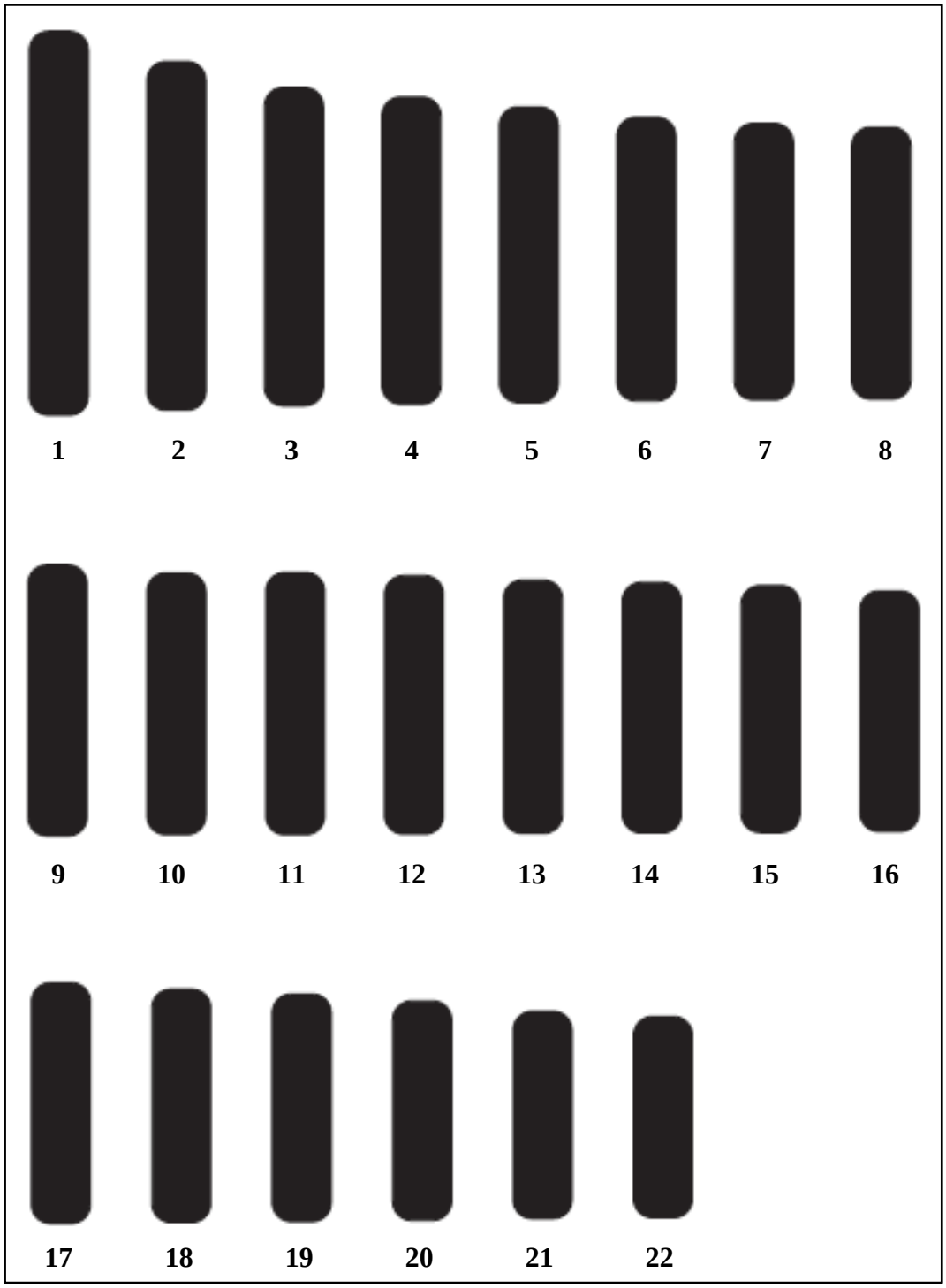
ภาพที่ 2.45 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



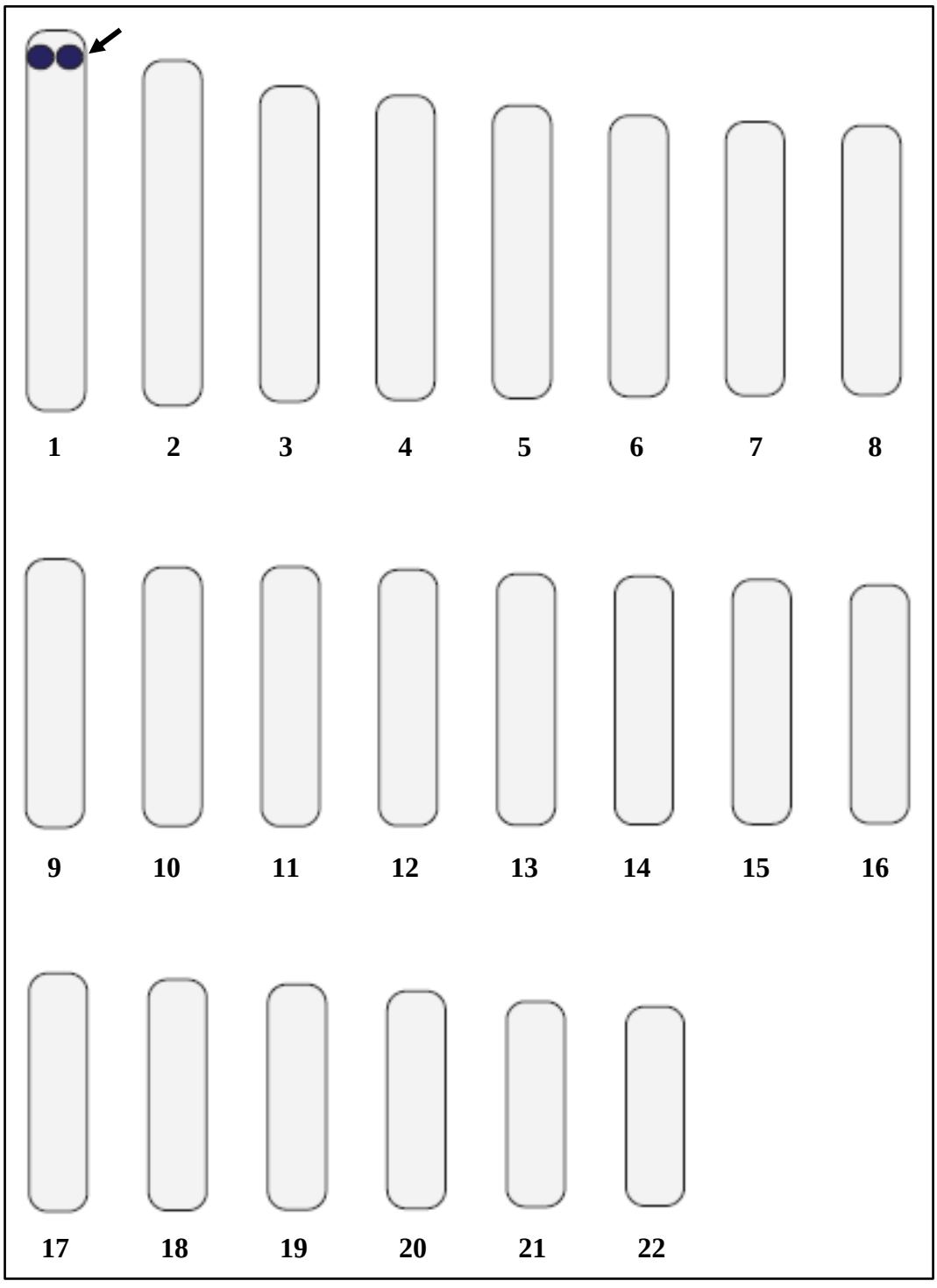
ภาพที่ 2.46 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.47 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.48 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 2.49 อิดิโอแกรมของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์

ตารางที่ 2.8 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 ของปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	**Ls**	**Ll**	**LT**	**RL±SD**	**CI±SD**	**ขนาด**	**ชนิด**
1*	0.000	3.267	3.267	0.066±0.003	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
2	0.000	2.967	2.967	0.06±0.003	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
3	0.000	2.710	2.710	0.054±0.002	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
4	0.000	2.615	2.615	0.052±0.002	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
5	0.000	2.517	2.517	0.051±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
6	0.000	2.413	2.413	0.048±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
7	0.000	2.352	2.352	0.047±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
8	0.000	2.316	2.316	0.046±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
9	0.000	2.306	2.306	0.046±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
10	0.000	2.226	2.226	0.045±0.003	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
11	0.000	2.230	2.230	0.045±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
12	0.000	2.200	2.200	0.044±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
13	0.000	2.157	2.157	0.043±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
14	0.000	2.133	2.133	0.043±0.003	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
15	0.000	2.101	2.101	0.042±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
16	0.000	2.047	2.047	0.041±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
17	0.000	2.047	2.047	0.041±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
18	0.000	1.983	1.983	0.04±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
19	0.000	1.935	1.935	0.039±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
20	0.000	1.867	1.867	0.037±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
21	0.000	1.763	1.763	0.035±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
22	0.000	1.712	1.712	0.034±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก

หมายเหตุ: * โครโมโซมเครื่องหมายที่มีตำแหน่งนอร์ (nucleolar organizer region)

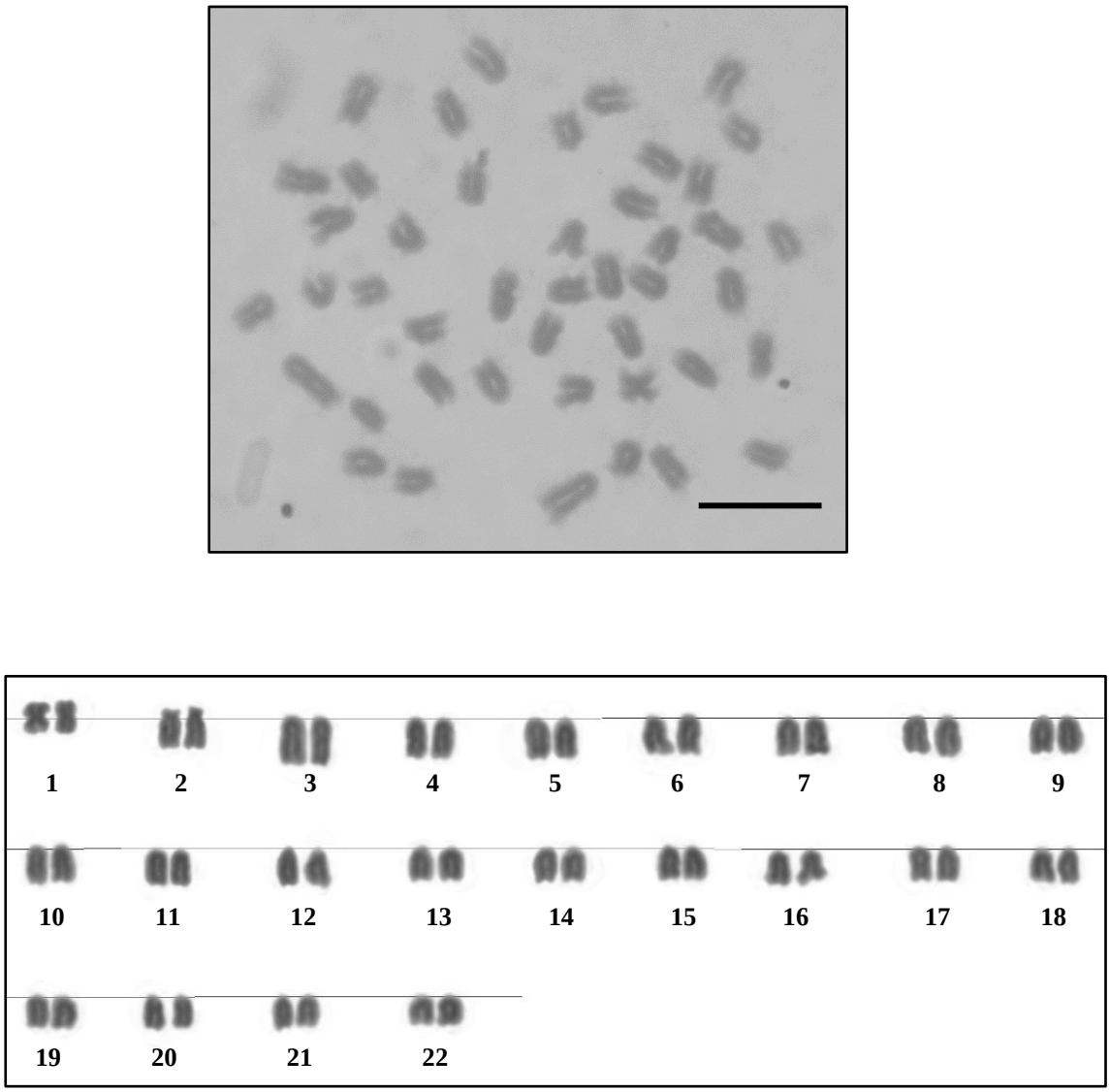
2.2.8 ปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*Valenciennea strigata*)

เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*Valenciennea strigata*) (ภาพที่ 2.50) พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอด์ เท่ากับ 44 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 48 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง เทโลทริกขนาดใหญ่ 14 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดกลาง 26 แท่ง (ภาพที่ 2.51 และ 2.52) มีโครโมโซมเครื่องหมาย ได้แก่ โครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 3 ชนิดเทโลเซนทริก และโครโมโซมคู่เล็กสุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 22 ชนิดเทโลเซนทริก โครโมโซมคู่ที่ใหญ่มากที่สุดมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่เล็กสุดประมาณ 2 เท่า ปลาบู่ทรายก้มขีดฟ้ามีแคริโอไทป์แบบไม่สมมาตร โดยมีโครโมโซม 3 ชนิด คือ ชนิด เมทาเซนทริก อะโครเซนทริก และเทโลเซนทริก ภาพอิดิโอแกรมจากการย้อมสีแบบธรรมดาแสดงไว้ดังภาพที่ 2.53 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ ค่า relative length ค่า centromeric index ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า RL, CI ขนาดและชนิดของโครโมโซมแสดงไว้ดังตารางที่ 2.9 ปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้ามีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

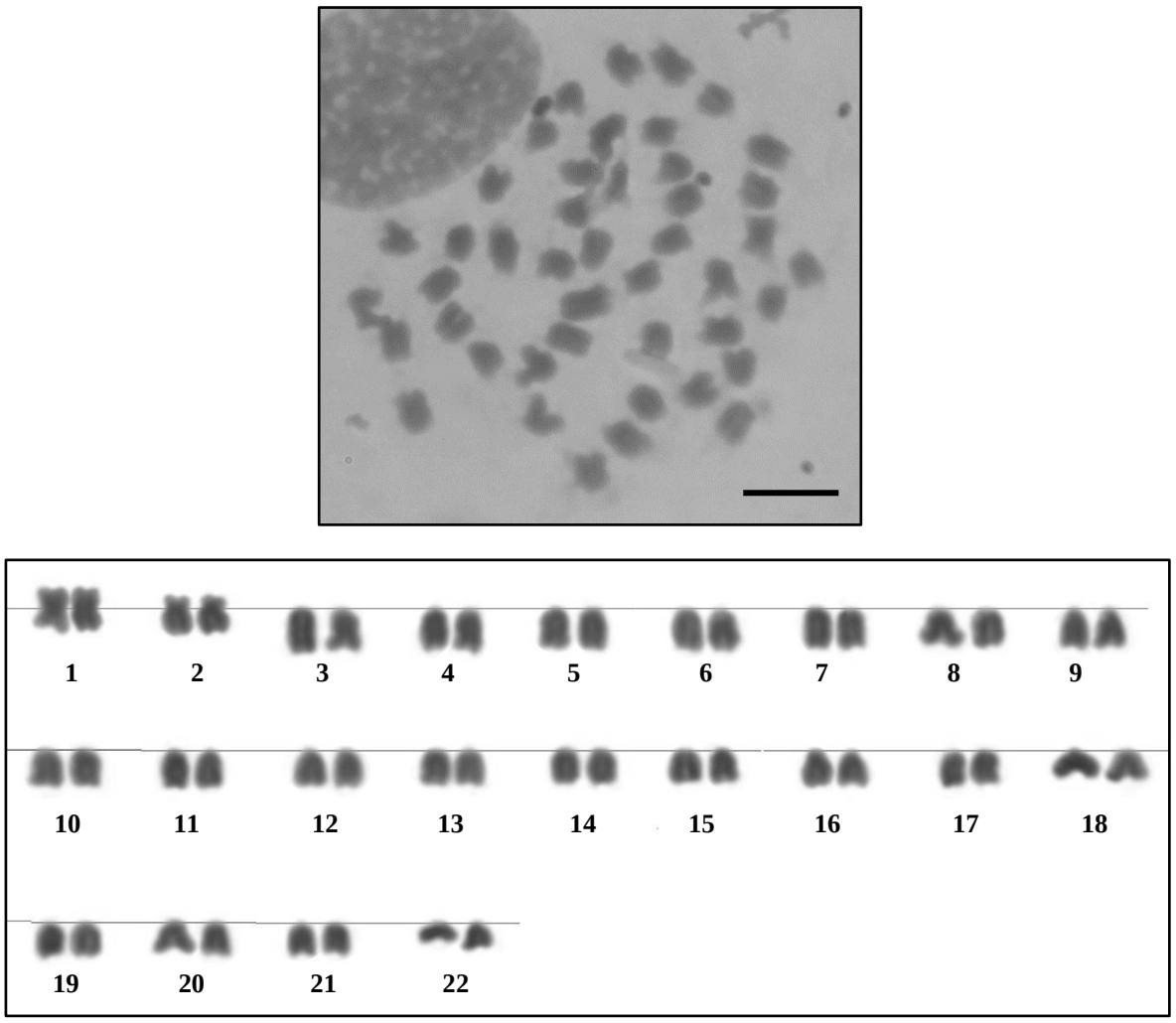
ปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า $2n$ (diploid) 44 = $L^{m}_{2} + L^{a}_{2} + L^{t}_{14} + M^{t}_{26}$

หรือ = 2m + 2a + 40t

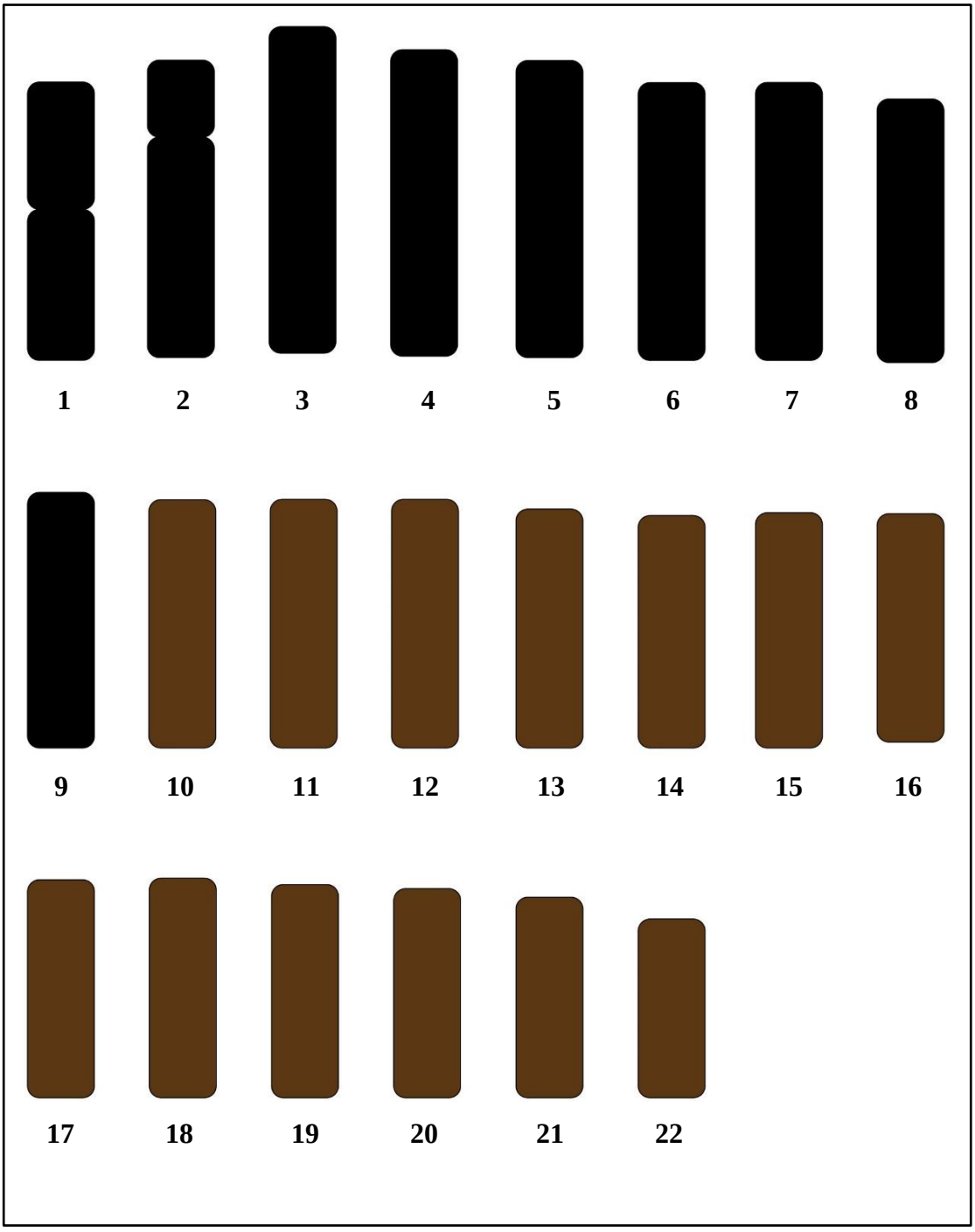
ภาพที่ 2.50 ลักษณะภายนอกของปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*Valenciennea strigata*) สเกลบาร์เท่ากับ 3 เซนติเมตร (ภาพโดย ชนะ เทศคง)



ภาพที่ 2.51 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*Valenciennea strigata*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.52 เมทาเฟสโครโมโซม (ภาพบน) และแคริโอไทป์ (ภาพล่าง) ของปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*Valenciennea strigata*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 2.53 อิดิโอแกรมแสดงชนิดและขนาดของโครโมโซมปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*Valenciennea strigata*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 44 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา

ตารางที่ 2.9 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 ของปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*Valenciennea strigata*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 44 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	**Ls**	**Ll**	**LT**	**RL±SD**	**CI±SD**	**ขนาด**	**ชนิด**
1	1.1691	1.38579	2.55489	0.051±0.006	0.544±0.020	ใหญ่	เมทาเซนทริก
2	0.7069	2.02275	2.72965	0.054±0.003	0.740±0.120	ใหญ่	อะโครเซนทริก
3	0.000	2.99708	2.99708	0.059±0.003	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
4	0.000	2.81347	2.81347	0.056±0.003	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
5	0.000	2.72678	2.72678	0.054±0.003	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
6	0.000	2.55076	2.55076	0.051±0.002	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
7	0.000	2.55192	2.55192	0.051±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
8	0.000	2.41957	2.41957	0.048±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
9	0.000	2.34608	2.34608	0.046±0.001	1.000±0.000	ใหญ่	เทโลเซนทริก
10	0.000	2.27911	2.27911	0.045±0	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
11	0.000	2.28179	2.28179	0.045±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
12	0.000	2.28201	2.28201	0.045±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
13	0.000	2.19264	2.19264	0.043±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
14	0.000	2.13359	2.13359	0.042±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
15	0.000	2.15928	2.15928	0.043±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
16	0.000	2.09588	2.09588	0.041±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
17	0.000	2.00085	2.00085	0.039±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
18	0.000	2.01585	2.01585	0.04±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
19	0.000	1.95791	1.95791	0.039±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
20	0.000	1.9195	1.9195	0.038±0.001	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
21	0.000	1.84112	1.84112	0.036±0.004	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
22	0.000	1.64043	1.64043	0.032±0.004	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก

บทที่ 3

3.1 วิจารณ์ผลการวิจัย

เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ในวงศ์ย่อยปลาบู่ จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ ปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.) ปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*) ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*) ปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*) ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*) ปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*V. muralis*) และปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า จากการตรวจสอบเอกสารพบว่าในปัจจุบันมีปลาทะเลไม่น้อยกว่า 13,000 ชนิด โดยในจำนวนนี้มีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ 1,200 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 9.23 ส่วนใหญ่มีโครโมโซมดิพลอยด์ (2*n*) 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 (4*n*, 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 Jr. *et al*., 2000)

จากการตรวจสอบเอกสารรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้พบว่าปลาในวงศ์ย่อยปลาบู่ (subfamily Gobiinae) มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 30-52 แท่ง โดยมีจำนวนโครโมโซมมากที่สุด 2*n*=50 แท่งในปลา *Acentrogobius pflaumi*, *Gobius niger*, *Gobius niger jozo* และ *Yongeichthys criniger* มีจำนวนโครโมโซมน้อยที่สุด 2n=30 แท่ง ในปลา *Mesogobius batrachocephalus*, *Neogobius fluviatilis fluviatilis* และ *Neogobius melanostomus* (Arai, 2011) สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าปลาบู่ที่ศึกษาทุกชนิดมีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 44-50 แท่ง

ปลาตีน (*Glossogobius giuris*) ปลาตีนมีจำนวนโครโมโซมดิพลอด์ เท่ากับ 46 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 46 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาตีนประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด 46 แท่ง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Masagca and Ordonez (2003) ที่รายงานว่า ปลาตีน (*Glossogobius giuris*) ในประเทศฟิลิปินส์มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 46 แท่ง และเป็นชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด

การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาเพิ่มเติมของแถบสีโครโมโซมโดยเฉพาะแถบสีแบบนอร์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ศึกษาตำแหน่งของยีนสร้างไรโบโซม (ribosomal DNA) บนโครโมโซม สารละลายซิลเวอร์ไนเตรทจะติดสี

เข้มเมื่อยีนบริเวณดังกล่าวทำงาน (active) ตำแหน่งของยีนนี้บนโครโมโซมจะมีความจำเพาะต่อชนิด จึงถือว่าเป็นโครโมโซมเครื่องหมายในปลา (Sharma *et al*., 2002) จากผลการศึกษาพบว่าปลาบู่ทุกชนิดมีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ (2 ตำแหน่ง) ซึ่งสอดคล้องกับปลาส่วนใหญ่

ความผันแปรของโครโมโซมทั้งภายในชนิด และประชากรในปลาบางชนิดที่กล่าวมาแล้วนั้น เกิดได้จากกระบวนการเชื่อมรวมแบบแทนเดม (tandem fusion) เชื่อมรวมกันตรงตำแหน่งเซนโทรเมียร์ (centric fusion) การหักแล้วต่อสลับแบบมีเซนโทรเมียร์ร่วมด้วย (pericentric inversion) และการขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซม (deletion) ในปลาบางชนิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมเป็นผลมาจากการเชื่อมรวมแบบโรเบิร์ตโซเนียน (Robertsonian translocation) หลาย ๆ ตำแหน่ง นอกจากนี้ความผันแปรของจำนวนโครโมโซมในปลา ยังพบว่ามีสาเหตุมาจากการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม (polyploid) (Galetti Jr. *et al*., 2000)

บรรพบุรุษของปลากระดูกแข็งมีสมมติฐานว่ามีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 48 แท่ง และเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก (monoarm, แขนเดียว) ทั้งหมด (NF=48) ซึ่งลักษณะแคริโอไทป์ดังกล่าวยังสามารถพบได้ในปลาทะเลหลายชนิด โดยเฉพาะในอันดับปลากะพง (Perciformes) ซึ่งเป็นอันดับที่มีความหลากชนิดพันธุ์มากที่สุด ในการพิจารณาถึงการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมจะพิจารณาจากโครโมโซม ดิพลอยด์ และชนิดของโครโมโซมในปลาชนิดต่าง ๆ ในแต่ละวงศ์ ในกรณีที่มีโครโมโซมเป็นชนิดเทโล เซนทริกทั้งหมด ถือว่าเป็นกลุ่มที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงและจัดว่าเป็นแคริโอไทป์แบบโบราณ (primitive stage) ดังที่พบได้ในวงศ์ปลาผีเสื้อ และวงศ์ปลาสร้อยนกเขาทะเล (Galetti Jr. *et al*., 2000) ที่พบว่าปลาทั้งสองวงศ์นี้มีการแพร่กระจายตัวเป็นวงกว้างตามแนวปะการัง ที่จะส่งผลให้มีสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ระหว่างประชากรต่ำ ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายของยีน (gene flow) ได้สูง ซึ่งแตกต่างจากกรณีของปลาน้ำจืด เนื่องจากลักษณะทางภูมิศาสตร์ของแหล่งน้ำมีลักษณะที่ถูกแบ่งแยกกันทางภูมิศาสตร์ไม่ได้เป็นผืนเดียวกันเหมือนท้องทะเล ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายของยีนได้ต่ำ ซึ่งเป็นไปตามโมเดล (model) พันธุศาสตร์ประชากรดั้งเดิมตามทฤษฎีของแลนเด (Lande) ค.ศ. 1979 ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมากระหว่างการไม่มีสิ่งขวางกั้นทางภูมิศาสตร์จากสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำจืด และการเคลื่อนที่ในระดับต่ำของกลุ่มปลาน้ำจืด ที่จะส่งผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม ในทางตรงกันข้ามสำหรับกลุ่มปลาที่ไม่ถูกจำกัดการแพร่กระจายตัว ร่วมกับการที่มีสภาพแวดล้อมทางน้ำจืดที่ไม่มีความแตกต่างกันมาก จะพบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมต่ำมาก ซึ่งรวมถึงการพัฒนาเปลี่ยนแปลงในระดับประชากรด้วยนอก จากนี้ยังพบว่าแคริโอไทป์เดิมที่มีโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากมีการรักษาความสมดุลในระดับของเซลล์ โดยจะมีเปลี่ยนแปลงได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งพบได้ค่อนข้างน้อยเฉพาะในปลาน้ำจืดบางกลุ่มเท่านั้น

จากสมมติฐานดังกล่าวข้างต้นส่งผลทำให้ปลาน้ำจืด มีแคริโอไทป์ที่หลากหลายมากกว่าปลาทะเล (น้ำทะเลส่วนใหญ่เป็นผืนเดียวกันทั่วโลก) แต่เมื่อมีการพิจารณาลงไปในระดับชนิดพันธุ์ของปลาแต่ละวงศ์

พบว่าจะมีความผันแปรของจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันดังที่กล่าวมาแล้ว จากการศึกษาพบว่ากลไกการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม ที่ทำให้เกิดความหลากหลายของโครโมโซมปลาทะเลจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่สำคัญ 3 กระบวนการ ได้แก่ 1) การหักแล้วต่อสลับแบบมีเซนโทรเมียร์ร่วมด้วย 2) การเชื่อมรวมกันของโครโมโซม และ 3) การหักของชิ้นส่วนของโครโมโซม วงศ์ปลาน้ำจืดที่มีวิวัฒนาการเปลี่ยนแปลงทางโครโมโซมนั้น อาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการใดกระบวนการหนึ่ง หรือทุกกระบวนการก็เป็นไปได้ ซึ่งทำให้มีลักษณะเฉพาะในแต่ละวงศ์ที่แตกต่างกันออกไป (Ojima and Kashiwagi, 1981; Ojima, 1983; Galetti Jr. *et al*., 2000)

บทที่ 4

4.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของวงศ์ย่อยปลาบู่ จำนวน 8 ชนิด พบว่าวงศ์ย่อยปลาบู่แต่ละชนิดมีมาตรฐานลักษณะแคริโอไทป์ที่เป็นลักษณะประจำพันธุ์ ดังนี้

ปลาบู่กุ้งยักษ์ (*Amblyeleotris* sp.)

ปลาบู่กุ้งยักษ์มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 46 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 82 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และ เพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่กุ้งยักษ์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 10 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดกลาง 22 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง และอะโครเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 16 ปลาบู่กุ้งยักษ์มีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

ปลาบู่กุ้งยักษ์ 2*n* (diploid) 46 = $L^{sm}_{2} + L^{a}_{10} + L^{t}_{6} + M^{a}_{22} + M^{t}_{4} + S^{a}_{2}$

หรือ = 2sm + 34a + 10t

ปลาบู่หัวโต (*Acentrogobius viridipunctatus*)

ปลาบู่หัวโต มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 50 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 88 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่หัวโตประกอบด้วยโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 36 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดล็ก 2 แท่ง จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 1 ปลาบู่หัวโต มีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

ปลาบู่ หัวโต 2*n* (diploid) 50 = $L^{a}_{36} + L^{t}_{6} + M^{sm}_{2} + M^{t}_{4} + S^{a}_{2}$

หรือ = 2sm + 36a + 12t

ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด (*Aulopareia janetae*)

ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 50 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 100 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่แก้มตกสะเก็ด ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง ซับเมทาทริกขนาดใหญ่ 10

แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 26แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง และเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 6 ปลาบู่ แก้มตกสะเก็ด มีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

ปลาบู่แก้มตกสะเก็ด *2n* (diploid) 50 = $L^{m}_{6} + L^{sm}_{10} + L^{a}_{26} + M^{m}_{4} + M^{sm}_{2} + S^{m}_{2}$

หรือ = 12sm + 12sm + 26a

ปลาบู่หินดำ (*Butis amboinensis*)

ปลาบู่หินดำมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 46 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 46 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่หินดำประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลทริกขนาดใหญ่ 24 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 20 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นบริเวณใกล้เทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 17 ปลาบู่หินดำ มีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

ปลาบู่หินดำ *2n* (diploid) 46 = $L^{t}_{24} + M^{t}_{20} + S^{t}_{2}$

หรือ = 46t

ปลาตีน (*Glossogobius giuris*)

ปลาตีนมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 46 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 46 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาตีนประกอบด้วยโครโมโซมชนิด เทโลทริกขนาดใหญ่ 26 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 18 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 2 ปลาตีนมีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

ปลาตีน *2n* (diploid) 46 = $L^{t}_{26} + M^{t}_{18} + S^{t}_{2}$

หรือ = 46t

ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า (*Valenciennea sexguttata*)

ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 44 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 46 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้าประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลทริกขนาดใหญ่ 12 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง

และเทโลเซนทริกขนาดกลาง 30 แท่ง จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 18 ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้ามีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

ปลาบู่ทรายแก้มจุดฟ้า *2n* (diploid) 46 = L^{t}_{12}+ M^{m}_{2} + M^{t}_{30}

หรือ = 2m + 42t

ปลาบู่ทรายเส้นชมพู (*Valenciennea muralis*)

ปลาบู่ทรายเส้นชมพูมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 44 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 44 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่ทรายเส้นชมพู ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลทริกขนาดใหญ่ 10 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดกลาง 34 แท่ง จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง อยู่บนแขนสั้นใกล้บริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 1 ปลาบู่ทรายเส้นชมพูมีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

ปลาบู่ทรายเส้นชมพู *2n* (diploid) 44 = L^{t}_{10} + M^{t}_{34}

หรือ = 44t

ปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า (*Valenciennea strigata*)

ปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 44 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 48 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย โครโมโซมของปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง เทโลทริกขนาดใหญ่ 14 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดกลาง 26 แท่ง ปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้ามีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

ปลาบู่ทรายแก้มขีดฟ้า *2n* (diploid) 44 = L^{m}_{2} + L^{a}_{2} + L^{t}_{14} + M^{t}_{26}

หรือ = 2m + 2a + 40t

บทที่ 5

5.1 ผลผลิต

กำลังอยู่ในช่วงการเขียนงานตีพิมพ์ส่งวารสารนานาชาติ

เอกสารอ้างอิง

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

ชวลิต วิทยานนท์. 2548. **คู่มือปลาน้ำจืด.** พิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์สารคดี, กรุงเทพฯ.

ภาสกร แสนจันแดง. 2557. **สารานุกรมปลาน้ำจืดของไทย.** หจก.โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น.

วีระยุทธ สุภิวงค์. 2557. ความหลากหลายของโครโมโซมปลาหนังน้ำจืดในประเทศไทย. **วารสารวิทยาศาสตร์ คชสาส์น** 36(1): 50-65.

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

อลงกลด แทนออมทอง. 2554. **พันธุศาสตร์ของเซลล์.** โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

Alvarez, M. C., Otis, J., Amores, A. and Guise, K. 1991. Short-term culture technique for obtaining chromosomes in marine and freshwater fish. **Journal of Fish Biology** 39: 817-824.

Agorreta, A., San Mauro, D., Schliewen, U., Van Tassell, J. L., Kovačić, M., Zardoya, R. and Rüber, L. 2013. Molecular phylogenetics of Gobioidei and phylogenetic placement of European gobies. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 69(3): 619-633.

Agorreta, A. and Rüber, L. 2012. A standardized reanalysis of molecular phylogenetic hypotheses of Gobioidei. **Systematics and Biodiversity** 10(3): 375-390.

Arai, R. 2011. **Fish Karyotypes: A Check List**. Springer Japan, Tokyo.

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

Denton, T. E. 1973. **Fish Chromosome Methodology**. C. C. Thomas, Springfield, Ill.

Egozcue, J. 1971. **Te´cnicas en citogene´tica**. Editorial Spaxs, Barcelona.

Eschmeyer, W. N. 2016. **Catalog of Fishes: Genera, Species, References**. http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp. Electronic version accessed 28 June 2019.

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.

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

Howell, W. M. and Black, D. A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer r egions with a protective colloidal developer: A 1-step method. **Experientia** 36: 1014-1015.

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

Gold, J. 1974. A fast and easy method for chromosome karyotyping in adult teleosts. **Progressive Fish Culturist** 36: 169-171.

Gold, J. R., Whitlock, C. W., Karel, W. J. and Barlow, J. A. 1979. Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). VI. Karyotypes of thirteen species in the genus Notropis. **Cytologia** 44: 457-466.

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.

Klinkhardt, M., Tesche, M. and Greven, H. 1995. **Database of Fish Chromosomes**. 1st edition Westarp Wissenschaften, Magdeburg.

Lagler, K., Bardach, J., Miller, R. and Passino, D. 1977. **Ichthyology**. John Wiley & Sons, Inc., New York, 505 pp.

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

Maddock, M. B., Schwartz, F. J. 1996. Elasmobranch cytogenetics: methods and sex chromosomes. **Bulletin of Marine Science** 58 (1): 147-155.

Masagca, I. J. and Ordonez, J. A. 2003. Karyomorphology of the Philippine rock goby, *Glossogobius giuris* (Gobiidae) from Lake Taal and River of Cavite, Luzon Island. **Biotropia** 21: 11-18.

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. 1982. Methods in fish cytogenetics. **Nucleus** 25: 1-7.

Ojima, Y. 1983. Fish cytogenetics. In: **Chromosomes in evolution of eukaryotic groups**.

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.

Ozouf-Costaz, C. and Foresti, F. 1992. Fish cytogenetic research: advances, applications and perspectives. **Netherlands Journal of Zoology** 42(2/3): 277-290.

Rivlin, K., Rachlin, J. W. and Dale, G. 1985. A simple method for the preparation of fish chromosomes applicable to field work, teaching and banding. **Journal of Fish Biology** 26: 267-272.

Rooney, D. E. 2001. **Human Cytogenetics: Constutitional Analysis: A Practical Approach.** Oxford University Press, London.

Sharma, A. K. and Sharma, A. (Eds.), Vol. I. pp. 111-145. CRC press, Florida.

Sharma, O. P., Tripathi, N. K. and Sharma, K. K. 2002. A review of chromosome banding in fishes. In: Sobti, R. C. (ed.). **Some Aspects of Chromosome Structure and Functions**. New Narosa Publishing House, Delhi.

Schultz, R. 1980. The role of polyploidy in the evolution of fishes. In: Lewis, W. (ed.) **Polyploidy: Biological Relevance**. Plenum Press, New York.

Smith, E. and Gregory, R. 2009. Patterns on genome size diversity in the ray-finned fishes. **Hydrobiologia** 625: 1-25.

Sola, L., Cataudella, S. and Capanna, E. 1981. New developments in vertebrate cytotaxonomy. III. Karyology of bony fishes: a review. **Genetica** 54: 285-328.

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

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

<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

-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 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