BRT 542085

การศึกษาการิโอไทป์ของปลาค้อ (สกุล *Schistura*) จากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิง จังหวัดเชียงใหม่

เกรียงไกร ธีตะพันธุ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตุลาคม 2544

An60

- 3 S.A. 2544

โครงการ BRT ชั้น 15 อาคารมหานครยิบซั่ม
539/2 ถนนศรีอยุธยา เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

การศึกษาคาริโอไทป์ของปลาค้อ (สกุล *Schistura*) จากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิงในจังหวัดเชียงใหม่

เกรียงไกร สีตะพันธุ์

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตุลาคม 2544

การศึกษาคาริโอไทป์ของปลาค้อ (สกุล *Schistura*) จากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิงในจังหวัดเชียงใหม่

เกรียงไกร สีตะพันธุ์

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปริศนา จริยวิทยาวัฒน์

..... กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.ทิพย์มณี ภะรตะศิลปิน

..... กรรมการ
อาจารย์อภินันท์ สุวรรณรักษ์

ตุลาคม 2544

© ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปริศนา จริยวิทยาวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาทำการวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ทิพย์มณี ภะรตะศิลปิน และอาจารย์อภินันท์ สุวรรณรักษ์ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำเป็นอย่างดีเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ดาวรุ่ง กังวานพงศ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อำนาจ มีเวที และ คุณวรภา หีบจันทร์ตรี ที่ช่วยให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการย้อมสีโครโมโซมแบบพิเศษ จนงานวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณสมชัย สุวัฒนคุปต์ คุณธนู มะระยงค์ และคุณกฤติกา ณ เชียงใหม่ ที่ให้ความสะดวกเกี่ยวกับการใช้งานอุปกรณ์ด้านการถ่ายรูปตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา

ขอขอบคุณ คุณสมยศ ศิลาล้อม คุณธรรมวัตร แก้วตาปี คุณนฤมล นะธรรมโม ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างปลาตลอดเวลาจนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ ขอบคุณคุณพุฒิพงศ์ นวกิจบำรุง ที่อนุเคราะห์ห้องมืดและให้ความช่วยเหลือด้านการล้างอัดรูปโครโมโซมด้วยดีตลอดเวลา ขอบคุณเจิมขวัญ ศรีสวัสดิ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องรูปภาพ และข้อมูลแผนที่จังหวัดเชียงใหม่ด้วยดีตลอดเวลา ขอขอบคุณพี่แตงอ่อน พรหมมิ พี่ญาณนันท์ สุนทรกิจ พี่พงศักดิ์ เหล่าดี คุณเพ็ญแข ธรรมเสนานุภาพ และสมาชิกห้องปฏิบัติการเซลล์พันธุศาสตร์ทุกคน ตลอดจนบุคคลซึ่งผู้เขียนไม่ได้กล่าวถึงที่ให้ความช่วยเหลือทั้งแรงกายและแรงใจจนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องทุกคนที่ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจ จนวิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT 524085

เกรียงไกร สีตะพันธุ์

BRT 542085

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาคาริโอไทป์ของปลาค้อ (สกุล *Schistura*) จากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิงในจังหวัดเชียงใหม่

ชื่อผู้เขียน นายเกรียงไกร สีตะพันธุ์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปริศนา จริยวิทยาวัฒน์	ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.ทิพย์มณี ภะรตะศิลปิน	กรรมการ
อาจารย์อภินันท์ สุวรรณรักษ์	กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาคาริโอไทป์ของปลาค้อสกุล *Schistura* 11 ชนิดจากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิงทั้งหมด 11 ลุ่มน้ำสาขา ในจังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงเดือนสิงหาคม 2542 ถึงเดือนมกราคม 2544 ซึ่งได้แก่ *Schistura kengtungensis*, *S.* cf. *menanensis*, *S. nicholsi*, *S. obeini*, *S. poculi*, *S.* cf. *robertsi* 1, *S.* cf. *robertsi* 2, *S. spilota*, *S.* cf. *spilota*, *S. waltoni* และ *Schistura* sp. พบว่า *S. kengtungensis* มีจำนวนโครโมโซม 2n=52 ส่วนที่เหลืออีก 10 ชนิดมีจำนวนโครโมโซม 2n=50 ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มโครโมโซมชนิดต่างๆตามลำดับดังนี้คือ 6m+10sm+8a+28t, 8m+12sm+16a+14t, 6m+16sm+8a+20t, 12m+10sm+4a+24t, 8m+8sm+12a+22t, 4m+8sm+8a+30t, 6m+12sm+10a+22t, 12m+8sm+4a+26t, 6m+4sm+12a+28t, 8m+12sm+14a+16t และ 6m+8sm+8a+28t

จากการย้อมสีแบบ C-banding พบว่าโครโมโซมส่วนใหญ่ของปลาค้อจะติดสีบริเวณ centromere แต่มีโครโมโซมบางคู่ของปลาค้อบางชนิดปรากฏแถบสีในส่วนอื่นของโครโมโซม ได้แก่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมทั้งแขนของ *S. obeini*, *S. nicholsi*, *S. spilota* และ *S.* cf. *spilota* บนบางส่วนของแขนข้างยาวของโครโมโซมของ *S. obeini*, *S.* cf. *robertsi* 1, *S. spilota*, *S.* cf. *spilota* และ *Schistura* sp. และบนแขนข้างสั้นของโครโมโซมบางแท่งในปลาค้อทุกชนิด

การย้อมที่ Nucleolus Organizer Regions พบ NOR banding ปรากฏที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบต่างๆคือ metacentric ของ *S. poculi* แบบ submetacentric ของ *S.* cf. *menanensis*,

S. nicholsi, *S. obeini*, *S. spilota* และ *S. waltoni* แบบ acrocentric ของ *S.* cf. *spilota*, *S.* cf. *robertsi* 1, *S.* cf. *robertsi* 2 และ *Schistura* sp. และพบที่ปลายแขนของโครโมโซมแบบ telocentric ของ *S. kengtungensis* ส่วนการย้อมสีแบบ G-banding พบว่าติดบนโครโมโซมเกือบทุกคู่ในรูปแบบเจาะจง วิธีนี้ช่วยให้การจับคู่โครโมโซมของปลาค้อแต่ละชนิดทำได้ง่ายขึ้น ในขณะที่การย้อมสีแบบ Q-banding พบแถบสว่างชัดเจนเฉพาะส่วนปลายของโครโมโซมแบบ telocentric คู่ที่ 3 ในปลา *S. spilota* เพียงชนิดเดียว ซึ่งไม่พบในปลาค้ออีก 10 ชนิดที่ทำการศึกษาเลย

จากการจัดกลุ่มปลาสกุล *Schistura* โดยใช้ข้อมูลด้านเซลล์พันธุศาสตร์ด้วย hierarchical cluster analysis สามารถแบ่งกลุ่มปลาออกได้ 6 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *S.* cf. *robertsi* 1, *Schistura* sp. และ *S.* cf. *robertsi* 2 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *S.* cf. *menanensis* และ *S. waltoni* กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *S. poculi* กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *S. spilota* และ *S.* cf. *spilota* กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *S. nicholsi* และ *S. obeini* และกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย *S. kengtungensis* ผลที่ได้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะภายนอกพบว่ากลุ่มที่ 3, 4 และ 5 ให้ผลแบบเดียวกัน แต่สำหรับ 3 กลุ่มที่เหลือมีความแตกต่างกันเล็กน้อย

Thesis Title Karyotype Study of the Stone Loach Fish (Genus *Schistura*) from Tributary of Ping River, Chiang Mai Province

Author Mr. Kriengkrai Seetapan

M.S. Biology

Examining Committee

Assistant Prof. Prisana Chariyavithayawat	Chairperson
Associate Prof. Dr. Thipmani Paratasilpin	Member
Lecturer Apinun Suvarnaraksha	Member

ABSTRACT

Karyotypes of 11 species of stone loach fish genus *Schistura* from 11 tributaries of the Ping River, Chiang Mai Province, were studied during August, 1999 to January, 2001. They were *Schistura kengtungensis*, *S.* cf. *menanensis*, *S. nicholsi*, *S. obeini*, *S. poculi*, *S.* cf. *robertsi* 1, *S.* cf. *robertsi* 2, *S. spilota*, *S.* cf. *spilota*, *S. waltoni* and *Schistura* sp. The somatic chromosome number of *S. kengtungensis* was 52 (2n=52) while those of the remaining 10 species were 50 (2n=50). The karyotypes of the forementioned 11 species were 6m+10sm+8a+28t, 8m+12sm+16a+14t, 6m+16sm+8a+20t, 12m+10sm+4a+24t, 8m+8sm+12a+22t, 4m+8sm+8a+30t, 6m+12sm+10a+22t, 12m+8sm+4a+26t, 6m+4sm+12a+28t, 8m+12sm+14a+16t, and 6m+8sm+8a+28t respectively.

C-banding observation indicated that most of the stone loach fish chromosomes contained C-banding at the centromeric region. Only a few the *Schistura* chromosomes contained C-banding at other regions. The whole long arm of *S. obeini*, *S. nicholsi*, *S. spilota*, and *S.* cf. *spilota* chromosomes were C-banding positive. *S. obeini*, *S.* cf. *robertsi* 1, *S. spilota*, *S.* cf. *spilota*, and *Schistura* sp. showed C-banding only within the long arms. C-banding in the whole short arm could be seen in all 11 species.

Nucleolus Organizer Region staining exhibited NOR banding located on the short arm of various types of chromosome pair which were metacentric of *S. poculi*, submetacentric of *S.* cf. *menanensis*, *S. nicholsi*, *S. obeini*, *S. spilota* and *S. waltoni*, and acrocentric of *S.* cf. *spilota*, *S.* cf. *robertsi* 1, *S.* cf. *robertsi* 2 and *Schistura* sp. Telocentric NOR banding was only found in *S. kengtungensis*. G-banding investigation showed specific pattern on most of the homologous pairs which helped identifying homology of chromosomes of each the stone loach fish species. Q-banding detected strikingly fluorescent band at the terminal position of telocentric chromosome pair number 3 of *S. spilota* only and none in the remaining 10 species.

The fish genus *Schistura* were divided into 6 groups by using cytogenetic data employing hierarchical cluster analysis. They were group 1 *S.* cf. *robertsi* 1, *Schistura* sp. and *S.* cf. *robertsi* 2, group 2 *S.* cf. *menanensis* and *S. waltoni*, group 3 *S. poculi*, group 4 *S. spilota* and *S.* cf. *spilota*, group 5 *S. nicholsi* and *S. obeini* and group 6 *S. kengtungensis*. These groupings when compared with those using morphological data were similar in species composition for group 3, 4 and 5 but slightly different for the remaining 3 groups.

สารบาญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบาญตาราง	ฌ
สารบาญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำและวัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการศึกษา	13
บทที่ 4 ผลการศึกษา	22
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา	85
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษา	91
บรรณานุกรม	94
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	100
ภาคผนวก ข	114
ภาคผนวก ค	118
ประวัติผู้เขียน	122

สารบาญตาราง

ตาราง	หน้า
1 จุดเก็บตัวอย่างปลาค้อทั้งหมด 11 ลุ่มน้ำสาขา	13
2 การแยกชนิดโครโมโซมปลาค้อโดยใช้ค่า Centromeric index (CI)	21
3 ชนิด และแหล่งที่พบปลาค้อที่ใช้ในการศึกษาคาริโอไทป์	22
4 ผลการวิเคราะห์จำนวนโครโมโซมของปลาค้อที่ตรวจพบจากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิงในระหว่างเดือนสิงหาคม 2542 ถึงเดือนมกราคม 2544	24
5 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura waltoni* จำนวน 10 เซลล์	29
6 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura kengtungensis* จำนวน 10 เซลล์	34
7 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura* cf. *menanensis* จำนวน 10 เซลล์	39
8 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura nicholsi* จำนวน 10 เซลล์	44
9 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura obeini* จำนวน 10 เซลล์	49
10 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura* cf. *robertsi* 1 จำนวน 10 เซลล์	54
11 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura* cf. *robertsi* 2 จำนวน 10 เซลล์	59
12 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura* sp. จำนวน 10 เซลล์	64
13 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura spilota* จำนวน 10 เซลล์	69
14 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura* cf. *spilota* จำนวน 10 เซลล์	74

สารบาญตาราง

ตาราง	หน้า
15 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura poculi* จำนวน 10 เซลล์	79
16 เปรียบเทียบการจัดกลุ่มความใกล้ชิดของปลาค้อ	88
17 คาริโอไทป์ของปลาค้อสกุล *Schistura* ที่พบจากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิง	91
18 ตำแหน่งการติดสี C-band บนโครโมโซมปลาค้อ 11 ชนิด	92
19 ตำแหน่งการติดสีแบบ NOR band บนโครโมโซมแต่ละคู่ในปลาค้อ 11 ชนิด	93

สารบาญภาพ

รูป	หน้า
1 ลักษณะปากของปลากลุ่ม nemacheiline	4
2 ลักษณะรูปร่างของโครโมโซมแบบต่างๆ ตามตำแหน่งของ centromere	6
3 สูตรโครงสร้างของโคลชิซิน	7
4 จุดเก็บตัวอย่างปลาค้อจากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิงในจังหวัดเชียงใหม่	16
5 ลักษณะลุ่มน้ำสาขาบางจุดที่ทำการเก็บตัวอย่างปลาค้อ	17
6 การวิเคราะห์การจัดกลุ่มปลาค้อ 11 ชนิด โดยใช้ลักษณะภายนอก ด้วยโปรแกรม SPSS วิธี hierarchical cluster analysis	23
7 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura waltoni* ย้อมสีแบบ Giemsa stained	26
8 คาริโอไทป์ของ *Schistura waltoni* ซึ่งประกอบด้วย 8m+12sm+14a+16t (2n=50)	26
9 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura waltoni*	27
10 คาริโอไทป์ของ *Schistura waltoni* ย้อมสีแบบพิเศษ	28
11 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura kengtungensis* ย้อมสีแบบ Giemsa stained	31
12 คาริโอไทป์ของ *Schistura kengtungensis* ซึ่งประกอบด้วย 6m+10sm+8a+28t (2n=52)	31
13 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura kengtungensis*	32
14 คาริโอไทป์ของ *Schistura kengtungensis* ย้อมสีแบบพิเศษ	33
15 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *menanensis* ย้อมสีแบบ Giemsa stained	36
16 คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *menanensis* ซึ่งประกอบด้วย 8m+12sm+16a+14t (2n=50)	36
17 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *menanensis*	37
18 คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *menanensis* ย้อมสีแบบพิเศษ	38
19 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura nicholsi* ย้อมสีแบบ Giemsa stained	41
20 คาริโอไทป์ของ *Schistura nicholsi* ซึ่งประกอบด้วย 6m+16sm+8a+20t (2n=50)	41
21 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura nicholsi*	42

สารบาญภาพ

รูป		หน้า
22	คาริโอไทป์ของ *Schistura nicholsi* ย้อมสีแบบพิเศษ	43
23	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura obeini* ย้อมสีแบบ Giemsa stained	46
24	คาริโอไทป์ของ *Schistura obeini* ซึ่งประกอบด้วย 12m+10sm+4a+24t (2n=50)	46
25	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura obeini*	47
26	คาริโอไทป์ของ *Schistura obeini* ย้อมสีแบบพิเศษ	48
27	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *robertsi* 1 ย้อมสีแบบ Giemsa stained	51
28	คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *robertsi* 1 ซึ่งประกอบด้วย 4m+8sm+8a+30t (2n=50)	51
29	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *robertsi* 1	52
30	คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *robertsi* 1 ย้อมสีแบบพิเศษ	53
31	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *robertsi* 2 ย้อมสีแบบ Giemsa stained	56
32	คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *robertsi* 2 ซึ่งประกอบด้วย 6m+12sm+10a+22t (2n=50)	56
33	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *robertsi* 2	57
34	คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *robertsi* 2 ย้อมสีแบบพิเศษ	58
35	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* sp. ย้อมสีแบบ Giemsa stained	61
36	คาริโอไทป์ของ *Schistura* sp. ซึ่งประกอบด้วย 6m+8sm+8a+28t (2n=50)	61
37	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* sp.	62
38	คาริโอไทป์ของ *Schistura* sp. ย้อมสีแบบพิเศษ	63
39	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura spilota* ย้อมสีแบบ Giemsa stained	66
40	คาริโอไทป์ของ *Schistura spilota* ซึ่งประกอบด้วย 12m+8sm+4a+26t (2n=50)	66
41	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura spilota*	67
42	คาริโอไทป์ของ *Schistura spilota* ย้อมสีแบบพิเศษ	58
43	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *spilota* ย้อมสีแบบ Giemsa stained	71

สารบาญภาพ

รูป		หน้า
44	คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *spilota* ซึ่งประกอบด้วย 6m+4sm+12a+28t (2n=50)	71
45	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *spilota*	72
46	คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *spilota* ย้อมสีแบบพิเศษ	73
47	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura poculi* ย้อมสีแบบ Giemsa stained	76
48	คาริโอไทป์ของ *Schistura poculi* ซึ่งประกอบด้วย 8m+8sm+12a+22t (2n=50)	76
49	โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura poculi*	77
50	คาริโอไทป์ของ *Schistura poculi* ย้อมสีแบบพิเศษ	78
51	การวิเคราะห์การจัดกลุ่มปลาค้อ 11 ชนิด ด้วยโปรแกรม SPSS วิธี hierarchical cluster analysis	80
52	โครโมโซมของปลาค้อ 3 ชนิด ย้อมด้วยวิธี C-banding	80
53	โครโมโซมของปลาค้อ 3 ชนิด ย้อมด้วยวิธี NOR banding	81
54	โครโมโซมคู่ที่ 3, 5, 6 และ 7 ของ *S. waltoni* (A) และโครโมโซมคู่ที่ 3, 4, 6 และ 8 ของ *S.* cf. *menanensis* (B) ย้อมด้วยวิธี C-banding	81
55	โครโมโซมคู่ที่ 3 ของปลาค้อทั้ง 2 ชนิด ย้อมด้วยวิธี NOR banding	82
56	โครโมโซมคู่ที่ 1, 2 และ 3 ของ *S. spilota* (A) และโครโมโซมคู่ที่ 1, 5 และ 4 ของ *S.* cf. *spilota* (B) ย้อมด้วยวิธี C-banding	82
57	โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 5 และ 10 ของ *S. nicholsi* (A) และโครโมโซมคู่ที่ 1, 3, 13 และ 19 ของ *S. obeini* (B) ย้อมด้วยวิธี C-banding	83
58	โครโมโซมของปลาค้อทั้ง 2 ชนิด ย้อมด้วยวิธี NOR banding	83

บทที่ 1
บทนำ

ปลาค้อเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังในอาณาจักร (phylum) Chordata อยู่ในชั้น (class) Actinopterygii อันดับ (order) Cypriniformes และอยู่ในวงศ์ (family) Balitoridae ปลาดังกล่าวเป็นปลาน้ำจืดขนาดเล็ก อาศัยอยู่ในบริเวณน้ำไหลค่อนข้างแรง เป็นลำธารสาขาย่อยของลำน้ำขนาดใหญ่ พื้นท้องน้ำมีลักษณะเป็นกรวด ทรายหรือหิน ถึงแม้ว่าปลาค้อจะมีขนาดเล็กแต่ปลาดังกล่าวก็ถูกนำมาทำเป็นอาหาร และยังมีปลาค้อบางชนิดมีลายบนลำตัวที่แปลกและสวยงามจึงมีคนนำปลาเหล่านั้นมาเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม นอกจากนี้ปลาค้อยังมีความสำคัญในการจัดการด้านสิ่งแวดล้อมอีกด้วย กล่าวคือปลาค้อมีคุณสมบัติเหมาะสมในการเป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้สภาพแหล่งน้ำ (biological indicator) ในแหล่งน้ำจืดได้ ซึ่งถ้าพบปลาค้อในแหล่งน้ำใดแสดงว่าสภาพแหล่งน้ำนั้นดีมาก (สรณ รัชฎ์ และนิรมล, 2542) ดังนั้นจะเห็นว่าปลาค้อมีบทบาทสำคัญต่อมนุษย์และสภาพแวดล้อมเป็นอย่างยิ่ง

ปลาค้อเป็นปลาที่มีความแปรปรวนของรูปแบบสีและลายบนลำตัวค่อนข้างสูงมาก ซึ่งแต่เดิมงานทางด้านอนุกรมวิธานของปลาในกลุ่มนี้จะพิจารณาข้อมูลเกี่ยวกับสันฐานวิทยาหลายๆ อย่าง รวมถึงลักษณะรูปแบบของสีและลายบนลำตัวเป็นสิ่งที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของปลาจึงทำให้บางครั้งอาจเกิดปัญหาในการจัดจำแนกชนิดปลาได้ เพราะว่าปลาค้อหลายชนิดมีสีและลายบนลำตัวที่คล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ในบางครั้งสีบนลำตัวของปลายังอาจจะซีดหรือหายไปเนื่องจากสภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลง

จากความรู้ที่ว่า สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีโครโมโซมที่มีขนาด รูปร่าง และจำนวนเฉพาะสำหรับชนิดหนึ่งๆ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโครโมโซมไม่ว่ารูปร่างหรือจำนวนโครโมโซมจะมีผลต่อลักษณะและการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ และปัจจัยสิ่งแวดล้อมภายนอกมีผลกระทบต่อโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะภายนอก ดังนั้นการศึกษาคาริโอไทป์จึงสามารถนำมาใช้ศึกษาการเปรียบเทียบชนิด และจำนวนของโครโมโซมในสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคในการย้อมสีโครโมโซมขึ้นหลายวิธี เช่น Q-banding, G-banding, C-banding และ NORs ฯลฯ วิธีเหล่านี้จะทำให้เกิดแถบตามขวางของแท่งโครโมโซม เรียกว่า แถบโครโมโซม (chromosome band) โครโมโซมแต่ละแท่งจะมีจำนวนแถบ (band) และแบบอย่างของแถบที่เป็นลักษณะของโครโมโซมนั้นๆ (สุมิตรา, 2537) ฉะนั้นการศึกษาคาริโอไทป์จึงเป็นสมมติฐานประการหนึ่งที่น่าจะนำมาใช้ประกอบในการจัดจำแนกชนิดของปลาค้อให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้งานด้านอนุกรมวิธานของปลาค้อมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ตลอดจนเป็น

ข้อมูลสำคัญในเชิงความหลากหลายทางชีวภาพที่จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาทางด้านวิวัฒนาการและงานด้านอื่นต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาลักษณะโครโมโซมของปลาค้อในสกุล *Schistura* บางชนิดในจังหวัดเชียงใหม่
2. เพื่อเปรียบเทียบดาริโอไทป์ของปลาค้อในสกุล *Schistura* บางชนิดในจังหวัดเชียงใหม่
3. เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อสนับสนุนงานด้านอนุกรมวิธาน

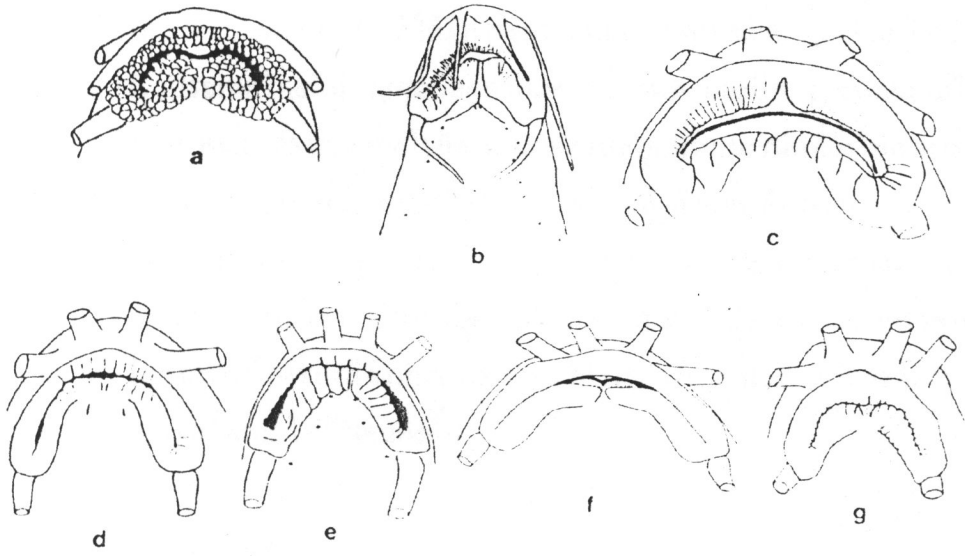
บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

การจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของปลาค้อสกุล *Schistura*

ปลาค้อสกุล *Schistura* ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Balitoridae อยู่ในวงศ์ย่อย (subfamily) Nemacheilinae มีหัวค่อนข้างกลม ลำตัวเรียวยาว ด้านท้ายของลำตัวแบนข้าง มีเกล็ดแบบ cycloid ซึ่งมีขนาดเล็กมาก มีเกล็ดที่บริเวณ ลำตัว ที่ขากรรไกรและบนเพดานปากไม่มีฟัน มีช่องเปิดเหงือกขนาดเล็กอยู่ทางด้านบนของครีบหู หรือมีขนาดปานกลางแผ่ออกทางแนวระนาบเล็กน้อย ครีบหูและครีบท้องอยู่ในแนวระนาบมีก้านครีบเดี่ยวเพียงก้านเดียว ที่คอดหางมี adipose-like fin อยู่ในบางชนิด มีกระดูก prepalatine ไม่มีหนาม (spines) ใต้ตา มีหนวด 3 คู่อยู่ใกล้ปาก ที่ตำแหน่ง rostral 2 คู่ และมีที่ตำแหน่ง maxillary 1 คู่ มีปากอยู่ค่อนลงทางด้านล่าง เป็นปลาน้ำจืดขนาดเล็ก อาศัยอยู่ในบริเวณน้ำไหลค่อนข้างแรง เป็นลำธารที่เป็นสาขาย่อยของลำน้ำขนาดใหญ่ สามารถพบได้ในบริเวณที่เป็นแหล่งน้ำที่ไม่มีปลาชนิดอื่นอาศัยอยู่เลย เช่น ต้นน้ำของน้ำแม่ คองซึ่งเป็นต้นน้ำของน้ำแม่ปิงจะพบเฉพาะปลากลุ่มนี้เท่านั้น อุณหภูมิของน้ำค่อนข้างต่ำอันเนื่องมาจากเป็นพื้นที่ที่อยู่สูงกว่าระดับน้ำทะเลมาก พื้นท้องน้ำมีลักษณะเป็นกรวด ทรายหรือหิน พบในประเทศพม่า ไทย ลาว กัมพูชา ทางตอนใต้ของเวียดนาม ทางตะวันตกของมาเลเซีย และในอินเดียบ้างเล็กน้อย พบว่ามีอยู่บางชนิดที่อาศัยอยู่ในถ้ำ เช่น *Schistura jarutanini*, *S. oedipus* และ *S. troglochtaractus*

ลักษณะเด่นของปลาในสกุล *Schistura* คือ ปากค่อนข้างโค้ง มีความกว้างมากกว่าความยาวประมาณ 2.0-3.5 เท่า ริมฝีปากล่างมีร่องแยก (รูป 1) รูปแบบของสีในแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ปกติมักเป็นสีดำ และมักจะมีแถบดำที่คอดหาง ฐานครีบหลังมักจะมีจุด 1-2 จุด ปกติครีบหางเป็นแบบ emaginated แต่ในบางชนิดอาจจะเป็น forked (Kottelat, 1990) มีเกล็ดขนาดเล็ก ตำแหน่งของรูทวารอยู่ใกล้ครีบก้นมากกว่าครีบท้อง (Rainboth, 1996)



รูป 1 ลักษณะปากของปลากลุ่ม nemacheiline a) *Acanthocobitis*, b) *Neonocmacheilus*, c) *Sectoria*, d) *Nemacheilus binotatus*, e) *Nemacheilus selangoricus*, f) *Schistura*, g) *Physoschistura* (ที่มา: Kottelat, 1990)

การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน

Order Cypriniformes

Superfamily Cobitoidea

Family Balitoridae

Subfamily Nemacheilinae

Genus *Aborichthys* Chaudhuri, 1913

Acanthocobitis Peters, 1861

Nemacheilus Bleeker, 1863

Neonoemacheilus Zhu & Guo, 1985

Physoschistura Banarescu & Nalbant, 1982

Schistura McClelland, 1838

Sectoria Kottelat, 1990

Tuberoschistura Kottelat, 1990

Yunnanilus Nichols, 1925

ดัดแปลงจาก Kottelat (1990) และ Nelson (1994)

ปลาค้อสกุล *Schistura* เป็นปลาที่ได้มีการจัดจำแนกถึงระดับ ชนิด (species) ไว้เป็นจำนวนมาก มีรายงานว่าในประเทศไทยมีปลาสกุลนี้อยู่ทั้งหมด 29 ชนิด และอีก 2 ชนิดยังไม่ได้รับการจัดจำแนก (ชวลิต และคณะ, 2540) อย่างไรก็ตามปลาค้อในสกุลนี้หลายชนิดที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้อย่างชัดเจน และปลาสกุลนี้มีความแปรปรวนของสีบนลำตัวค่อนข้างมาก

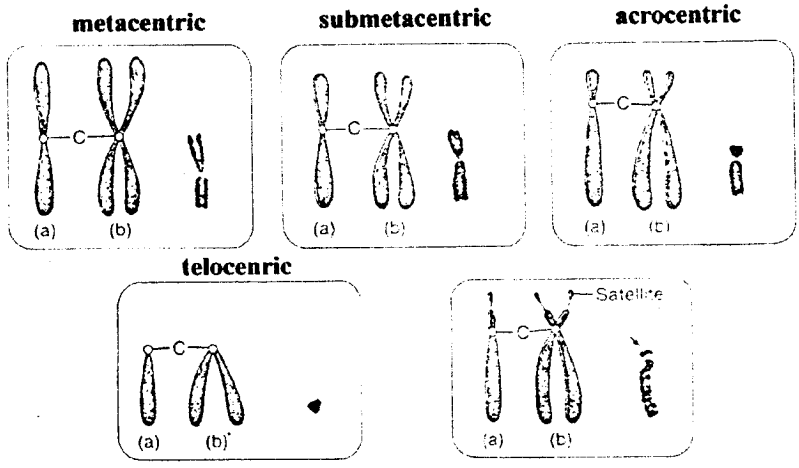
การศึกษาทางอนุกรมวิธานของปลาค้อที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะใช้วิธีการพิจารณาจากรูปร่างและลักษณะสีสันภายนอกของปลา ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันมานานมากแล้วและในบางครั้งอาจเกิดการผิดพลาดขึ้นได้ โดยเฉพาะเรื่องของสีซึ่งมีความผันแปรได้ง่าย จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาวิธีอื่นๆ ที่จะนำมาช่วยในการจัดจำแนกให้ชัดเจนยิ่งขึ้น

การศึกษาคาริโอไทป์ (Karyotype)

คาริโอไทป์เป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของโครโมโซมในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยศึกษาจำนวน และขนาดของโครโมโซมในระยะ metaphase การศึกษาด้านโครโมโซมเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยให้งานด้านอนุกรมวิธานสมบูรณ์ยิ่งขึ้นเนื่องจากลักษณะดังกล่าวเป็นข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งปัจจัยสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น การกินอาหาร แหล่งที่อยู่อาศัย เป็นต้น จะมีอิทธิพลต่อคาริโอไทป์น้อยมาก นอกจากนี้คาริโอไทป์ยังเป็นลักษณะเฉพาะและคงที่สำหรับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จากสาเหตุดังกล่าวการศึกษาคาริโอไทป์ของปลาค้อน่าจะนำมาใช้ประกอบการจัดจำแนกชนิดของปลาค้อได้ และข้อมูลที่ได้ยังให้ความกระจ่างชัดเกี่ยวกับระดับความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในระดับที่ใกล้ชิดกันหรือห่างกัน และความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันแต่มีแหล่งที่อยู่อาศัยตามสภาพภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันได้ (White, 1973)

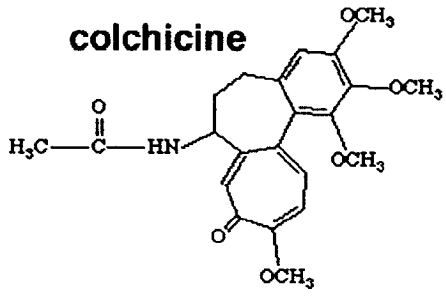
การจัดทำคาริโอไทป์ หมายถึง การนำเอาโครโมโซมแต่ละอันจากเซลล์ในระยะ metaphase (โดยอาศัยจากเซลล์ใดเซลล์หนึ่งเท่านั้น) มาเรียงเป็นคู่ homologous เรียงตามลำดับจากใหญ่จนถึงเล็ก การวางโครโมโซมวางโดยให้แขนข้างสั้นตั้งขึ้นและนิยมวางโครโมโซมเพศอยู่ที่มุมล่างขวาสุดของภาพ โครโมโซมที่พบโดยทั่วไปจะมีอยู่ 4 แบบ คือ metacentric (m) เป็นโครโมโซมที่มีแขนทั้งสองข้างยาวเท่ากัน submetacentric (sm) เป็นโครโมโซมที่มีแขนทั้งสองข้างไม่เท่ากัน acrocentric (a) มี centromere อยู่ค่อนไปทางปลายของโครโมโซม และ telocentric (t) มีแขนเพียงข้างเดียวทั้งนี้เพราะมี centromere อยู่ตรงปลายของโครโมโซม นอกจากนี้ยังอาจจะพบตำแหน่งรอยคอดทุติยภูมิ (secondary constriction) บนแท่งโครโมโซมในตำแหน่งที่คงที่ ในโครโมโซมบางแท่งตำแหน่งของรอยคอดทุติยภูมิอยู่ค่อนไปทางปลายด้านใดด้านหนึ่งของแท่ง ทำให้ปรากฏเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นติ่งรูปร่างกลมหรือรียื่นอยู่ที่ปลายแท่งโครโมโซม เรียกว่า satellite (รูป 2) นอกจากนั้นยังมีการหาค่า fundamental number (FN หรือ NF) ซึ่งเป็นตัวเลขที่เกิดจากผลรวมของแขนของ

โครโมโซมทุกอันใน 1 เซลล์ ค่านี้นิยมที่จะหาไว้เป็นคุณสมบัติประจำของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด การทำคาริโอไทป์ต้องมีการย้อมสีโครโมโซมโดยใช้สีประเภทย้อมติดกรดนิวคลิอิค เช่น สี orcein, carmine และ Giemsa จะทำให้โครโมโซมติดสีเข้มตลอดแท่ง การย้อมเช่นนี้สามารถบอกจำนวนและชนิดของโครโมโซมประจำสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นได้ (อมรา, 2536)



รูป 2 ลักษณะรูปร่างของโครโมโซมแบบต่างๆ ตามตำแหน่งของ centromere
a) chromatid, b) chromosome c) centromere (ที่มา: วิสุทธิ์, 2533)

การศึกษาคาริโอไทป์จำเป็นต้องใช้สารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของสปินเดิลไฟเบอร์ (spindle fiber) ที่ประกอบด้วยไมโครทิวบูล (microtubule) ทำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวอยู่ในระยะ metaphase ซึ่งสารที่ใช้กันมีหลายชนิดได้แก่ โคลซิมิด (colcimide) โคลชิซิน (colchicine) เป็นต้น โดยสารที่เลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือโคลชิซินซึ่งเป็นสารประกอบ alkaloid (รูป 3) ที่สกัดจากพืชสกุล *Colchicum* ซึ่งโคลชิซินทำหน้าที่ขัดขวางการแบ่งเซลล์ โดยยับยั้งการสร้าง spindle fiber ซึ่งทำหน้าที่ดึงโครโมโซมไปยังขั้วของเซลล์ ดังนั้นโครโมโซมจึงไม่ถูกดึงไปที่ขั้วทั้งสองของเซลล์ ทำให้โครโมโซมหยุดอยู่ที่ระยะ metaphase ซึ่งเป็นระยะที่โครโมโซมมีการขดตัวสั้นที่สุด (ชัดนารี, 2539; นิตย์ศรี, 2541)



รูป 3 สูตรโครงสร้างของโคลชิซิน (ที่มา: Geocities, Nodate)

ประมาณปี ค.ศ. 1970 เป็นต้นมา การย้อมสีแท่งโครโมโซมได้มีการพัฒนาอย่างมาก มีการค้นพบวิธีการย้อมสีโครโมโซมแบบใหม่ๆ ซึ่งวิธีการเหล่านี้ทำให้เกิดแถบตามขวางของแท่งโครโมโซม เรียกว่า แถบโครโมโซม โครโมโซมแต่ละแท่งมีจำนวนแถบและแบบอย่างของแถบที่เป็นลักษณะเฉพาะของโครโมโซมนั้นๆ และแถบดังกล่าวไม่เปลี่ยนแปลงไม่ว่าจะนำโครโมโซมนั้นๆ มาจากเซลล์ชนิดใด (สุมิตรา, 2537)

การย้อม Q-banding เป็นวิธีการย้อมแถบโครโมโซมวิธีแรกที่นับเป็นจุดเริ่มต้นของวิธีการย้อมแถบโครโมโซมค้นพบโดยนักเซลล์พันธุศาสตร์ชื่อ Caspersson โดยการนำโครโมโซมที่ถูกทำให้คงสภาพแล้วมาย้อมด้วยสีฟลูออโรโครม (fluorochrome) สีฟลูออโรโครมเป็นสีที่มีการเรืองแสง (fluorescence) เมื่อกระทบกับรังสีอัลตราไวโอเลต สีที่นิยมใช้ในการย้อม Q-banding คือ ควินาครีน (quinacrine) นอกจากนี้สามารถใช้ฟลูออโรโครมอื่นๆเช่น quinacrine mustrad, 33258 Hoechst ได้เช่นกัน เมื่อนำโครโมโซมดังกล่าวมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope) บริเวณที่ติดสีฟลูออโรโครมจะปรากฏแถบวาวแสงตามขวางของแท่งโครโมโซม การติดสีบนแท่งของโครโมโซมจะขึ้นกับความแตกต่างของปริมาณของคู่เบส ได้แก่ A-T และ C-G ของ DNA ส่วนที่มี A-T มากจะติดสีเข้มกว่าส่วนที่มี C-G มาก นอกจากนี้ยังอาจขึ้นกับการเรียงตัวของเบส และปริมาณของโปรตีนที่โครโมโซมส่วนนั้นๆ ด้วย เรียกแถบโครโมโซมนี้ว่า แถบคิว (Q-banding หรือ Quinacrine bands) (วิสุทธิ์, 2533; สุมิตรา, 2537; อมรา, 2540)

การย้อม G-banding (Giemsa bands) การย้อมวิธีนี้จะย่อยโครโมโซมด้วยเอ็นไซม์ย่อยโปรตีนคือ Trypsin โดยอาศัยหลักการที่ส่วนต่างๆของโครโมโซมแต่ละแท่งมีการจัดตัวของโครมาติน (chromatin) แตกต่างกัน บริเวณที่มีโครมาตินจับตัวกันหนาแน่นบริเวณนั้นโปรตีนจะถูกย่อยออกน้อย เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa บริเวณนั้นจะติดสีเข้ม ส่วนของโครโมโซมที่โครมาตินจับตัวกันไม่หนาแน่นบริเวณนั้นโปรตีนจะถูกย่อยออกไปมาก เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa จะติดสีจาง เกิดเป็น

band ซึ่งมีลักษณะเฉพาะบนโครโมโซมแต่ละคู่ที่เป็น homologous chromosome กัน (วิสุทธิ์, 2533)

การย้อม C-banding (Constitutive heterochromatin bands) การย้อมวิธีนี้จะทำให้เกิด denature DNA ของบริเวณที่ไม่ใช่ C-banding ด้วยกรด (HCl) และด่าง (NaOH หรือ $Ba[OH]_2$) นอกจากนี้การนำไป incubate ใน Saline Sodium Citrate (SSC) ก็ทำให้เกิดการทำลาย DNA เป็นชิ้นเล็กๆ และหลุดลงไปในสารละลาย ส่วนกลไกที่ช่วยไม่ให้ส่วน C-band ถูก denature ไปด้วยนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าบริเวณนี้มี nonhistone protein จับกับ satellite DNAs อยู่ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการต้านทานต่อกรดและด่างที่ใช้ในกระบวนการย้อม C-banding (วัชรี, 2541) จากนั้นย้อมด้วยสี Giemsa ซึ่งสีชนิดนี้จะย้อมติดกรดนิวคลิอิค และพบว่าโครโมโซมมนุษย์ตำแหน่ง centromere ของ autosome และแขนข้างยาวของโครโมโซม Y ทั้งหมดติดสีน้ำเงินเข้ม (อมรา, 2536)

นอกจากนี้ยังมีเทคนิคการศึกษาโครโมโซมโดยใช้สีที่ต่างไปจากสี Giemsa เช่น เทคนิค NOR banding (Silver-staining for Nucleolus Organizer Region) จะย้อมติดบริเวณ Nucleolus Organizer Region (NOR) ซึ่งจะอยู่บริเวณใกล้ satellite เทคนิคนี้จะใช้สารละลาย silver nitrate เป็นสารย้อมโครโมโซม แถบที่ปรากฏเรียก NOR-band เรียกเทคนิคนี้ว่า silver (NOR) staining พบว่าโครโมโซมที่มี satellite (ปลายติ่งโครโมโซมที่พบปลายแขนข้างสั้น) จะเป็นโครโมโซมที่มีตำแหน่งของ ribosomal gene (rDNA) ปรากฏอยู่ โดยที่ rDNA จะอยู่บริเวณใกล้ satellite ซึ่งเป็นตำแหน่งของ nucleolus organizer region (NOR) (อมรา, 2536; อมรา, 2540)

การศึกษาคาริโอไทป์ของปลาทำกันอย่างกว้างขวางในปลากว่า 2000 ชนิด พบว่าจำนวนโครโมโซมของปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในช่วงกว้าง โดยมีจำนวนโครโมโซมต่ำที่สุดเท่ากับ 12 แท่ง ในปลา *Gonostoma bathyphilum* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Gonostomatidae และปลาที่มีจำนวนโครโมโซมมากที่สุดเท่ากับ 250 แท่ง ซึ่งพบในวงศ์ของปลาสเตอร์เจียน (family Acipenseridae) จำนวนโครโมโซมของต้นตระกูลปลาปัจจุบันเท่ากับ 48-52 (Ohno, 1970 อ้างตาม อุทัยรัตน์, 2538) สำหรับปลาพื้นเมืองของไทยนั้นมีการศึกษาคาริโอไทป์ไว้อย่างน้อย 34 ชนิด (9วงศ์) (อุทัยรัตน์, 2538)

การศึกษาคาริโอไทป์ของปลานั้นได้มีการศึกษาทั้งในปลาทะเล และปลาน้ำจืด Ida *et al.* (1986) ได้ทำการศึกษาคาริโอไทป์ของปลาฉลาม 2 ชนิดคือ *Chlamydoselachus anguineus* มีจำนวนโครโมโซม 2n=100 คาริโอไทป์ประกอบด้วย metacentric หรือ submetacentric chromosome 6 คู่ (ขนาด 3-8 μm) และ acrocentric chromosome 44 คู่ (ขนาด 1-7 μm) ส่วน *Heterodentus japonicus* มีจำนวนโครโมโซม 2n=102 คาริโอไทป์ประกอบด้วย metacentric หรือ submetacentric chromosome 5 คู่ (ขนาด 4-10 μm) และ acrocentric chromosome 46 คู่ (ขนาด 1-8 μm)

การศึกษาคาริโอไทป์ในปลาน้ำจืดมีการศึกษากันไว้ค่อนข้างมาก ได้แก่ ปลาอันดับ Perciformes วงศ์ Channidae ปลาในวงศ์นี้มีจำนวนโครโมโซมส่วนมากอยู่ในช่วง 2n=32 ถึง 2n=44 และมีบางชนิดมีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 2n=78 ถึง 2n=112 ลักษณะคาริโอไทป์ประกอบไปด้วยโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric และ telocentric ซึ่งโครโมโซมแบบ telocentric จะพบมากที่สุด และ NF มีค่าอยู่ในช่วง 46 ถึง 116 (ธวัช และวิเชียร, 2534; Banerjee *et al.*, 1988)

ปลาอันดับ Beloniformes ในวงศ์ Oryziidae ที่มีการศึกษาคาริโอไทป์แล้วมีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 2n=36 ถึง 2n=48 และ NF มีค่าอยู่ในช่วง 48 ถึง 96 (Uwa, 1986)

ปลาอันดับ Cypriniformes ในวงศ์ Siluridae ที่มีการศึกษาคาริโอไทป์แล้วมีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 2n=40 ถึง 2n=92 ลักษณะคาริโอไทป์ประกอบไปด้วยโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric, acrocentric และ telocentric และ NF มีค่าอยู่ในช่วง 86 ถึง 106(ธวัช, 2534; Nayyar, 1966)

ปลาในวงศ์ Cyprinidae เป็นปลาที่มีการศึกษาไว้ค่อนข้างมากเพราะปลาในวงศ์นี้มีจำนวนมาก คาริโอไทป์ของปลาในวงศ์นี้มีโครโมโซมอยู่ในช่วง 2n=50 ถึง 2n=166 ซึ่งปลาในวงศ์นี้ที่มีการศึกษาคาริโอไทป์ไว้แล้วนั้นส่วนมากจะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n=50 ลักษณะคาริโอไทป์ประกอบไปด้วยโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric, acrocentric และ telocentric และ NF มีค่าอยู่ในช่วง 76 ถึง 238 (Magtoon and Arai, 1990; Magtoon and Arai, 1994; Minrong *et al.*, 1996)

ปลาในวงศ์ Cobitidae ที่มีการศึกษาได้แก่ปลา *Botia dario* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=98 โครโมโซมมีขนาด 0.66-2.17 μm คาริโอไทป์ประกอบด้วย 16m+3sm+30t และสำหรับการศึกษาคาริโอไทป์ของปลาในวงศ์ Balitoribae (เดิมถูกจัดอยู่ในวงศ์ Cobitidae) มีการศึกษาในปลาค้อสกุล *Nemacheilus* 2 ชนิดในอินเดีย พบว่า *N. aureus* มีจำนวนโครโมโซม 2n=50 ซึ่งโครโมโซมมีขนาดอยู่ระหว่าง 0.62-2.19 μm คาริโอไทป์ประกอบด้วย 14m+2sm+9t คู่ และ NF=82 และ *N. savona* มีจำนวนโครโมโซม 2n=36 ซึ่งโครโมโซมมีขนาดอยู่ระหว่าง 0.8-3.26 μm ในปลาเพศผู้ และ 0.7-2.56 μm ในปลาเพศเมีย คาริโอไทป์ประกอบด้วย 10m+3sm+1a+4t คู่ และ NF=64 (Khuda-Bukhsh *et al.*, 1986) ต่อมา Collares-Pereira *et al.* (1995) ศึกษา *N. barbatulus* รายงานว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=50 แต่ไม่ได้กล่าวไว้ว่ามีคาริโอไทป์แบบใด

สำหรับการศึกษาโครโมโซมของปลาโดยการย้อมแถบสีนั้น วิธีที่นิยมใช้กันมากคือการย้อม nucleolus organizer region (NOR) ที่ย้อมด้วย silver nitrate ซึ่งสีย้อมจะติดโครโมโซมตรงบริเวณ 18S และ 28S ribosomol RNA (Klinkhardt, 1998) ซึ่งมีการศึกษาในปลาแล้วไม่น้อยกว่า 200 ชนิด (Gold *et al.*, 1990) Uwa and Ojima (1981) ได้ศึกษา NOR band ในปลา *Oryzias latipes* พบว่ามี

โครโมโซมขนาดเล็กแบบ submetacentric 1 คู่ มี NOR band อยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่นั้น หลังจากนั้น Takai and Ojima (1986) ได้ศึกษาปลาประมาณ 40 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยปลาในวงศ์ Cyprinidae, Pomacentridae และปลากลุ่มอื่นๆ ศึกษาโดยใช้ silver staining technique ทำให้ทราบว่าปลาส่วนมากมี NOR band ขนาดเล็กจำนวน 1 คู่ แต่ในกลุ่มปลาตะเพียนหลายชนิดจะมี NOR band มากกว่า 1 คู่ ซึ่งจะพบอยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซม และกลุ่มปลาตะเพียนบางชนิดก็มี NOR band ขนาดใหญ่ จำนวนของ NOR band และตำแหน่งของ NOR band ที่ปรากฏจะบอกให้ทราบถึงความแตกต่างของปลาแต่ละชนิด ในปีเดียวกัน Magtoon (1986) ศึกษาปลาซิวข้าวสารแคระ (*Oryzias minutillus*) ซึ่งตัวอย่างมาจากกรุงเทพฯ และเชียงใหม่ และ *Oryzias* sp. พบว่าปลาทั้ง 3 ชนิดมี NOR band จำนวน 1 คู่ คือปลาซิวข้าวสารแคระจากกรุงเทพฯ มีจำนวนโครโมโซม 2n=34 พบ NOR band ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบ submetacentric และปลาซิวข้าวสารแคระจากเชียงใหม่มีจำนวนโครโมโซม 2n=30 พบ NOR band ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบ submetacentric เช่นเดียวกัน ส่วน *Oryzias* sp. มีจำนวนโครโมโซม 2n=48 พบ NOR band ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบ acrocentric นอกจากนี้ Uwa (1986) ได้ศึกษาปลาซิวข้าวสารน้ำกร่อย (*O. melastigma*) และปลาซิวข้าวสารชวา (*O. javanicus*) พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=48 เหมือนกัน และพบ NOR band ที่โครโมโซมแบบ acrocentric จำนวน 1 คู่ เช่นเดียวกันทั้ง 2 ชนิด และในปีเดียวกัน Uwa and Magtoon (1986) ศึกษา NOR band ในปลา *O. curvinotus* พบ NOR band 1 คู่ ที่โครโมโซมแบบ acrocentric และในปลา *O. luzonensis* มี NOR band 1 คู่ ซึ่งจะพบในโครโมโซมแบบ submetacentric ต่อมา Garcia *et al.* (1995) ศึกษาปลา *Cynolebias adloffi* พบ NOR band 1 คู่ ที่ตำแหน่ง terminal ของโครโมโซมคู่ที่ 6 ปลา *C. affinis* พบ NOR band 2 คู่ โดย NOR band คู่แรกพบที่ตำแหน่ง terminal ของโครโมโซมคู่ที่ 3 ที่เหลือพบที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 7 ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวพบ C-heterochromatic เช่นเดียวกับการย้อมสีแบบ C-banding ปลา *C. duraznensis* พบ NOR band 3 จุด ซึ่ง พบที่โครโมโซมคู่ที่ 7 บริเวณ terminal จำนวน NOR band 1 จุด และพบที่โครโมโซมคู่ที่ 10 จำนวน NOR band 2 จุด และปลา *C. gymnoventris* พบ NOR band ที่โครโมโซมคู่ที่ 11 บนแขนข้างสั้นของโครโมโซม นอกจากนั้น Jankun *et al.* (1998) ได้ศึกษาปลา northern pike (*Esox lucius*) พบ NOR band บริเวณใกล้กับตำแหน่งของ centromere ของโครโมโซมคู่ที่ 11 ซึ่งทราบได้จากการย้อมสีแบบ C-band หลังจากนั้นในปีเดียวกัน Woznicki *et al.* (1998) ศึกษาปลา *Salmo trutta morpha lacustris* จากทะเลสาบ Wdzydze พบ NOR band ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 ซึ่งอยู่ติดกับบริเวณของ heterochromatin ซึ่งบริเวณนี้ยืนยันโดยการย้อมสีแบบ C-banding ต่อมาจันทิมา (2542) ได้ทำการศึกษาการกระจายของบริเวณ NOR ของปลาตะเพียนทราย (*Puntius brevis*), ปลาแก้มช้ำ (*Systomus orphoides*), ปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*), และ

ปลาตะพาก (*Hypsibarbus wetmorei*) พบว่าปลาทั้ง 4 ชนิดมีจำนวนโครโมโซม 2n=50 เหมือนกัน แต่ชนิดของโครโมโซม จำนวนและตำแหน่งของ NOR band แตกต่างกันคือ ปลาตะเพียนทรายมีคาริโอไทป์แบบ 2m+2sm+2a+44t และมี NOR band 1 คู่ พบที่ส่วนปลายสุดของแขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบ acrocentric ปลาแก้มช้ำมีคาริโอไทป์แบบ 12m+20sm+4a+14t และมี NOR band 1 คู่ พบที่ส่วนปลายสุดของแขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบ submetacentric ปลาตะเพียนขาวมีคาริโอไทป์แบบ 6m+16sm+6a+22t และมี NOR band 2 คู่ พบที่ส่วนปลายสุดของแขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบ submetacentric 1 คู่ และส่วนปลายสุดบริเวณ centromere ของโครโมโซมแบบ telocentric 1 คู่ และปลาตะพากมีคาริโอไทป์แบบ 12m+12sm+4a+22t และมี NOR band 1 คู่ พบที่ส่วนปลายสุดของแขนโครโมโซมแบบ telocentric

การศึกษาโครโมโซมโดยการย้อมสีแบบ C-banding นั้นได้ทำการศึกษาในปลาไว้แล้วมากกว่า 50 ชนิด (Gold *et al.*, 1990) Gregury *et al.* (1980) ทำการศึกษา C-band ในปลาทะเล 3 ชนิด พบว่าปลา silver perch (*Bairdiella chrysura*) จะปรากฏแถบสีบริเวณ centromere ในทุกโครโมโซมแต่มีโครโมโซมแบบ telocentric 1 คู่ติดสีตลอดทั้งแท่ง ปลา sheepshead (*Archosargus probatoceephalus*) มีโครโมโซมแบบ telocentric และ acrocentric มาก และมี metacentric ที่มีขนาดใหญ่จำนวน 1 คู่ จากการย้อมสี C-band พบว่าโครโมโซมแบบ acrocentric 3 คู่แรกติดสีบริเวณ centromere และในคู่ที่ 1 บริเวณแขนข้างสั้นพบ satellites นอกจากนั้นโครโมโซมคู่ที่ 10, 11 และ 12 ที่มี heterochromatin ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซม และสำหรับคู่ที่เหลือติดสีเฉพาะบริเวณ centromere ในปลา blue striped grunt (*Haemulon sciurus*) โครโมโซมแบบ telocentric ทุกคู่ติดสีบริเวณ centromere ทุกแท่งยกเว้นโครโมโซมแบบ metacentric จะไม่ติดสีในบริเวณ centromere ต่อมา Uwa and Ojima (1981) ได้ทำการศึกษา C-band ในปลาซิวข้าวสาร (*Oryzias latipes*) พบแถบสีปรากฏที่บริเวณ centromere เกือบทุกโครโมโซม ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับ Ojima (1983) ซึ่งศึกษาในปลา *Stephanolepis cirrhifer*, ปลากินยุง (*Gambusia affinia*), ปลาอมไข่ (*Apogon notatus*), *Carassius auratus auratus* และ *C. a. cuvieri* พบว่าโครโมโซมส่วนใหญ่จะติดสีบริเวณ centromere หลังจากนั้น Ren *et al.* (1992) ศึกษาปลา Chinese cyprinid จำนวน 10 ชนิด พบว่าปลาบางชนิดมีจำนวน C-band มาก และบางชนิดมี C-band น้อย ซึ่งใช้แยกความแตกต่างของปลาแต่ละชนิดได้ Khuda-Bukhsh and Chakraborty (1994) รายงานการศึกษาในปลานวลจันทร์เทศ (*Cirrhinus mrigala*) และปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) ผลปรากฏว่าโครโมโซมส่วนใหญ่จะติดสีที่ตำแหน่ง centromere แต่ก็มีบางโครโมโซมไม่ติดสีหรือติดสีตรงส่วนปลายของโครโมโซม หลังจากนั้น Almeida-Toledo *et al.* (1995) พบว่าในปลาซ่ง (*Aristichthys nobilis*) จะพบ C-band ชัดเจนเฉพาะที่ตำแหน่ง interstitial 1จุด และ terminal 1จุด ที่โครโมโซมคู่ที่ 13 และในปลาลิ่น

(*Hypophthalmichthys molitrix*) ไม่พบ C-band ในปีเดียวกัน Garcia *et al.* (1995) รายงานไว้ว่าจากการย้อมสีโครโมโซมแบบ C-band พบว่าโครโมโซมจะติดสี 3 ตำแหน่งคือ บริเวณ centromere, interstitial และ telomere ในปลา *Cynolebias adloffi* จะติดสีเพียงเล็กน้อยที่บริเวณ centromere และ telomere ปลา *C. affinis* จะย้อมติดสีบริเวณ centromere และ telomere อย่างสม่ำเสมอ ปลา *C. duraznensis* พบว่ามีโครโมโซม 3 คู่มี C-band ขนาดใหญ่ 3 คู่ ปลา *C. alexandrii* และ *C. gymnoventris* โครโมโซมติดสีเล็กน้อยทั้ง 3 บริเวณคือ centromeric, interstitial และ telomeric ต่อมา Campos *et al.* (1997) ศึกษาในปลา *Diplomyater camposensis* และ *D. nahuelbutaensis* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=56 เท่ากัน แต่ *D. camposensis* มีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ 16m+24as+8a+8t และพบว่าโครโมโซมคู่ที่ 7, 24 และ 25 มีการติดสีแบบ C-banding อย่างชัดเจน โดยที่โครโมโซมคู่ที่ 7 มี C-band ที่แขนของโครโมโซม 1 ข้าง คู่ที่ 24 มี C-band ตลอดทั้งแท่งของโครโมโซม และคู่ที่ 25 พบ C-band ที่บริเวณ centromere ส่วนปลา *D. nahuelbutaensis* C-band ที่โครโมโซมคู่ที่ 5, 6 และ 7 ที่บริเวณ centromere นอกจากนั้นยังพบที่โครโมโซมคู่ที่ 23, 24, 27 และ 28 ตลอดทั้งแท่งของโครโมโซม

สำหรับการย้อมสีแบบ G-banding นั้น มีการศึกษาค่อนข้างน้อยอาจเนื่องจากมีข้อจำกัดหลายประการ ปัจจัยที่เห็นได้ชัดได้แก่ ปลาส่วนใหญ่จะมีจำนวนโครโมโซมค่อนข้างมาก และโครโมโซมมีขนาดเล็ก (Gold *et al.*, 1990) ที่มีการศึกษาไว้บ้างแล้วเช่นปลา *Salmo salar* โดย Purdom (1993) ซึ่งปลาดังกล่าวมีจำนวนโครโมโซม 2n=58 และผลที่ได้ช่วยทำให้การจับคู่คาริโอไทป์ของโครโมโซมทำได้ง่ายขึ้น ต่อมา Khuda-Bukhsh and Tiwary (1994) ได้ทำการย้อมสีแบบ G-banding ในปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) และปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) แต่ผลออกมาไม่ชัดเจน

นอกจากนี้ Medrano *et al.* (1988) ยังได้ทำการย้อมสีแบบ Q- และ R-banding ในปลาตูหนา (*Anguilla anguilla*) (อันดับ Anguilliformes), ปลาเก๋า (*Epinephelus guttatus*) (อันดับ Perciformes) และปลาทรงเครื่อง (*Labeo bicolor*) (อันดับ Cypriniformes) พบว่าปลาตูหนาโครโมโซมคู่ที่ 8 เมื่อย้อมแบบ Q-banding เกิด heteromorphic ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบ submetacentric ซึ่งบริเวณนี้เกิดแถบสว่างเมื่อย้อมแบบ R-banding แต่สำหรับปลาเก๋า และปลาทรงเครื่องเมื่อย้อมด้วยวิธี Q- และ R-banding ด้วยวิธีเดียวกันไม่พบการติดสี

จุดประสงค์ในการศึกษาคาริโอไทป์ของปลาค้อสกุล *Schistura* ครั้งนี้มุ่งที่จะศึกษาเปรียบเทียบจำนวน ชนิด ลักษณะโครโมโซม และรูปแบบคาริโอไทป์ของปลาค้อในแต่ละชนิดเพื่อเป็นความรู้พื้นฐานทางด้าน cytotaxonomy ของปลา

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

การจัดเตรียมตัวอย่าง

1. สถานที่เก็บตัวอย่าง

เก็บที่ลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิงในจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 11 ลุ่มน้ำสาขา รวมทั้งหมด 55 สถานี (ตาราง 1 และรูป 4)

ตาราง 1 จุดเก็บตัวอย่างปลาค้อทั้งหมด 11 ลุ่มน้ำสาขา

ชื่อลุ่มน้ำสาขา	อำเภอ	สถานี	ความสูงจากระดับน้ำทะเล (เมตร)
1. ลุ่มน้ำแม่ปิงตอนบน	เชียงดาว	ห้วยแม่ซ้าย	550
		ห้วยแม่นะ	980
		ห้วยแม่จาเหนือ	760
		ห้วยแม่แม๊ะ	800
		น้ำคอง	900
2. ลุ่มน้ำแม่งัด	พร้าว	ห้วยแม่แพงนอก	500
		ห้วยแม่แพงใน	540
		ห้วยแม่ป๋าม	500
		ห้วยแม่ปั๋ง	650
		น้ำตกม่อนหินไหล	800
3. ลุ่มน้ำแม่แตง	แม่แตง	ห้วยกุ๊บกั๊บ	500
		น้ำแม่เลา	640
		ห้วยต้นตองเหนือ	550
		ห้วยต้นตองใต้	470
		ห้วยแม่แสะ	700

ตาราง 1 (ต่อ)

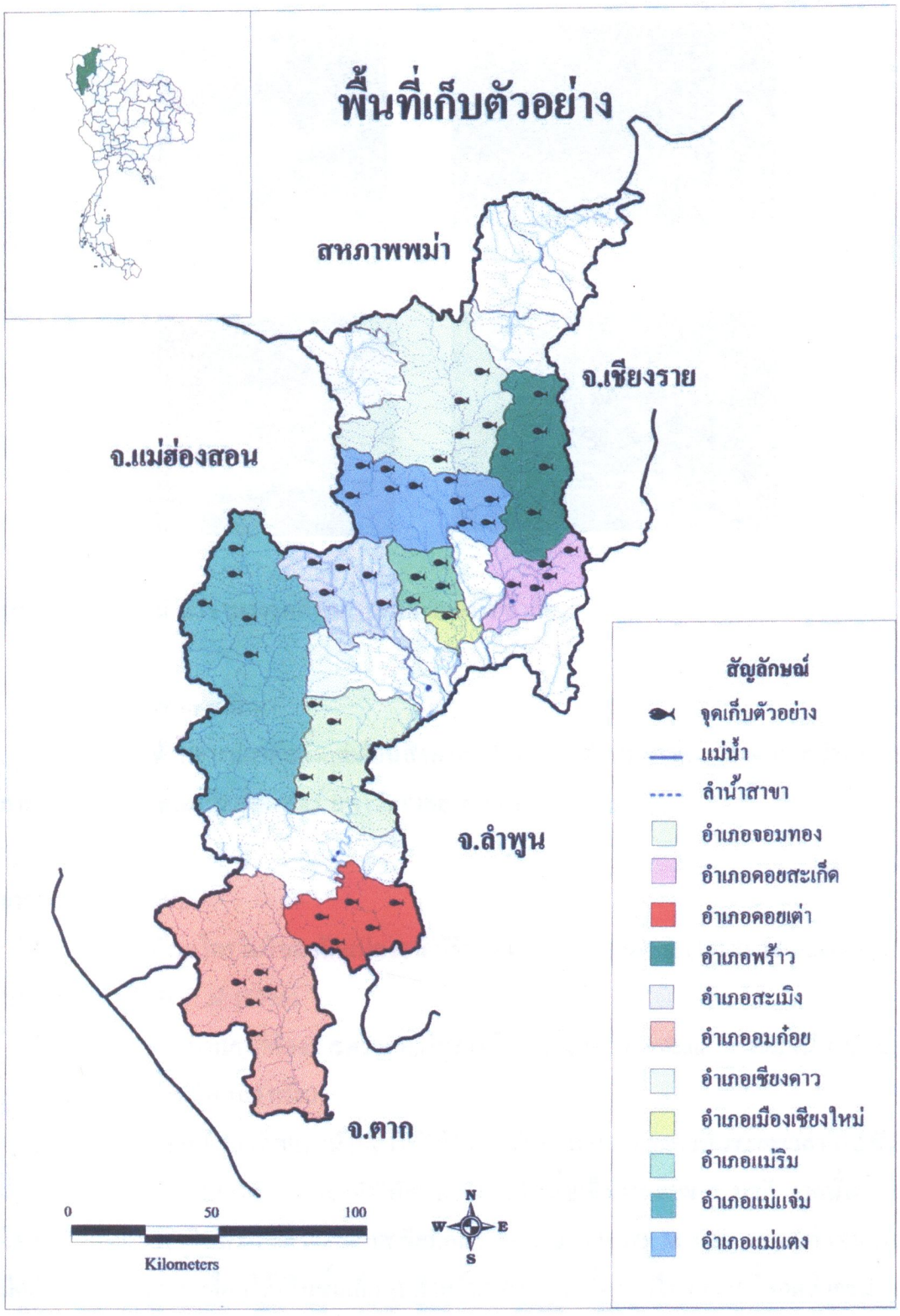
ชื่อลุ่มน้ำสาขาย่อย	อำเภอ	สถานี	ความสูงจากระดับน้ำทะเล (เมตร)
4. ลุ่มน้ำแม่ริม	แม่แตง	น้ำแม่ริม	600
		ห้วยน้ำใส	750
		ห้วยแม่หลอด	850
		ห้วยป่าแป๋	710
		ห้วยน้ำริน	630
5. ลุ่มน้ำแม่ริมตอนกลาง	เมือง และแม่ริม	น้ำแม่สา	650
		ห้วยโจ้	450
		ห้วยวังยาง	670
		มณฑาธาร	700
		ห้วยแม่แฮม	450
6. ลุ่มน้ำแม่กวง	ดอยสะเก็ด	ห้วยแก้ว	800
		ห้วยกิ่วต่ำ	860
		น้ำแม่กวง	700
		ห้วยมะเกลี้ยง	1,000
		ห้วยทรายขาว	800
7. ลุ่มน้ำขาน	สะเมิง	น้ำแม่ขาน	750
		ห้วยออมลอง	640
		ห้วยอ้อ	490
		ห้วยกาด	610
		ลำธารแม่ขาน	800
8. ลุ่มน้ำแม่ปิงตอนล่าง	ดอยเต่า	ห้วยแม่บวนใต้	380
		ห้วยแม่บวนเหนือ	360
		น้ำแม่เตียน	340
		ห้วยโป่ง	420
		ห้วยทุ่ง	380

ตาราง 1 (ต่อ)

ชื่อลุ่มน้ำสาขาย่อย	อำเภอ	สถานี	ความสูงจากระดับน้ำทะเล (เมตร)
9. ลุ่มน้ำแม่กลาง	จอมทอง	ห้วยสบแอบ	680
		น้ำแม่เตี๊ยะ	340
		น้ำแม่กลาง	540
		น้ำแม่ผง	540
		น้ำแม่หอย	500
10. ลุ่มน้ำแม่แจ่ม	แม่แจ่ม	น้ำตกห้วยทรายขาว	1,000
		น้ำแม่ปาน	500
		ห้วยแม่ศึก	490
		ห้วยน้ำริน	480
		ห้วยพุย	500
11. ลุ่มน้ำแม่ตื่น	อมก๋อย	น้ำแม่ตื่น	700
		ห้วยม่อนจอง	830
		น้ำตกนางนอน	950
		ห้วยนางนอน	800
		ลำธารย่อยน้ำตกนางนอน	900

2. การเก็บตัวอย่าง

เนื่องจากจุดเก็บตัวอย่างเป็นลำน้ำสาขาซึ่งมีน้ำไหลตลอดเวลา (รูป 5) และปลามีขนาดเล็กจึงจับปลาโดยใช้ชุดอุปกรณ์ช็อตปลาที่มีกำลังไฟต่ำ เพื่อให้ปลาสลบจากนั้นจึงใช้สวิงตักปลาที่ไหลไปตามน้ำมาพักไว้ให้ฟื้น แล้วจึงเลือกปลาชนิดที่มีจำนวนไม่ต่ำกว่า 30 ตัว จากลุ่มน้ำสาขาต่างๆ กลับมาเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลี้ยงปลาตัวอย่างไว้ในตู้กระจกให้ออกซิเจนตลอดเวลา และให้อาหารปลาวันละ 2 ครั้งด้วยอาหารปลาที่มีขายทั่วไป พักปลาไว้อย่างน้อย 3 สัปดาห์ จึงนำมาทำการทดลอง



รูป 4 จุดเก็บตัวอย่างปลาค้อจากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิงในจังหวัดเชียงใหม่

รูป 5 ลักษณะลุ่มน้ำสาขาบางจุดที่ทำการเก็บตัวอย่างปลาค้อ

3. เวลาที่ทำการศึกษา

เก็บตัวอย่างปลาค้อตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2542 ถึงเดือนมกราคม 2544 และนำมาศึกษาที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การศึกษาคาริโอไทป์

1. การเตรียมโครโมโซม ดัดแปลงจากวิธีของ Chen and Ebeling (1968), Magtoon and Arai (1990) และ Nanda *et al.* (1995)

1.1 นำปลาที่ต้องการตรวจหาโครโมโซมมาฉีดด้วย colchicine เข้มข้น 0.01% (ฉีด 0.3 มิลลิลิตรต่อน้ำหนัก 100 กรัม)

1.2 หลังจากฉีดแล้วนำปลาไปไว้ในตู้ เปิดออกซิเจนแรงๆ เป็นระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง

1.3 นำปลาดังกล่าวมาทำให้สลบโดยแช่ในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที จากนั้นจึงผ่าเอาไต และเหงือกมาแช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.075 M นาน 10 นาที (ขณะแช่ใช้มีดผ่าตัดสับไต และเหงือกให้เป็นชิ้นเล็กๆ) สำหรับปลาทุกตัวที่ผ่าเอาไต และเหงือกแล้วจะนำมาจดรายละเอียดทุกอย่างที่ใช้ในการจำแนกชนิด และทำการติดหมายเลขไว้ แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ใน 10% formalin

1.4 ดูดไต และเหงือกในสารละลายมาเก็บไว้ในหลอด centrifuge เมื่อครบ 10 นาที จึงนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 8-10 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้ง

1.5 เติม 0.075 M KCl ปริมาณ 5 มิลลิลิตร อีกครั้งโดยใช้ vortex mixer ช่วยปั่น แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม แล้วดูดส่วนใสทิ้ง

1.6 ปั่นด้วย vortex mixer ให้กระจายออกจากกัน แล้วค่อยๆ เติมสารทำให้คงสภาพ (fixative 3:1 (ภาคผนวก ก)) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร โดยที่ 1 มิลลิลิตรแรกหยดช้าๆ ทีละหยด แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม ดูดส่วนใสทิ้ง

1.7 เติมสารทำให้คงสภาพ (fixative 2:1 (ภาคผนวก ข)) 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม ดูดส่วนใสทิ้ง

1.8 เติมสารทำให้คงสภาพ (fixative 3:1) 5 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม ดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือสารทำให้คงสภาพอยู่ในหลอดให้น้อยที่สุด

1.9 เติมสารทำให้คงสภาพ (fixative 3:1) ใหม่เพื่อเจือจางส่วนผสมให้เหมาะสมกับการเตรียมสไลด์

2. การเตรียมสไลด์

2.1 วางสไลด์ใหม่ลงบนโต๊ะบริเวณที่เรียบๆ หยดสารทำให้คงสภาพที่เย็นลงบนสไลด์ 1-2 หยด แล้วเช็ดด้วยผ้าก๊อซให้สะอาด

2.2 หยดส่วนผสมของเซลล์กับสารทำให้คงสภาพลงบนสไลด์ 1 หยด

2.3 เมื่อสไลด์แห้งหมาดๆ มองเห็นเป็นสีรุ้ง หยดสารทำให้คงสภาพทับลงไปบนหยดเซลล์อีก 1 หยด

2.4 เมื่อสไลด์แห้งสนิทแล้วจึงนำมาตรวจสอบคุณภาพสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast เลือกสไลด์ที่มีคุณภาพดีไว้ย้อมสีต่อไป

3. การย้อมสีโครโมโซม

วิธีการย้อมสีแบบ Giemsa stained

1. นำสไลด์ (จากข้อ 2. การเตรียมสไลด์) มาย้อมใน 5 % Giemsa เป็นเวลา 10-15 นาที
2. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

วิธีการย้อมสีแบบ Q-banding

1. นำสไลด์ (จากข้อ 2. การเตรียมสไลด์) ที่มีอายุระหว่าง 2-7 วัน
2. แช่สไลด์ใน Methanol (absolute, 75% และ50%) ขั้นละ 5 นาที (เวลาที่เหมาะสมได้จากภาคผนวก ค) ตามลำดับ
3. แช่ในน้ำกลั่น 5 นาที แล้วล้างด้วย McIlvain buffer (pH 7)
4. ย้อมในสารละลาย 10 % Quinacrine 20 นาที
5. ล้างด้วย McIlvain buffer 4 ครั้ง

ปิดด้วย Cover glass โดยใช้ McIlvain buffer เป็นตัวกลาง แล้วใช้ยาทาเล็บทาตามขอบ Cover glass เพื่อผนึก

วิธีการย้อมสีแบบ G-banding

1. สไลด์ที่ต้องการย้อมควรมีอายุ 1-3 วัน นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
2. แช่สไลด์ใน 0.05% Trypsin ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 1-2 วินาที (เวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมได้จากภาคผนวก ค)
3. ล้างสไลด์โดยจุ่มผ่าน Weise buffer (pH 7.2)
4. ย้อมใน 5 % Giemsa นาน 10-15 นาที
5. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

วิธีการย้อมสีแบบ C-banding ดัดแปลงจากวิธีของ Gustashaw (1991)

1. สไลด์ที่ต้องการย้อมควรมีอายุ 2-3 วัน นำมาแช่ใน 0.2 N HCl เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (เวลาที่เหมาะสมได้จากภาคผนวก ค) ที่อุณหภูมิห้อง

2. ล้างผ่านน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งให้แห้ง

3. นำสไลด์ดังกล่าวมาแช่ใน 1% $Ba(OH)_2$ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-40 วินาที (เวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมได้จากภาคผนวก ค)

4. ล้างด้วยน้ำกลั่นอุ่นๆ 2 ครั้ง (แกว่งแรงๆ และล้างทันทีให้หมดตะกอน)

5. แช่ใน 2XSSC (pH 7.0) (ภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

6. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง

7. ย้อมด้วย 5% Giemsa (เตรียมและกรองใหม่) นาน 8-15 นาที

8. ล้างน้ำกลั่นทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการย้อมสีแบบ NOR banding ดัดแปลงจากวิธีของ Goodpasture and Bloom (1975) อ้างตาม Verma (1989)

1. หยด 2% Gelatin solution 2 หยด และ 50% $AgNO_3$ solution 4 หยด ผสมกัน หลังจากนั้นหยดลงบนสไลด์ปิดด้วย Cover glass

2. วางสไลด์บน Warmer ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนสารละลายมีสีน้ำตาลทอง (ประมาณ 2 นาที)

3. เอา Cover glass ออก และล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

4 การนับจำนวนโครโมโซมของปลาค้อแต่ละชนิดที่ศึกษา

ทำการนับจำนวนโครโมโซมในระยะ metaphase ทั้งหมด 100 เซลล์ของปลาแต่ละชนิดที่ทำการศึกษา โดยทำการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์และใช้ camera lucida ช่วยเพื่อความถูกต้องของจำนวนเพราะโครโมโซมมีขนาดเล็กมาก เมื่อนับโครโมโซมครบ 100 เซลล์แล้วจึงทำการเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยถือตามจำนวนโครโมโซมที่มีเปอร์เซนต์สูงสุดในแต่ละชนิดเป็นจำนวนโครโมโซมของปลาค้อชนิดนั้นๆ

5 เปรียบเทียบแถบสีของโครโมโซม

ทำการเปรียบเทียบแถบสีทั้ง 4 แบบ ได้แก่ Q-banding, G-banding, C-banding และ NOR banding ของปลาทุกชนิดที่ทำการศึกษา

6 การถ่ายรูปโครโมโซม

ใช้กล้องจุลทรรศน์ Olympus BH2 โดยใช้ objective lens ที่มีขนาดกำลังขยาย X100 และ eye piece ของกล้องถ่ายรูปกำลังขยาย X3.5 ถ่ายด้วยฟิล์มขาวดำ (Kodak technical pan film ASA160) โดยเลือกถ่ายรูปโครโมโซมในระยะ metaphase ที่กระจายตัวดี และมีจำนวนโครโมโซมครบ อย่างน้อย 10 เซลล์ของปลาแต่ละชนิด

7 การจัดคาริโอไทป์

นำฟิล์มที่โครโมโซมกระจายตัวดีและชัดเจนที่สุดในแต่ละชนิดมาชนิดละ 10 เซลล์ นำไปอัดขยาย วัดความยาวของแขนข้างสั้น (Ls) และความยาวของแขนข้างยาว (Ll) ซึ่งมีหน่วยเป็นความยาวเชิงสัมพัทธ์ โดยวัดจากตำแหน่ง centromere ไปยังปลายโครโมโซมทั้ง 2 ด้าน คำนวณค่า Centromeric index (CI) = Ll/Lt (โดยที่ Lt = total length) ดัดแปลงจากวิธีของ Chen and Ruddle (1970) และ Chen (1971) เรียงลำดับตามความยาว และแบ่งชนิดโครโมโซม (ดังตาราง 2) จับคู่โครโมโซมโดยอาศัยค่า CI ประกอบกับการย้อมสีแบบ G-banding ที่คล้ายกันมากที่สุด จัดเรียงคาริโอไทป์โดยเรียงลำดับจากโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดไปหาคู่ที่สั้นที่สุด

ตาราง 2 การแยกชนิดโครโมโซมปลาค้อโดยใช้ค่า Centromeric index (CI)

ชนิดโครโมโซม	สัญลักษณ์	ช่วง Centromeric Index
Metacentric	m	0.5-0.59
Submetacentric	sm	0.6-0.75
Acrocentric	a	0.76-0.8
Telocentric	t	มากกว่า 0.8

8 การเปรียบเทียบคาริโอไทป์ของปลาค้อแต่ละชนิด

8.1 จำนวนโครโมโซมของเซลล์ร่างกาย

8.2 ชนิดโครโมโซม (chromosome type)

การตรวจชื่อวิทยาศาสตร์ (Identification)

การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของปลาค้อจะนำตัวอย่างปลาที่เก็บรักษาไว้ใน 10% formalin จากข้อ 1.1 มาทำการตรวจสอบโดยใช้เอกสารของ Smith (1945), Kottelat (1990), Rainboth (1996) และ Kottelat (1998) ดังแสดงในภาคผนวก ก

การจัดกลุ่มความใกล้ชิดของปลาค้อ

จัดกลุ่มความใกล้ชิดปลาค้อโดยใช้ลักษณะภายนอกที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิด และใช้ชนิดของโครโมโซมปลาค้อแต่ละชนิด โดยใช้วิธี hierarchical cluster analysis จากโปรแกรม SPSS

บทที่ 4
ผลการศึกษา

1. ผลการสำรวจ และเก็บตัวอย่างปลาค้อ

พบปลาค้อสกุล *Schistura* จากการสำรวจเป็นจำนวนมากจึงเก็บตัวอย่างปลาที่มีชุกชุมจากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิง ระหว่างเดือนสิงหาคม 2542 ถึงเดือนมกราคม 2544 ได้ 11 ชนิด มาตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ ตามวิธีในภาคผนวก ข ได้ผลดังแสดงในตาราง 3

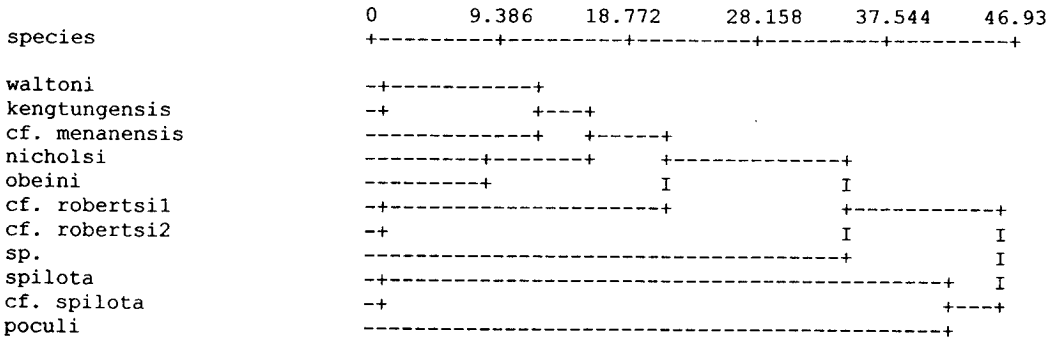
ตาราง 3 ชนิด และแหล่งที่พบปลาค้อที่ใช้ในการศึกษาคาริโอไทป์

ชนิดปลาค้อ	ลุ่มน้ำ	หมายเหตุ
Schistura kengtungensis	6	1= ลุ่มน้ำแม่ปิงตอนบน
Schistura cf. *menanensis*	2	2= ลุ่มน้ำแม่งัด
Schistura nicholsi	11	3= ลุ่มน้ำแม่แตง
Schistura obeini	1, 3	4= ลุ่มน้ำแม่ริม
Schistura poculi	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	5= ลุ่มน้ำแม่ริมตอนกลาง
Schistura cf. *robertsi* 1 *	8	6= ลุ่มน้ำแม่กวง
Schistura cf. *robertsi* 2 *	5	7= ลุ่มน้ำขาน
Schistura spilota	9	8= ลุ่มน้ำแม่ปิงตอนล่าง
Schistura cf. *spilota*	1, 3, 6, 10	9= ลุ่มน้ำแม่กลาง
Schistura waltoni	1	10= ลุ่มน้ำแม่แจ่ม
Schistura sp. **	1	11= ลุ่มน้ำแม่ตื่น

หมายเหตุ * ยังไม่มีรายงานว่าพบที่จังหวัดเชียงใหม่

** คาดว่าเป็นชนิดใหม่

จากลักษณะภายนอก (ภาคผนวก ก) นำมาจัดกลุ่มความใกล้ชิดของปลาค้อโดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยวิธี hierarchical cluster analysis ได้ผลตามรูป 6



รูป 6 การวิเคราะห์การจัดกลุ่มปลาค้อ 11 ชนิด โดยใช้ลักษณะภายนอก ด้วยโปรแกรม SPSS วิธี hierarchical cluster analysis

จากรูป 6 สามารถจัดกลุ่มความใกล้ชิดตามลักษณะภายนอกได้ 6 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *S. waltoni*, *S. kengtungensis* และ *S.* cf. *menanensis*

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *S. nicholsi* และ *S. obeini*

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *S.* cf. *robertsi* 1 และ *S.* cf. *robertsi* 2

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *Schistura* sp.

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *S. spilota* และ *S.* cf. *spilota*

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย *S. poculi*

2. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของปลาค้อที่พบจากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิง

จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมที่ย้อมสีแบบ Giemsa stained ของปลาค้อทุกชนิดจากจำนวนเซลล์ทั้งหมด 100 เซลล์ในปลาแต่ละชนิด พบว่าโครโมโซมของปลาค้อที่นับได้มีความแปรปรวนอยู่ในช่วง 48-54 แท่ง (ตาราง 4) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากจำนวนโครโมโซมที่มีเปอร์เซ็นต์สูงสุดในแต่ละชนิดแล้ว พบว่าปลาค้อส่วนมากมีจำนวนโครโมโซมทั้งหมดเท่ากับ 50 แท่ง ยกเว้น *S. kengtungensis* มีจำนวนโครโมโซมทั้งหมดเท่ากับ 52 แท่ง

ตาราง 4 ผลการวิเคราะห์จำนวนโครโมโซมของปลาค้อที่ตรวจพบจากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิงในระหว่างเดือนสิงหาคม 2542 ถึงเดือนมกราคม 2544

ชนิดปลาค้อ	จำนวนเซลล์ที่นับ	จำนวนเซลล์ที่นับโครโมโซมได้						
		48	49	50	51	52	53	54
S. waltoni	100	3	2	92	1	2		
S. kengtungensis	100	1		4	1	90	3	1
S. cf. *menanensis*	100	5	3	91	1			
S. nicholsi	100	2	1	95	1	1		
S. obeini	100	5	3	92				
S. cf. *robertsi* 1	100	2		96	2			
S. cf. *robertsi* 2	100	2	1	94	3			
Schistura sp.	100	4	1	95				
S. spilota	100	3	2	93	2			
S. cf. *spilota*	100	3	1	96				
S. poculi	100	2	3	94	1			

3. ชนิดของโครโมโซม และรูปแบบคาริโอไทป์ของปลาค้อ

ชนิดของโครโมโซมของปลาค้อซึ่งจัดโดยถือค่า Centromeric index (CI) แบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด คือ metacentric, submetacentric, acrocentric และ telocentric อย่างไรก็ตามโครโมโซมของปลาค้อแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในด้านของรูปแบบคาริโอไทป์ และรูปแบบการติดแถบสีชนิดต่างๆ ดังนี้

1. Schistura waltoni

1.1 จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าร้อยละ 92 ของจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับโครโมโซม มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 50 สรุปว่าปลาชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซม 2n=50 มีความยาวในช่วง 2.0-1.0 μm

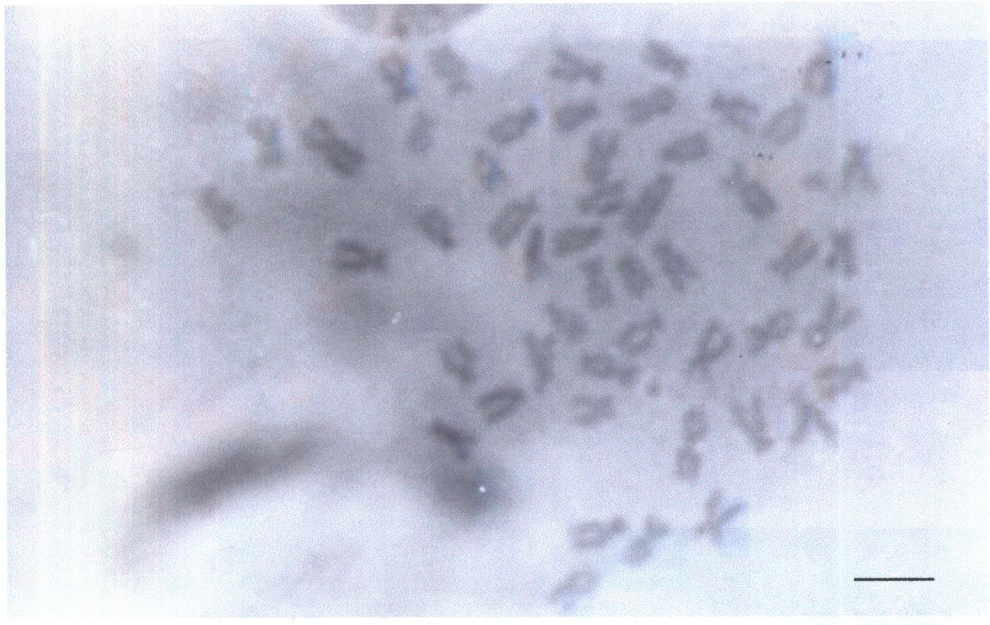
1.2 มีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ metacentric จำนวน 4 คู่ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1, 10, 11 และ 12 โครโมโซมแบบ submetacentric จำนวน 6 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 3, 4, 5, 8, 9 และ 24 โครโมโซมแบบ acrocentric จำนวน 7 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 6, 7, 13, 14, 15, 16 และ 21โครโมโซมแบบ telocentric จำนวน 8 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 2, 17, 18, 19, 20, 22, 23 และ 25 (รูป 7, 8 และตาราง 5)

1.3 จากการย้อมสีแบบ Q- banding ไม่พบ band ที่ชัดเจนเกิดขึ้น (รูป 9 B)

1.4 จากการย้อมสีแบบ G-banding พบว่าโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric และ acrocentric บางคู่มี band ทั้ง 2 แขนที่กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 และ 21 โครโมโซมแบบ telocentric บางคู่มี band กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 2, 17, 18, 19, 22, 23 และ 25 (รูป 9 C และ 10)

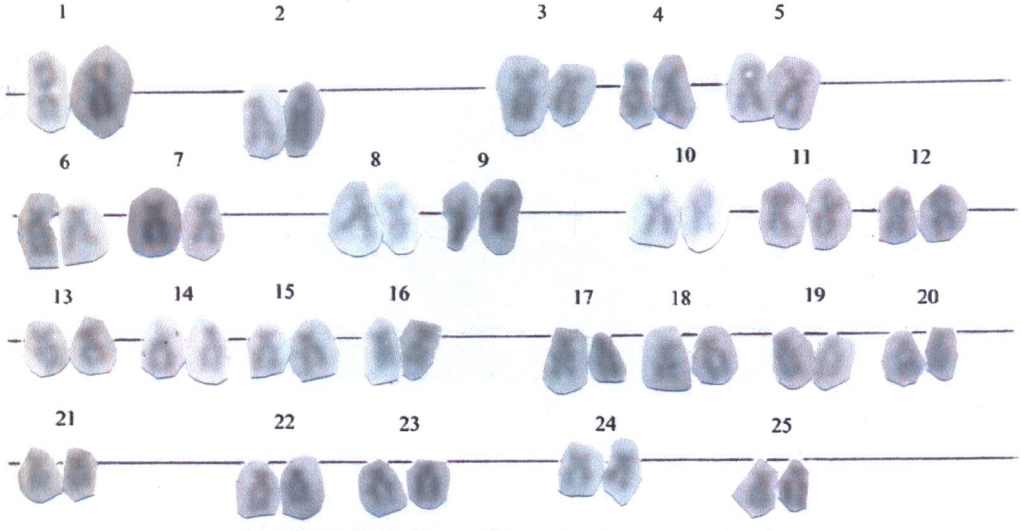
1.5 จากการย้อมสีแบบ C-banding พบว่ามีโครโมโซมบางคู่มี band เกิดขึ้นชัดเจน ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 4, 10 และ 11 พบ band เกิดขึ้นบริเวณ centromere และโครโมโซมคู่ที่ 3, 5, 6 และ 7 พบ band บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซม (รูป 9 D และ 10)

1.6 จากการย้อมสีแบบ NOR banding พบว่าแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 3 ปรากฏ NOR band ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเมื่อย้อมด้วยวิธี C-banding จะติดสีเข้มที่บริเวณเดียวกัน (รูป 9 E และ 10)

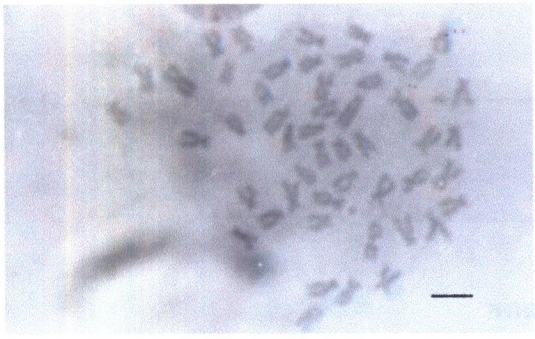


(scale bar = 2μm)

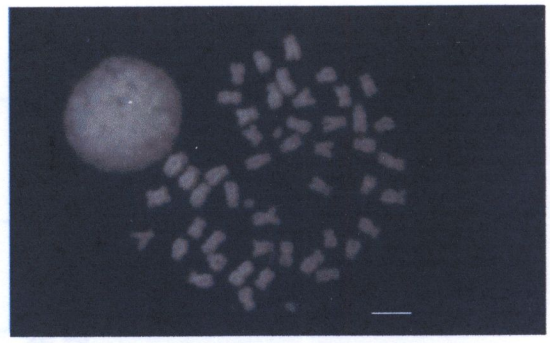
รูป 7 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura waltoni* ย้อมสีแบบ Giemsa stained



รูป 8 คาริโอไทป์ของ *Schistura waltoni* ซึ่งประกอบด้วย 8m+12sm+14a+16t (2n=50)

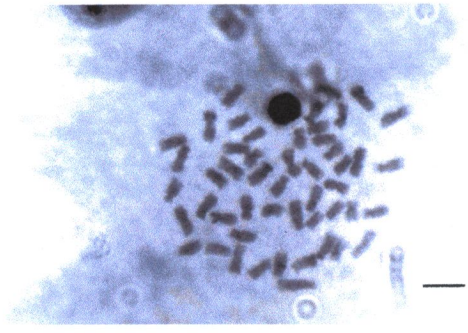


A

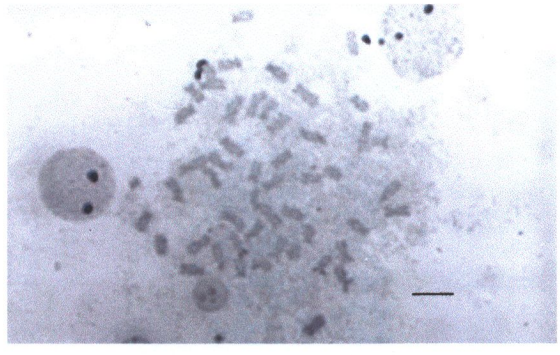


B

C



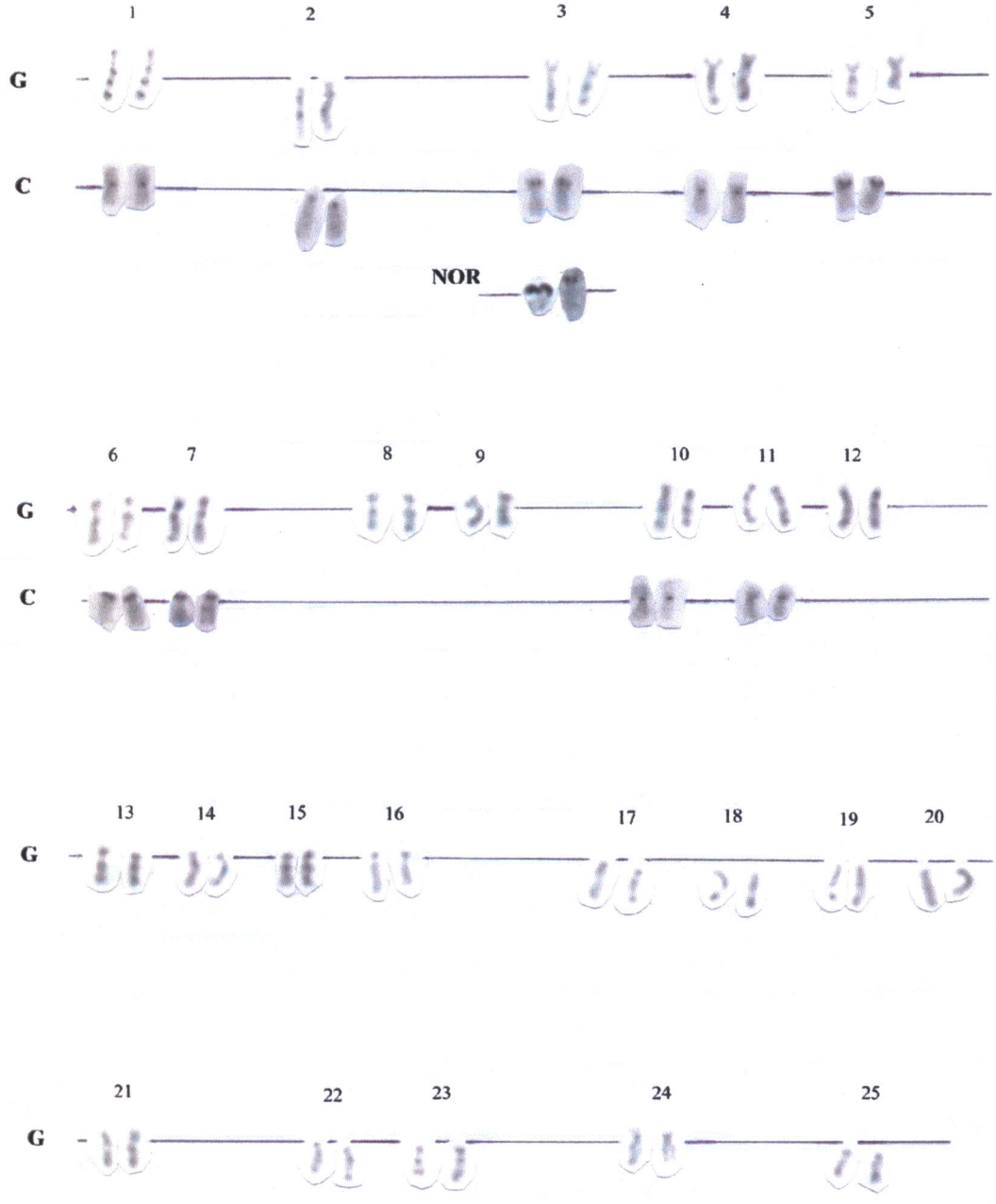
D



E (scale bar = 2μm)

รูป 9 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura waltoni*

A) Giemsa stained, B) Q-banding, C) G-banding, D) C-banding, E) NOR banding



รูป 10 คาริโอไทป์ของ *Schistura waltoni* ย้อมสีแบบพิเศษ

G: G-banding, C: C-banding และ NOR: NOR banding

ตาราง 5 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura waltoni* จำนวน 10 เซลล์

Chromosome pair	Ls ± SD	Ll ± SD	Lt ± SD	CI ± SD	Type
1	5.180 ± 0.040	5.220 ± 0.040	10.40 ± 0.063	0.502 ± 0.204	m
2	0.000 ± 0.000	10.28 ± 0.040	10.28 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
3	2.960 ± 0.120	6.840 ± 0.080	9.800 ± 0.126	0.698 ± 0.281	sm
4	3.060 ± 0.080	6.360 ± 0.080	9.420 ± 0.117	0.675 ± 0.273	sm
5	2.460 ± 0.120	6.340 ± 0.080	8.800 ± 0.126	0.721 ± 0.290	sm
6	1.800 ± 0.000	6.660 ± 0.049	8.460 ± 0.049	0.787 ± 0.321	a
7	1.780 ± 0.040	6.460 ± 0.080	8.240 ± 0.102	0.784 ± 0.319	a
8	2.320 ± 0.194	5.600 ± 0.000	7.920 ± 0.194	0.707 ± 0.281	sm
9	3.000 ± 0.000	4.740 ± 0.080	7.740 ± 0.080	0.612 ± 0.249	sm
10	3.400 ± 0.167	4.200 ± 0.000	7.600 ± 0.167	0.553 ± 0.220	m
11	3.420 ± 0.040	4.000 ± 0.000	7.420 ± 0.040	0.539 ± 0.219	m
12	3.100 ± 0.000	4.300 ± 0.000	7.400 ± 0.000	0.581 ± 0.237	m
13	1.700 ± 0.000	5.660 ± 0.049	7.360 ± 0.049	0.769 ± 0.313	a
14	1.600 ± 0.000	5.700 ± 0.063	7.300 ± 0.063	0.781 ± 0.318	a
15	1.500 ± 0.000	5.660 ± 0.080	7.160 ± 0.080	0.790 ± 0.322	a
16	1.440 ± 0.049	5.500 ± 0.063	6.940 ± 0.102	0.793 ± 0.321	a
17	0.000 ± 0.000	6.880 ± 0.098	6.880 ± 0.098	1.000 ± 0.408	t
18	0.000 ± 0.000	6.540 ± 0.080	6.540 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
19	0.000 ± 0.000	6.480 ± 0.040	6.480 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
20	0.000 ± 0.000	6.400 ± 0.000	6.400 ± 0.000	1.000 ± 0.408	t
21	1.500 ± 0.000	4.820 ± 0.040	6.320 ± 0.040	0.763 ± 0.311	a
22	0.000 ± 0.000	6.140 ± 0.049	6.140 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t
23	0.000 ± 0.000	5.980 ± 0.040	5.980 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
24	1.940 ± 0.120	3.900 ± 0.089	5.840 ± 0.102	0.668 ± 0.264	sm
25	0.000 ± 0.000	5.260 ± 0.120	5.260 ± 0.120	1.000 ± 0.408	t

2. *Schistura kengtungensis*

2.1 จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าร้อยละ 90 ของจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับโครโมโซม มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 52 สรุปว่าปลาชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซม 2n=52 มีความยาวในช่วง 1.5-0.6 μm

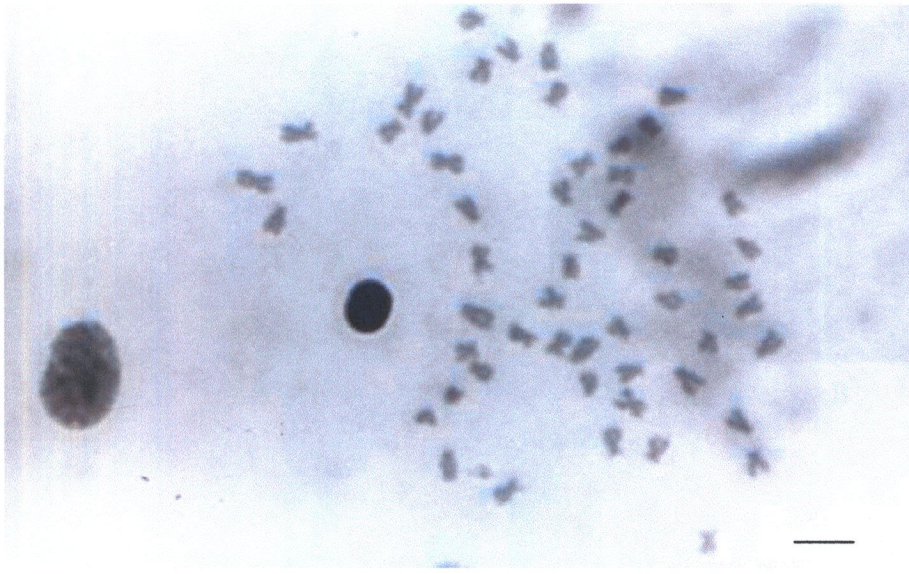
2.2 มีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ metacentric จำนวน 3 คู่ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 2, 3 และ 12 โครโมโซมแบบ submetacentric จำนวน 5 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 13, 14, 22 และ 23 โครโมโซมแบบ acrocentric จำนวน 4 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 9, 15, 16 และ 17 โครโมโซมแบบ telocentric จำนวน 14 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 4, 5, 6, 7, 8, 10, 18, 19, 20, 21, 24, 25 และ 26 (รูป 11, 12 และตาราง 6)

2.3 จากการย้อมสีแบบ Q- banding ไม่พบ band ที่ชัดเจนเกิดขึ้น (รูป 13 B)

2.4 จากการย้อมสีแบบ G-banding พบว่าโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric และ acrocentric บางคู่มี band ทั้ง 2 แขนที่กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 3, 9, 12, 15 และ 17 โครโมโซมแบบ telocentric บางคู่มี band กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 4, 5, 6, 7, 8, 11, 19, 21 และ 25 (รูป 13 C และ 14)

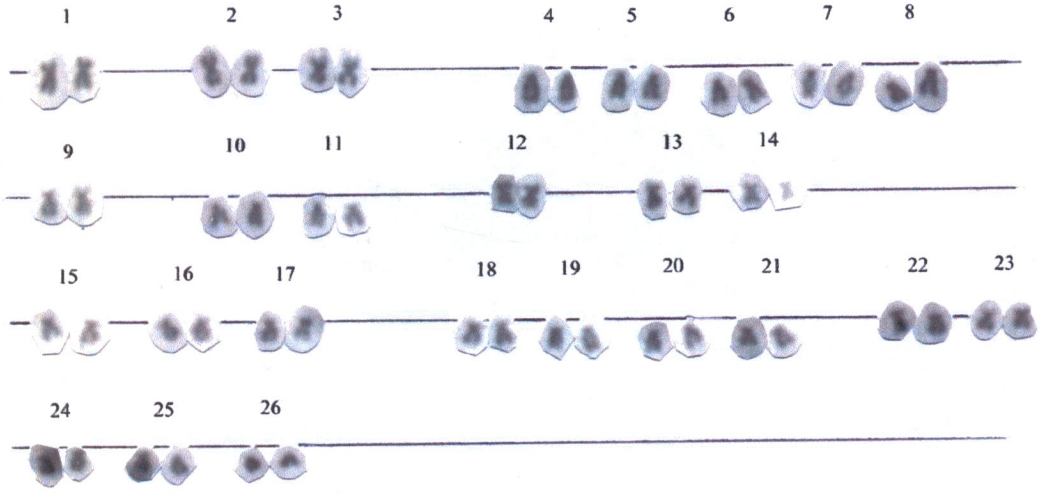
2.5 จากการย้อมสีแบบ C-banding พบว่ามีโครโมโซมบางคู่มี band เกิดขึ้นชัดเจน ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 5, 6 และ 12 พบ band เกิดขึ้นบริเวณ centromere โครโมโซมคู่ที่ 15 มี band เกิดขึ้นบริเวณตรงกลางของแขนข้างยาวของโครโมโซม โครโมโซมคู่ที่ 4 พบว่ามี band ขนาดใหญ่ที่บริเวณปลายแขนข้างยาวของโครโมโซม (telomere) และโครโมโซมคู่ที่ 9 และ 13 พบ band บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซม (รูป 13 D และ 14)

2.6 จากการย้อมสีแบบ NOR banding พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 4 ปรากฏ NOR band บริเวณปลายแขนของโครโมโซมแบบ telocentric ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเมื่อย้อมด้วยวิธี C-banding จะติดสีเข้มที่บริเวณเดียวกัน (รูป 13 E และ 14)

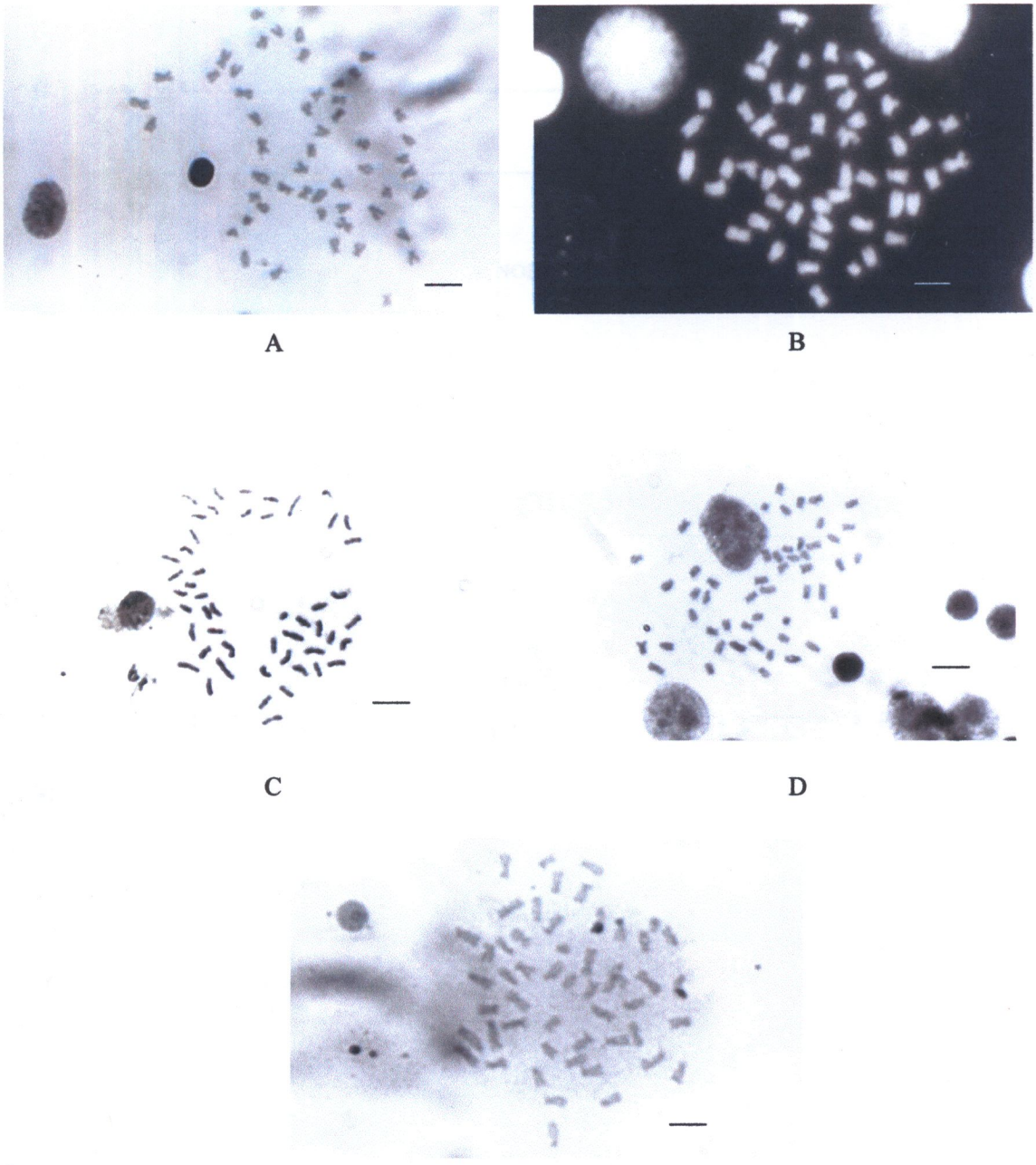


(scale bar = 2μm)

รูป 11 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura kengtungensis* ย้อมสีแบบ Giemsa stained

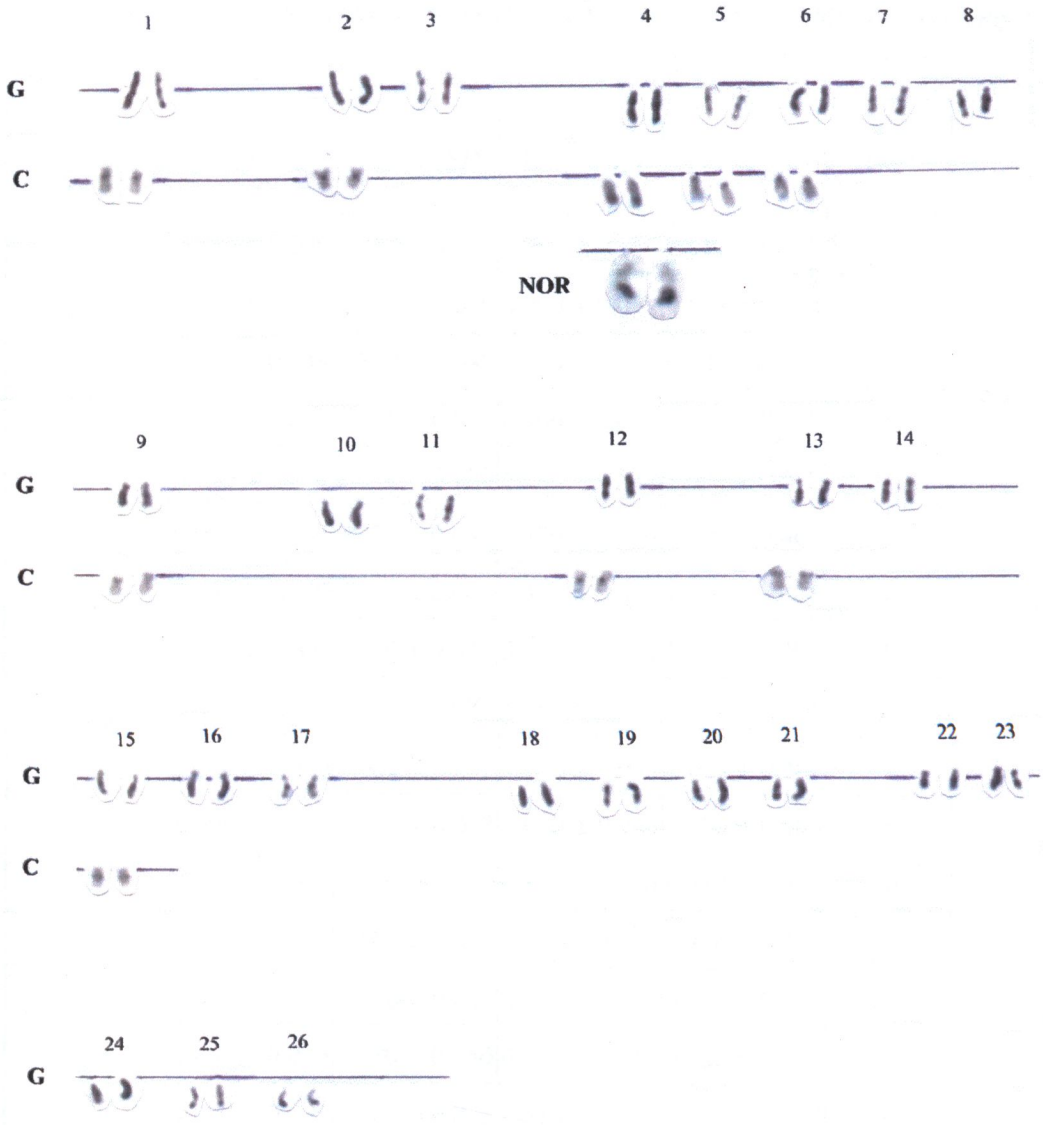


รูป 12 คาริโอไทป์ของ *Schistura kengtungensis* ซึ่งประกอบด้วย 6m+10sm+8a+28t (2n=52)



รูป 13 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura kengtungensis*

A) Giemsa stained, B) Q-banding, C) G-banding, D) C-banding, E) NOR banding



รูป 14 คาริโอไทป์ของ *Schistura kengtungensis* ย้อมสีแบบพิเศษ

G: G-banding, C: C-banding และ NOR: NOR banding

ตาราง 6 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura kengtungensis* จำนวน 10 เซลล์

Chromosome pair	Ls ± SD	Ll ± SD	Lt ± SD	CI ± SD	Type
1	2.700 ± 0.000	4.360 ± 0.136	7.060 ± 0.136	0.617 ± 0.250	sm
2	3.400 ± 0.000	3.500 ± 0.089	6.900 ± 0.089	0.507 ± 0.205	m
3	3.060 ± 0.049	3.320 ± 0.040	6.380 ± 0.075	0.520 ± 0.211	m
4	0.000 ± 0.000	6.060 ± 0.080	6.060 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
5	0.000 ± 0.000	5.840 ± 0.120	5.840 ± 0.120	1.000 ± 0.408	t
6	0.000 ± 0.000	5.720 ± 0.040	5.720 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
7	0.000 ± 0.000	5.440 ± 0.049	5.440 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t
8	0.000 ± 0.000	5.320 ± 0.040	5.320 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
9	1.200 ± 0.000	4.080 ± 0.075	5.280 ± 0.075	0.773 ± 0.314	a
10	0.000 ± 0.000	5.080 ± 0.098	5.080 ± 0.098	1.000 ± 0.408	t
11	0.000 ± 0.000	5.000 ± 0.063	5.000 ± 0.063	1.000 ± 0.408	t
12	2.400 ± 0.000	2.520 ± 0.040	4.920 ± 0.040	0.512 ± 0.208	m
13	1.220 ± 0.040	3.580 ± 0.040	4.800 ± 0.000	0.746 ± 0.301	sm
14	1.320 ± 0.040	3.380 ± 0.040	4.700 ± 0.000	0.719 ± 0.290	sm
15	1.000 ± 0.000	3.680 ± 0.040	4.680 ± 0.040	0.786 ± 0.320	a
16	1.000 ± 0.000	3.580 ± 0.075	4.580 ± 0.075	0.782 ± 0.318	a
17	0.960 ± 0.080	3.580 ± 0.040	4.540 ± 0.102	0.789 ± 0.316	a
18	0.000 ± 0.000	4.480 ± 0.040	4.480 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
19	0.000 ± 0.000	4.380 ± 0.040	4.380 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
20	0.000 ± 0.000	4.240 ± 0.080	4.240 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
21	0.000 ± 0.000	4.180 ± 0.075	4.180 ± 0.075	1.000 ± 0.408	t
22	1.420 ± 0.040	2.660 ± 0.049	4.080 ± 0.075	0.652 ± 0.263	sm
23	1.120 ± 0.040	2.820 ± 0.040	3.940 ± 0.049	0.716 ± 0.289	sm
24	0.000 ± 0.000	3.780 ± 0.040	3.780 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
25	0.000 ± 0.000	3.540 ± 0.174	3.540 ± 0.174	1.000 ± 0.408	t
26	0.000 ± 0.000	3.040 ± 0.174	3.040 ± 0.174	1.000 ± 0.408	t

3. *Schistura* cf. *menanensis*

3.1 จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าร้อยละ 91 ของจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับโครโมโซม มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 50 สรุปว่าปลาชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซม 2n=50 มีความยาวในช่วง 2.0-1.2 μm

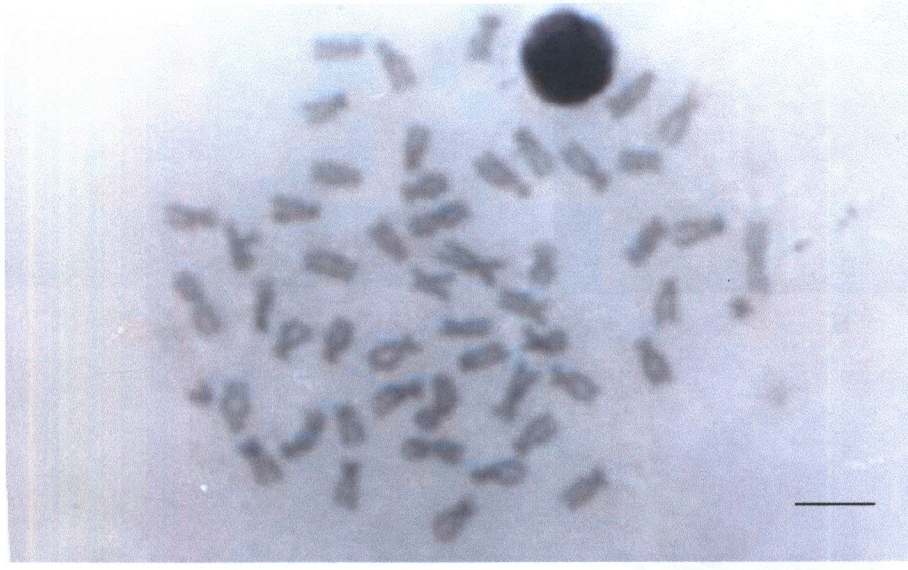
3.2 มีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ metacentric จำนวน 4 คู่ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 15 และ 25 โครโมโซมแบบ submetacentric จำนวน 6 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 3, 4, 5, 9, 10 และ 22 โครโมโซมแบบ acrocentric จำนวน 8 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 6, 8, 11, 12, 14, 16, 17 และ 18 โครโมโซมแบบ telocentric จำนวน 7 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 7, 13, 19, 20, 21, 23 และ 24 (รูป 15, 16 และตาราง 7)

3.3 จากการย้อมสีแบบ Q- banding ไม่พบ band ที่ชัดเจนเกิดขึ้น (รูป 17 B)

3.4 จากการย้อมสีแบบ G-banding พบว่าโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric และ acrocentric บางคู่มี band ทั้ง 2 แขนที่กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18 และ 25 โครโมโซมแบบ telocentric บางคู่มี band กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 13, 20, 21 และ 23 (รูป 17 C และ 18)

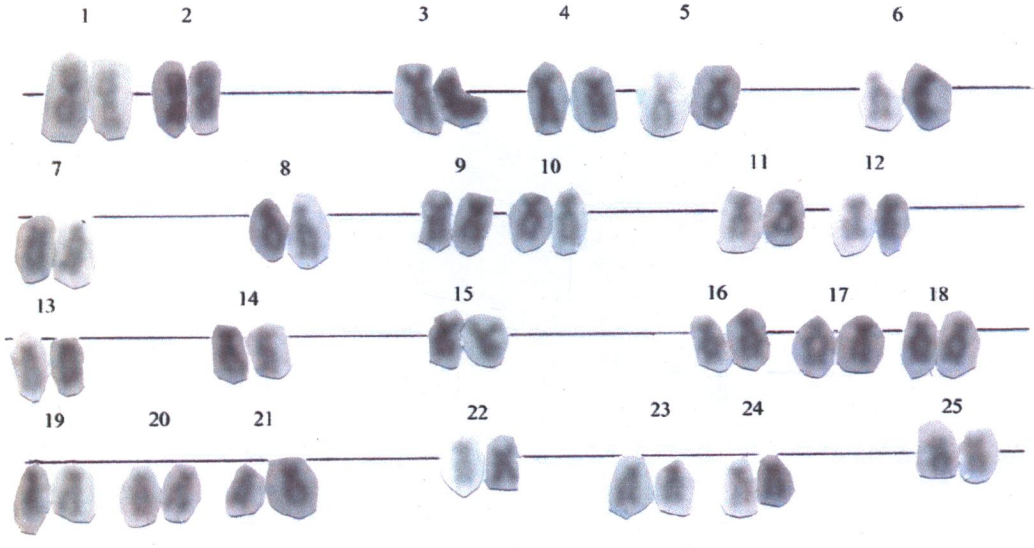
3.5 จากการย้อมสีแบบ C-banding พบว่ามีโครโมโซมบางคู่มี band เกิดขึ้นชัดเจน ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 5, 7 และ 15 พบ band เกิดขึ้นบริเวณ centromere และโครโมโซมคู่ที่ 3, 4, 6 และ 8 พบ band บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซม (รูป 17 D และ 18)

3.6 จากการย้อมสีแบบ NOR banding พบว่าแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 3 ปรากฏ NOR band ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเมื่อย้อมด้วยวิธี C-banding จะติดสีเข้มที่บริเวณเดียวกัน (รูป 17 E และ 18)

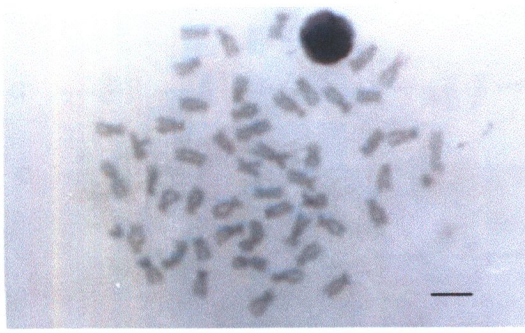


(scale bar = 2μm)

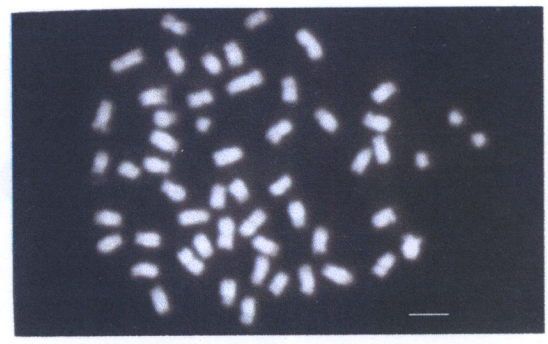
รูป 15 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *menanensis* ย้อมสีแบบ Giemsa stained



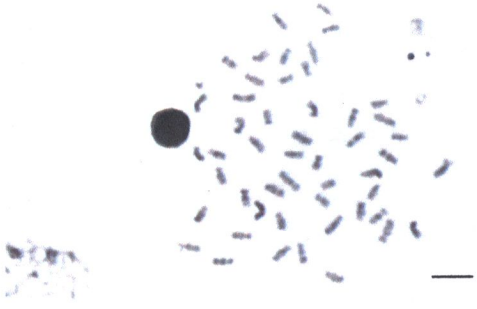
รูป 16 คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *menanensis* ซึ่งประกอบด้วย 8m+12sm+16a+14t (2n=50)



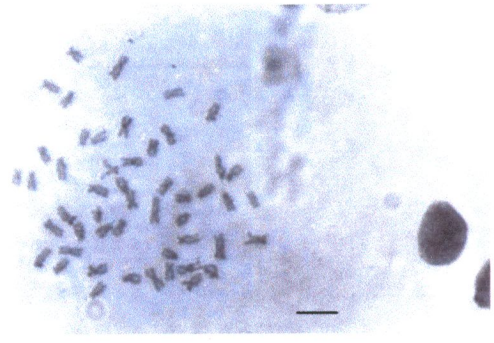
A



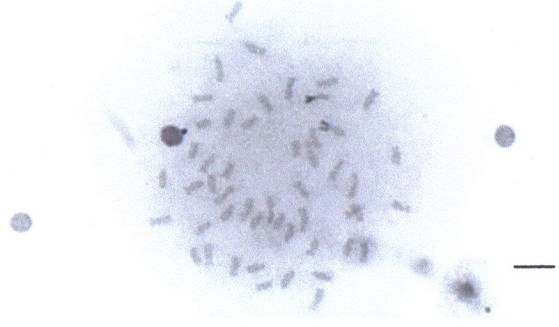
B



C



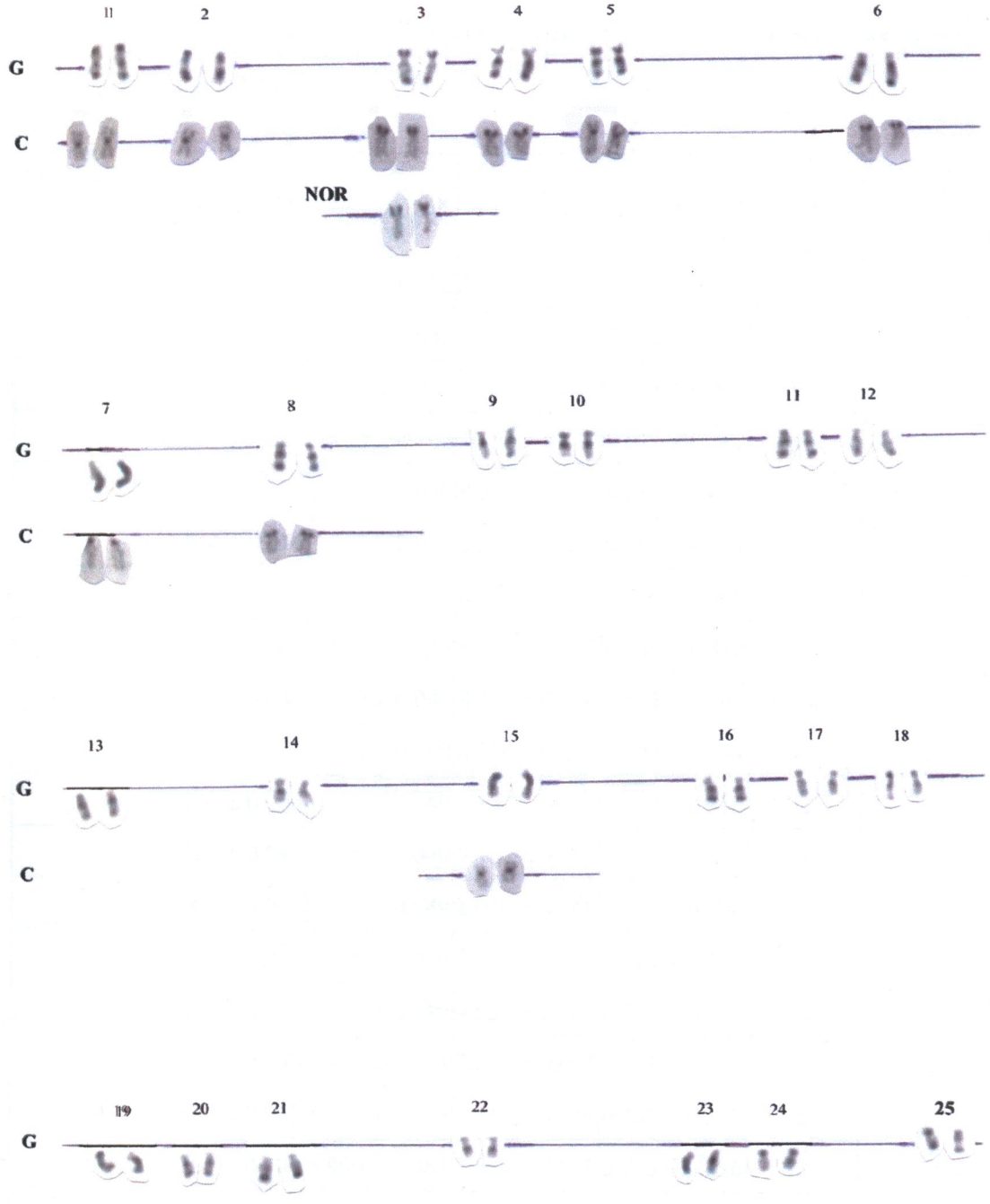
D



E (scale bar = 2μm)

รูป 17 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *menanensis*

A) Giemsa stained, B) Q-banding, C) G-banding, D) C-banding, E) NOR banding



รูป 18 คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *menanensis* ย้อมสีแบบพิเศษ

G: G-banding, C: C-banding และ NOR: NOR banding

ตาราง 7 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura* cf. *menanensis* จำนวน 10 เซลล์

Chromosome pair	Ls ± SD	LI ± SD	Lt ± SD	CI ± SD	Type
1	5.580 ± 0.075	5.780 ± 0.075	11.36 ± 0.150	0.509 ± 0.208	m
2	4.840 ± 0.102	5.720 ± 0.040	10.56 ± 0.102	0.542 ± 0.218	m
3	4.020 ± 0.040	6.320 ± 0.075	10.34 ± 0.102	0.611 ± 0.248	sm
4	3.320 ± 0.040	6.760 ± 0.102	10.08 ± 0.117	0.671 ± 0.272	sm
5	3.120 ± 0.147	6.660 ± 0.080	9.780 ± 0.133	0.681 ± 0.273	sm
6	1.940 ± 0.049	7.360 ± 0.080	9.300 ± 0.089	0.791 ± 0.321	a
7	0.000 ± 0.000	8.940 ± 0.049	8.940 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t
8	2.020 ± 0.040	6.580 ± 0.133	8.600 ± 0.167	0.765 ± 0.312	a
9	3.420 ± 0.040	5.020 ± 0.040	8.440 ± 0.080	0.595 ± 0.242	sm
10	2.500 ± 0.063	5.820 ± 0.040	8.320 ± 0.098	0.700 ± 0.284	sm
11	1.900 ± 0.000	6.340 ± 0.049	8.240 ± 0.049	0.769 ± 0.314	a
12	1.720 ± 0.040	6.380 ± 0.040	8.100 ± 0.063	0.788 ± 0.320	a
13	0.000 ± 0.000	8.040 ± 0.049	8.040 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t
14	1.800 ± 0.000	6.180 ± 0.040	7.980 ± 0.040	0.774 ± 0.316	a
15	3.420 ± 0.040	4.480 ± 0.040	7.900 ± 0.063	0.567 ± 0.230	m
16	1.700 ± 0.000	6.100 ± 0.063	7.800 ± 0.063	0.782 ± 0.319	a
17	1.800 ± 0.000	5.940 ± 0.049	7.740 ± 0.049	0.767 ± 0.313	a
18	1.700 ± 0.000	5.900 ± 0.063	7.600 ± 0.063	0.776 ± 0.316	a
19	0.000 ± 0.000	7.520 ± 0.040	7.520 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
20	0.000 ± 0.000	7.480 ± 0.040	7.480 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
21	0.000 ± 0.000	7.340 ± 0.049	7.340 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t
22	2.020 ± 0.040	5.060 ± 0.080	7.080 ± 0.098	0.715 ± 0.290	sm
23	0.000 ± 0.000	7.040 ± 0.049	7.040 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t
24	0.000 ± 0.000	7.000 ± 0.000	6.980 ± 0.040	1.003 ± 0.407	t
25	3.300 ± 0.000	3.520 ± 0.040	6.820 ± 0.040	0.516 ± 0.210	m

4. *Schistura nicholsi*

4.1 จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าร้อยละ 95 ของจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับโครโมโซม มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 50 สรุปว่าปลาชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซม 2n=50 มีความยาวในช่วง 2.2-1.0 μm

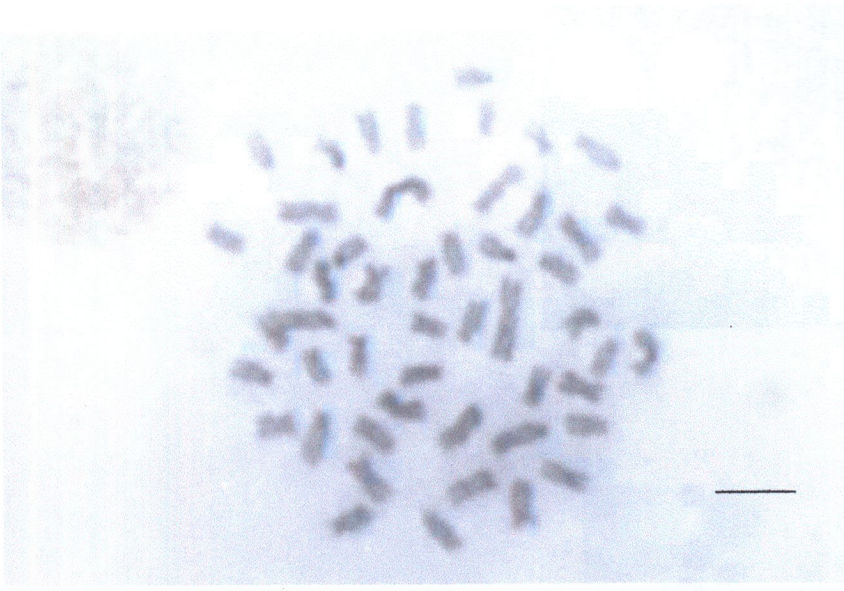
4.2 มีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ metacentric จำนวน 3 คู่ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 4, 8 และ 12 โครโมโซมแบบ submetacentric จำนวน 8 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 5, 6, 10, 13, 19 และ 24 โครโมโซมแบบ acrocentric จำนวน 4 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 9, 17, 18 และ 25โครโมโซมแบบ telocentric จำนวน 10 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 3, 7, 11, 14, 15, 16, 20, 21, 22 และ 23 (รูป 19, 20 และตาราง 8)

4.3 จากการย้อมสีแบบ Q- banding ไม่พบ band ที่ชัดเจนเกิดขึ้น (รูป 21 B)

4.4 จากการย้อมสีแบบ G-banding พบว่าโครโมโซมแบบ metacentric และ submetacentric บางคู่มี band ทั้ง 2 แขนที่กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1, 6, 19 และ 24 โครโมโซมแบบ telocentric บางคู่มี band กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 3, 11, 15, 16, 21 และ 22 (รูป 21 C และ 22)

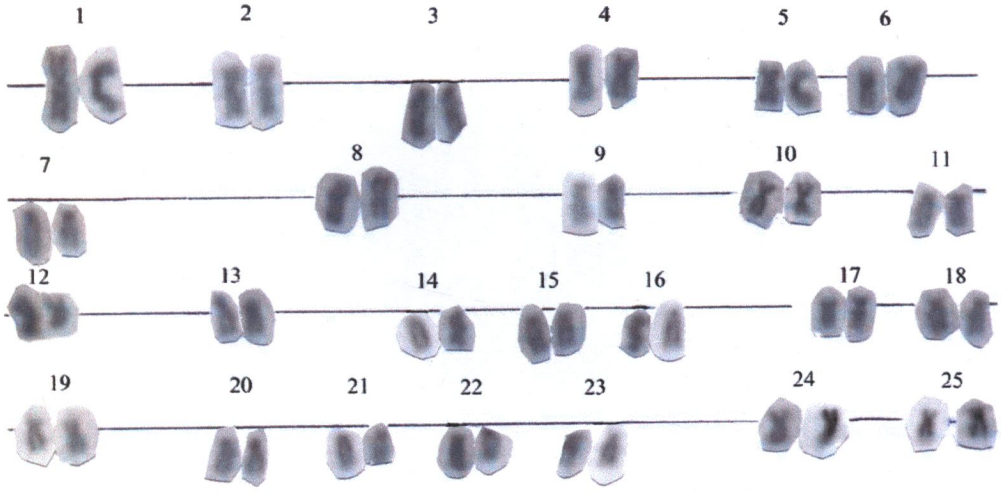
4.5 จากการย้อมสีแบบ C-banding พบว่ามีโครโมโซมบางคู่มี band เกิดขึ้นชัดเจน ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 3, 4, 6, 7 และ 8 พบ band เกิดขึ้นบริเวณ centromere โครโมโซมคู่ที่ 1 พบว่ามี band ขนาดใหญ่ตลอดความยาวของแขนข้างยาวของโครโมโซม และโครโมโซมคู่ที่ 2, 5, 9 และ 10 พบ band บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซม (รูป 21 D และ 22)

4.6 จากการย้อมสีแบบ NOR banding พบว่าแขนข้างสั้นโครโมโซมคู่ที่ 2 ปรากฏ NOR band ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเมื่อย้อมด้วยวิธี C-banding จะติดสีเข้มที่บริเวณเดียวกัน (รูป 21 E และ 22)

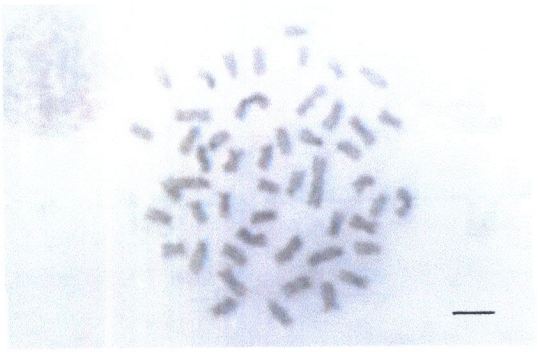


(scale bar = 2μm)

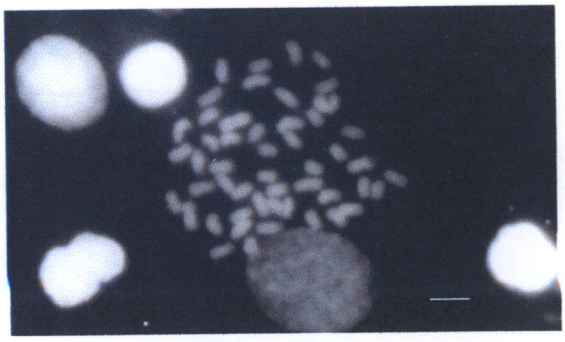
รูป 19 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura nicholsi* ย้อมสีแบบ Giemsa stained



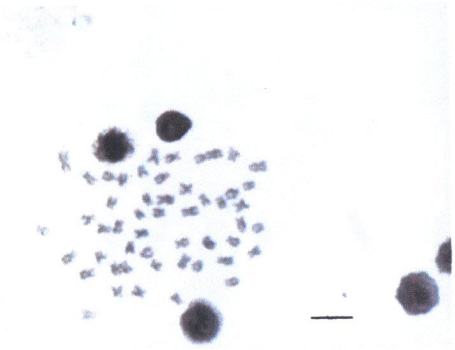
รูป 20 คาริโอไทป์ของ *Schistura nicholsi* ซึ่งประกอบด้วย 6m+16sm+8a+20t (2n=50)



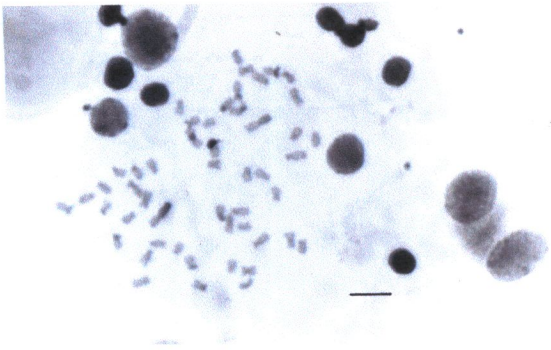
A



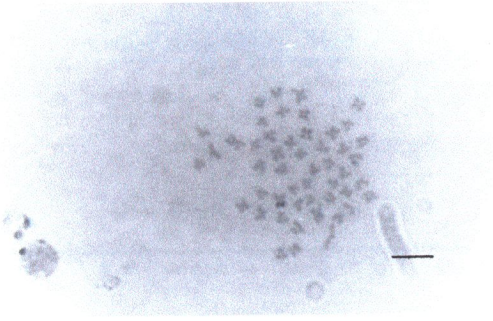
B



C



D

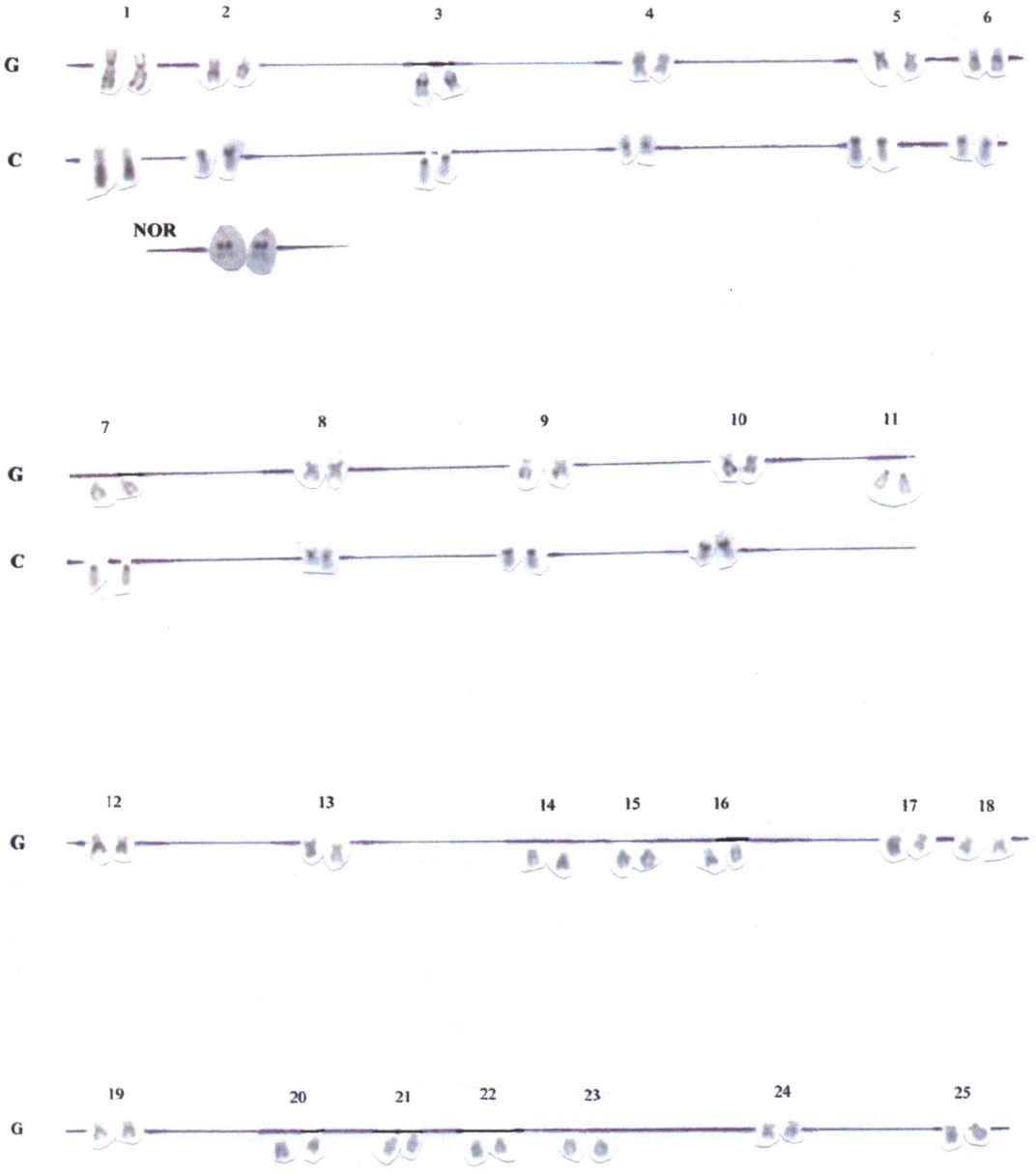


E

(scale bar = 2μm)

รูป 21 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura nicholsi*

A) Giemsa stained, B) Q-banding, C) G-banding, D) C-banding, E) NOR banding



รูป 22 คาริโอไทป์ของ *Schistura nicholsi* ย้อมสีแบบพิเศษ

G: G-banding, C: C-banding และ NOR: NOR banding

ตาราง 8 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura nicholsi* จำนวน 10 เซลล์

Chromosome pair	Ls ± SD	Ll ± SD	Lt ± SD	CI ± SD	Type
1	5.120 ± 0.248	8.820 ± 0.194	13.94 ± 0.102	0.633 ± 0.254	sm
2	3.840 ± 0.102	6.860 ± 0.080	10.70 ± 0.126	0.641 ± 0.259	sm
3	0.000 ± 0.000	10.42 ± 0.040	10.42 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
4	4.460 ± 0.080	5.800 ± 0.000	10.26 ± 0.080	0.565 ± 0.229	m
5	4.020 ± 0.040	6.140 ± 0.102	10.16 ± 0.102	0.604 ± 0.245	sm
6	3.580 ± 0.312	6.120 ± 0.312	9.700 ± 0.000	0.631 ± 0.248	sm
7	0.000 ± 0.000	9.440 ± 0.049	9.440 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t
8	4.540 ± 0.049	4.600 ± 0.000	9.140 ± 0.049	0.503 ± 0.204	m
9	2.180 ± 0.040	6.880 ± 0.075	9.060 ± 0.102	0.759 ± 0.309	a
10	3.260 ± 0.120	5.560 ± 0.080	8.820 ± 0.117	0.630 ± 0.253	sm
11	0.000 ± 0.000	8.600 ± 0.000	8.600 ± 0.000	1.000 ± 0.408	t
12	4.120 ± 0.040	4.300 ± 0.063	8.420 ± 0.075	0.511 ± 0.207	m
13	3.040 ± 0.049	5.220 ± 0.040	8.260 ± 0.049	0.632 ± 0.256	sm
14	0.000 ± 0.000	8.000 ± 0.063	8.000 ± 0.063	1.000 ± 0.408	t
15	0.000 ± 0.000	7.920 ± 0.040	7.920 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
16	0.000 ± 0.000	7.800 ± 0.000	7.800 ± 0.000	1.000 ± 0.408	t
17	1.780 ± 0.040	6.000 ± 0.000	7.780 ± 0.040	0.771 ± 0.313	a
18	1.720 ± 0.040	5.920 ± 0.040	7.640 ± 0.049	0.775 ± 0.314	a
19	2.600 ± 0.000	4.820 ± 0.075	7.420 ± 0.075	0.650 ± 0.264	sm
20	0.000 ± 0.000	7.300 ± 0.000	7.300 ± 0.000	1.000 ± 0.408	t
21	0.000 ± 0.000	7.120 ± 0.040	7.120 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
22	0.000 ± 0.000	7.040 ± 0.049	7.040 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t
23	0.000 ± 0.000	6.920 ± 0.040	6.920 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
24	1.920 ± 0.040	4.760 ± 0.080	6.680 ± 0.075	0.713 ± 0.288	sm
25	1.480 ± 0.040	4.880 ± 0.075	6.360 ± 0.102	0.767 ± 0.312	a

5. *Schistura obeini*

5.1 จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าร้อยละ 92 ของจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับโครโมโซม มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 50 สรุปว่าปลาชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซม 2n=50 มีความยาวในช่วง 1.6-0.8 μm

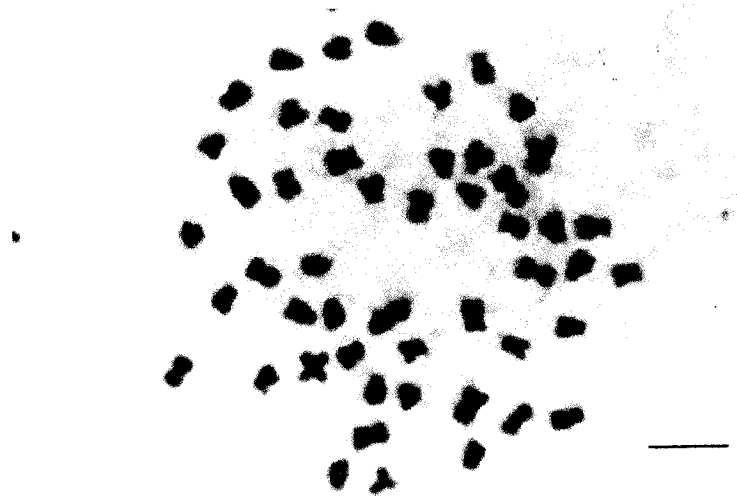
5.2 มีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ metacentric จำนวน 6 คู่ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 4, 5, 6 และ 12 โครโมโซมแบบ submetacentric จำนวน 5 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 3, 13, 19, 20 และ 21 โครโมโซมแบบ acrocentric จำนวน 2 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 7 และ 15 โครโมโซมแบบ telocentric จำนวน 12 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 8, 9, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 22, 23, 24 และ 25 (รูป 23, 24 และตาราง 9)

5.3 จากการย้อมสีแบบ Q- banding ไม่พบ band ที่ชัดเจนเกิดขึ้น (รูป 25 B)

5.4 จากการย้อมสีแบบ G-banding พบว่าโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric และ acrocentric บางคู่มี band ทั้ง 2 แขนที่กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 3, 4, 15 และ 20 โครโมโซมแบบ telocentric บางคู่มี band กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 10, 16, 23 และ 24 (รูป 25 C และ 26)

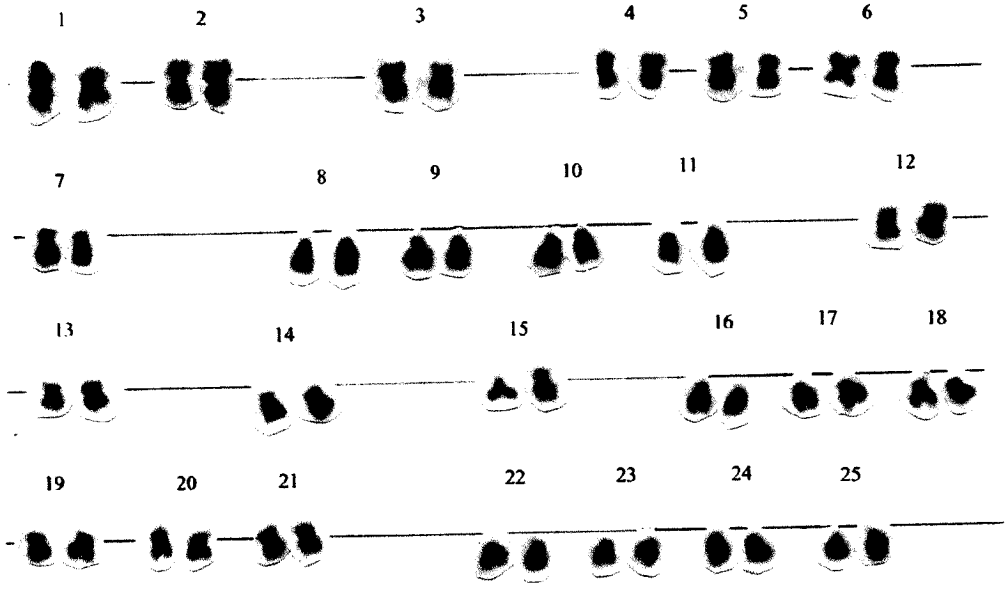
5.5 จากการย้อมสีแบบ C-banding พบว่ามีโครโมโซมบางคู่มี band เกิดขึ้นชัดเจน ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 4, 5, 8, 9, 11 และ 23 พบ band เกิดขึ้นบริเวณ centromere โครโมโซมคู่ที่ 10 มี band เกิดขึ้นบริเวณตรงกลางของแขนของโครโมโซม โครโมโซมคู่ที่ 1 และ 2 พบว่ามี band ตลอดความยาวของแขนข้างยาวของโครโมโซม โครโมโซมคู่ที่ 3, 13 และ 19 พบ band บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซม และโครโมโซมคู่ที่ 7 และ15 พบ band บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซมและบริเวณแขนข้างยาวของโครโมโซมใกล้ตำแหน่ง centromere (รูป 25 D และ 26)

5.6 จากการย้อมสีแบบ NOR banding พบว่าปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 3 ปรากฏ NOR band ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเมื่อย้อมด้วยวิธี C-banding จะติดสีเข้มที่บริเวณเดียวกัน (รูป 25 E และ 26)

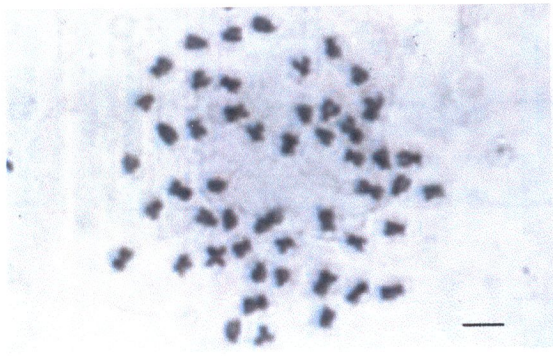


(scale bar = 2μm)

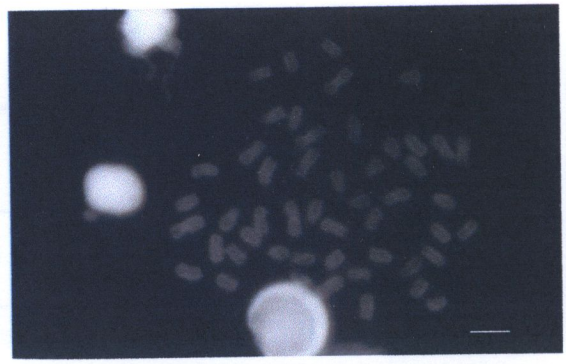
รูป 23 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura obeini* ย้อมสีแบบ Giemsa stained



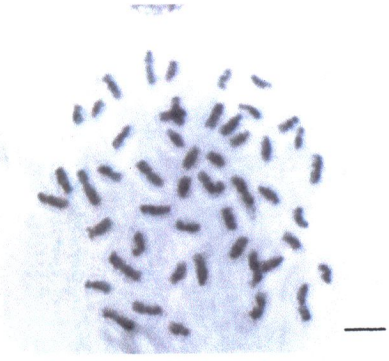
รูป 24 คาริโอไทป์ของ *Schistura obeini* ซึ่งประกอบด้วย 12m+10sm+4a+24t (2n=50)



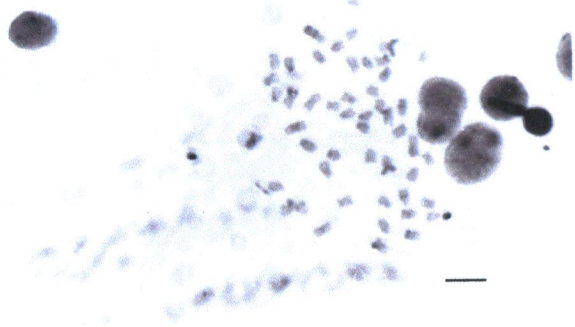
A



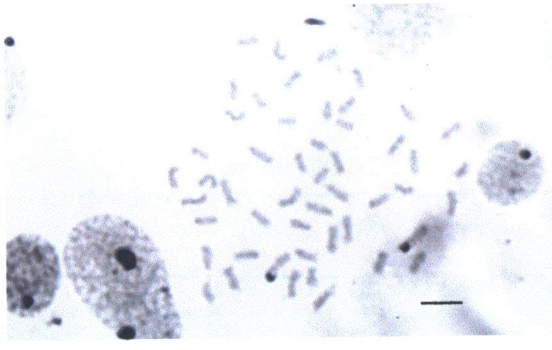
B



C



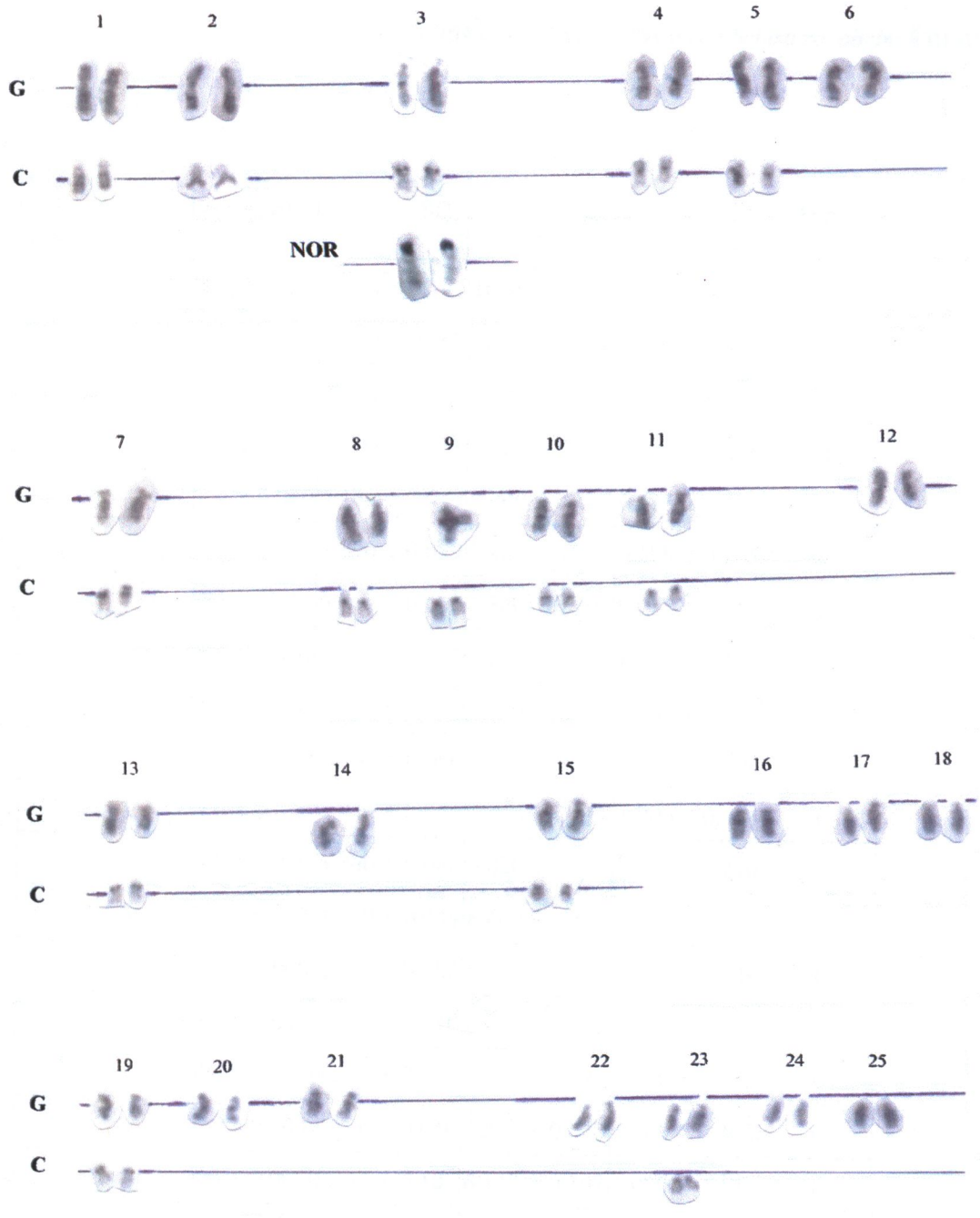
D



E (scale bar = 2μm)

รูป 25 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura obeini*

A) Giemsa stained, B) Q-banding, C) G-banding, D) C-banding, E) NOR banding



รูป 26 คาริโอไทป์ของ *Schistura obeini* ย้อมสีแบบพิเศษ

G: G-banding, C: C-banding และ NOR: NOR banding

ตาราง 9 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura obeini* จำนวน 10 เซลล์

Chromosome pair	Ls ± SD	Ll ± SD	Lt ± SD	CI ± SD	Type
1	5.080 ± 0.075	5.320 ± 0.147	10.40 ± 0.190	0.511 ± 0.207	m
2	4.100 ± 0.126	4.600 ± 0.167	8.700 ± 0.228	0.529 ± 0.212	m
3	3.060 ± 0.102	5.280 ± 0.098	8.340 ± 0.136	0.633 ± 0.255	sm
4	3.620 ± 0.160	4.300 ± 0.063	7.920 ± 0.147	0.543 ± 0.216	m
5	3.560 ± 0.080	4.140 ± 0.049	7.700 ± 0.126	0.538 ± 0.218	m
6	3.680 ± 0.040	3.800 ± 0.089	7.480 ± 0.098	0.508 ± 0.205	m
7	1.580 ± 0.040	5.760 ± 0.080	7.340 ± 0.102	0.785 ± 0.319	a
8	0.000 ± 0.000	7.220 ± 0.075	7.220 ± 0.075	1.000 ± 0.408	t
9	0.000 ± 0.000	7.160 ± 0.080	7.160 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
10	0.000 ± 0.000	7.060 ± 0.080	7.060 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
11	0.000 ± 0.000	6.940 ± 0.049	6.940 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t
12	3.260 ± 0.080	3.560 ± 0.080	6.820 ± 0.098	0.522 ± 0.210	m
13	2.300 ± 0.063	4.340 ± 0.049	6.640 ± 0.102	0.654 ± 0.265	sm
14	0.000 ± 0.000	6.560 ± 0.080	6.560 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
15	1.360 ± 0.049	5.120 ± 0.098	6.480 ± 0.117	0.790 ± 0.319	a
16	0.000 ± 0.000	6.320 ± 0.075	6.320 ± 0.075	1.000 ± 0.408	t
17	0.000 ± 0.000	6.220 ± 0.040	6.220 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
18	0.000 ± 0.000	6.140 ± 0.102	6.140 ± 0.102	1.000 ± 0.408	t
19	2.060 ± 0.049	4.000 ± 0.110	6.060 ± 0.120	0.660 ± 0.266	sm
20	1.660 ± 0.080	4.360 ± 0.080	6.020 ± 0.133	0.724 ± 0.291	sm
21	1.640 ± 0.080	4.280 ± 0.098	5.920 ± 0.133	0.723 ± 0.291	sm
22	0.000 ± 0.000	5.820 ± 0.133	5.820 ± 0.133	1.000 ± 0.408	t
23	0.000 ± 0.000	5.720 ± 0.133	5.720 ± 0.133	1.000 ± 0.408	t
24	0.000 ± 0.000	5.420 ± 0.147	5.420 ± 0.147	1.000 ± 0.408	t
25	0.000 ± 0.000	5.060 ± 0.120	5.060 ± 0.120	1.000 ± 0.408	t

6. *Schistura* cf. *robertsi* 1

6.1 จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าร้อยละ 96 ของจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับโครโมโซม มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 50 สรุปว่าปลาชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซม 2n=50 มีความยาวในช่วง 1.6-0.5 μm

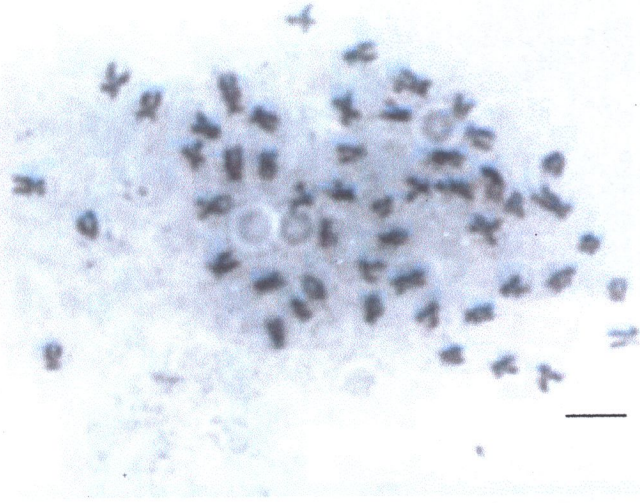
6.2 มีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ metacentric จำนวน 2 คู่ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 2 และ 6 โครโมโซมแบบ submetacentric จำนวน 4 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 3, 7, 8 และ 10 โครโมโซมแบบ acrocentric จำนวน 4 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 4, 15 และ 16โครโมโซมแบบ telocentric จำนวน 15 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 5, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 และ 25 (รูป 27, 28 และตาราง 10)

6.3 จากการย้อมสีแบบ Q- banding ไม่พบ band ที่ชัดเจนเกิดขึ้น (รูป 29 B)

6.4 จากการย้อมสีแบบ G-banding พบว่าโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric และ acrocentric บางคู่มี band ทั้ง 2 แขนที่กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 3, 4, 7, 8, 15 และ 16 โครโมโซมแบบ telocentric บางคู่มี band กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 5, 10, 11, 12, 14, 18, 21, 23 และ 25 (รูป 29 C และ 30)

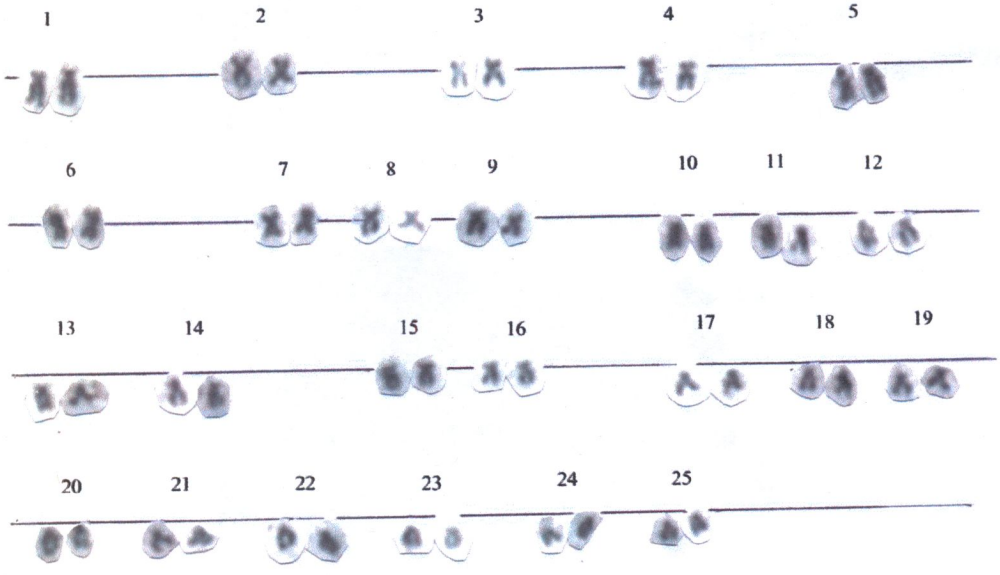
6.5 จากการย้อมสีแบบ C-banding พบว่ามีโครโมโซมบางคู่มี band เกิดขึ้นชัดเจน ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 2, 3, 5, 10 และ 18 พบ band เกิดขึ้นบริเวณ centromere โครโมโซมคู่ที่ 1 และ 11 มี band เกิดขึ้นบริเวณตรงกลางของแขนข้างยาวของโครโมโซม โครโมโซมคู่ที่ 6 และ 7 พบว่ามี band ขนาดใหญ่ที่บริเวณปลายแขนข้างยาวของโครโมโซม (telomere) และโครโมโซมคู่ที่ 4 พบ band บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซม (รูป 29 D และ 30)

6.6 จากการย้อมสีแบบ NOR banding พบว่าแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 4 ปรากฏ NOR band ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเมื่อย้อมด้วยวิธี C-banding จะติดสีเข้มที่บริเวณเดียวกัน (รูป 29 E และ 30)

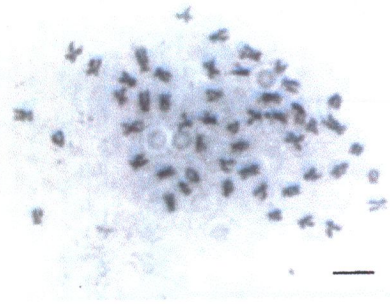


(scale bar = 2μm)

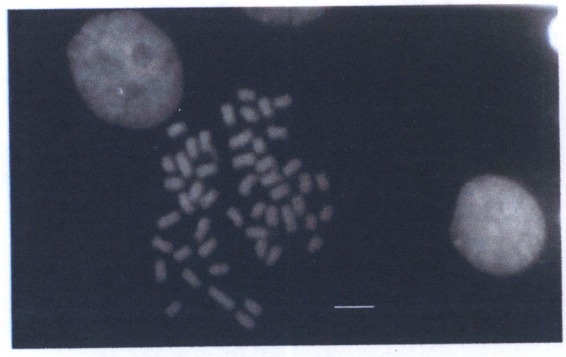
รูป 27 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *robertsi* 1 ย้อมสีแบบ Giemsa stained



รูป 28 คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *robertsi* 1 ซึ่งประกอบด้วย 4m+8sm+8a+30t (2n=50)

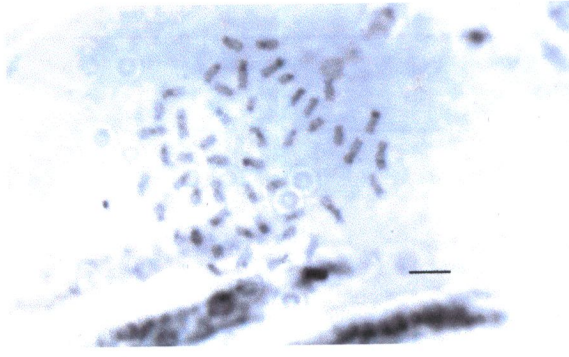


A

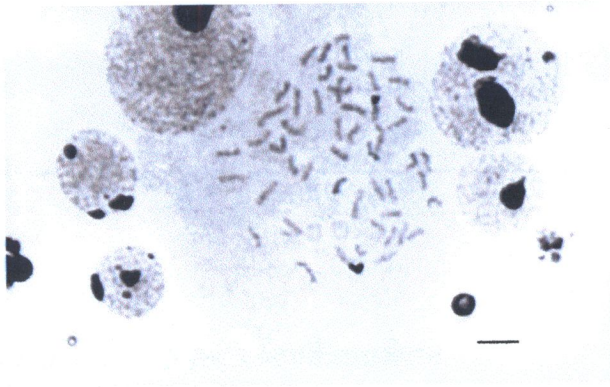


B

C



D

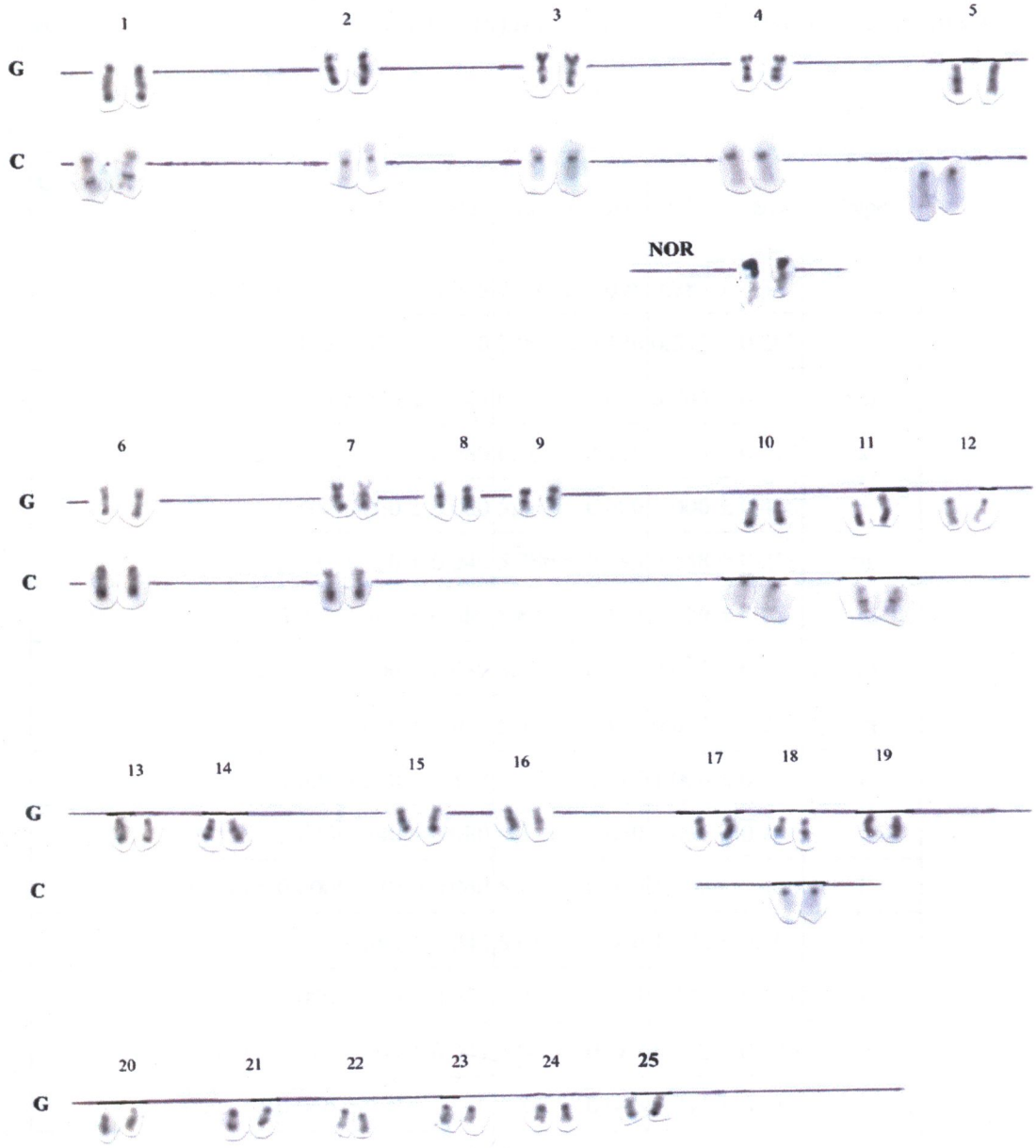


E

(scale bar = 2μm)

รูป 29 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *robertsi* 1

A) Giemsa stained, B) Q-banding, C) G-banding, D) C-banding, E) NOR banding



รูป 30 คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *robertsi* 1 ย้อมสีแบบพิเศษ

G: G-banding, C: C-banding และ NOR: NOR banding

ตาราง 10 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura* cf. *robertsi* 1 จำนวน 10 เซลล์

Chromosome pair	Ls ± SD	Ll ± SD	Lt ± SD	CI ± SD	Type
1	1.600 ± 0.063	5.780 ± 0.075	7.380 ± 0.098	0.783 ± 0.317	a
2	3.380 ± 0.117	3.620 ± 0.040	7.000 ± 0.126	0.517 ± 0.207	m
3	1.740 ± 0.049	5.040 ± 0.049	6.780 ± 0.098	0.743 ± 0.302	sm
4	1.400 ± 0.063	4.760 ± 0.080	6.160 ± 0.120	0.773 ± 0.313	a
5	0.000 ± 0.000	5.860 ± 0.080	5.860 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
6	2.560 ± 0.196	3.220 ± 0.040	5.780 ± 0.183	0.558 ± 0.219	m
7	2.100 ± 0.063	3.560 ± 0.080	5.660 ± 0.120	0.629 ± 0.254	sm
8	2.200 ± 0.063	3.400 ± 0.089	5.600 ± 0.141	0.607 ± 0.246	sm
9	1.800 ± 0.063	3.680 ± 0.075	5.480 ± 0.133	0.672 ± 0.273	sm
10	0.000 ± 0.000	5.320 ± 0.117	5.320 ± 0.117	1.000 ± 0.408	t
11	0.000 ± 0.000	5.240 ± 0.080	5.240 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
12	0.000 ± 0.000	5.120 ± 0.040	5.120 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
13	0.000 ± 0.000	5.080 ± 0.040	5.080 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
14	0.000 ± 0.000	5.020 ± 0.075	5.020 ± 0.075	1.000 ± 0.408	t
15	1.040 ± 0.049	3.960 ± 0.049	5.000 ± 0.089	0.792 ± 0.320	a
16	1.020 ± 0.040	3.860 ± 0.049	4.880 ± 0.040	0.791 ± 0.319	a
17	0.000 ± 0.000	4.740 ± 0.049	4.740 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t
18	0.000 ± 0.000	4.680 ± 0.040	4.680 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
19	0.000 ± 0.000	4.620 ± 0.075	4.620 ± 0.075	1.000 ± 0.408	t
20	0.000 ± 0.000	4.520 ± 0.040	4.520 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
21	0.000 ± 0.000	4.480 ± 0.040	4.480 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
22	0.000 ± 0.000	4.380 ± 0.075	4.380 ± 0.075	1.000 ± 0.408	t
23	0.000 ± 0.000	4.200 ± 0.126	4.200 ± 0.126	1.000 ± 0.408	t
24	0.000 ± 0.000	3.920 ± 0.075	3.920 ± 0.075	1.000 ± 0.408	t
25	0.000 ± 0.000	3.520 ± 0.183	3.520 ± 0.183	1.000 ± 0.408	t

7. *Schistura* cf. *robertsi* 2

7.1 จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าร้อยละ 94 ของจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับโครโมโซม มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 50 สรุปว่าปลาชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซม 2n=50 มีความยาวในช่วง 1.5-0.5 μm

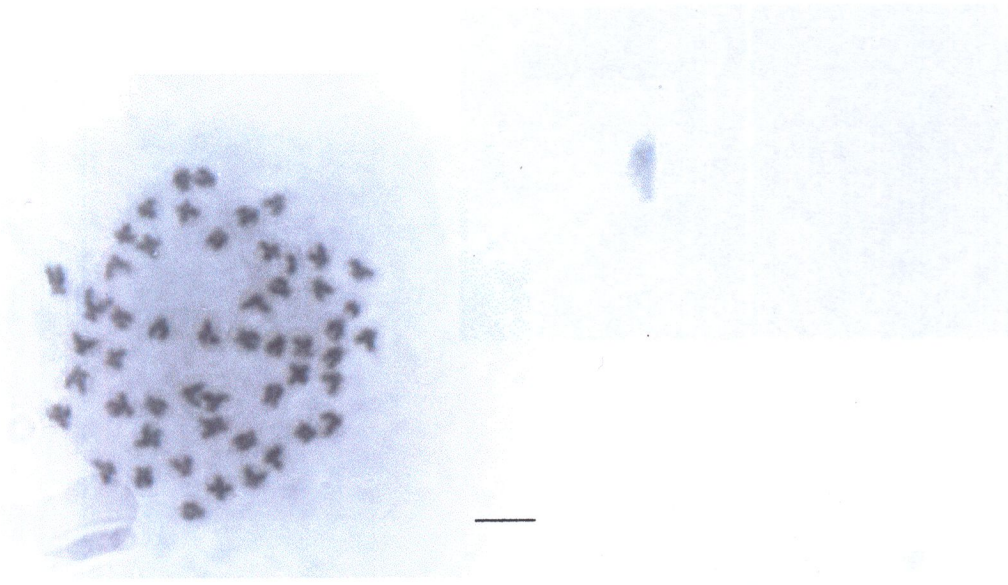
7.2 มีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ metacentric จำนวน 3 คู่ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 4, 5 และ 13 โครโมโซมแบบ submetacentric จำนวน 6 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 2, 8, 14, 15, 16 และ 25 โครโมโซมแบบ acrocentric จำนวน 5 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 3, 9, 17 และ 21 โครโมโซมแบบ telocentric จำนวน 11 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 6, 7, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 22, 23 และ 24 (รูป 31, 32 และตาราง 11)

7.3 จากการย้อมสีแบบ Q- banding ไม่พบ band ที่ชัดเจนเกิดขึ้น (รูป 33 B)

7.4 จากการย้อมสีแบบ G-banding พบว่าโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric และ acrocentric บางคู่มี band ทั้ง 2 แขนที่กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 3, 8 และ 9 โครโมโซมแบบ telocentric บางคู่มี band กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 7 (รูป 33 C และ 34)

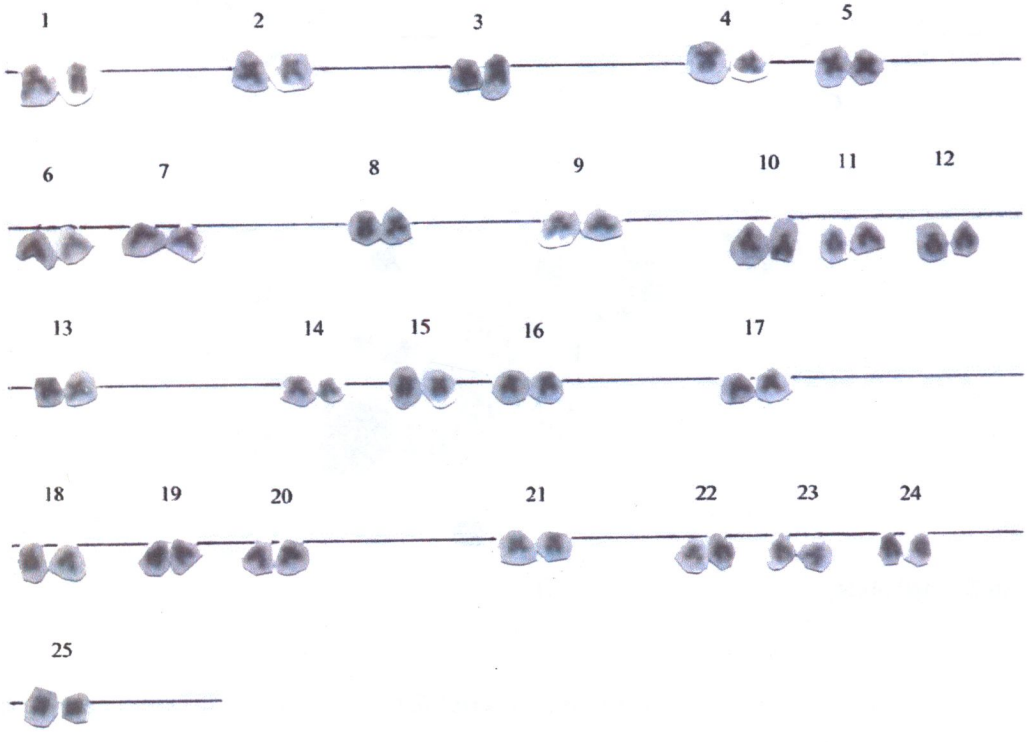
7.5 จากการย้อมสีแบบ C-banding พบว่ามีโครโมโซมบางคู่มี band เกิดขึ้นชัดเจน ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 2, 4, 5, 6, 7 และ 8 พบ band เกิดขึ้นบริเวณ centromere และโครโมโซมคู่ที่ 1 และ 3 พบ band บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซม (รูป 33 D และ 34)

7.6 จากการย้อมสีแบบ NOR banding พบว่าแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 1 ปรากฏ NOR band ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเมื่อย้อมด้วยวิธี C-banding จะติดสีเข้มที่บริเวณเดียวกัน (รูป 33 E และ 34)

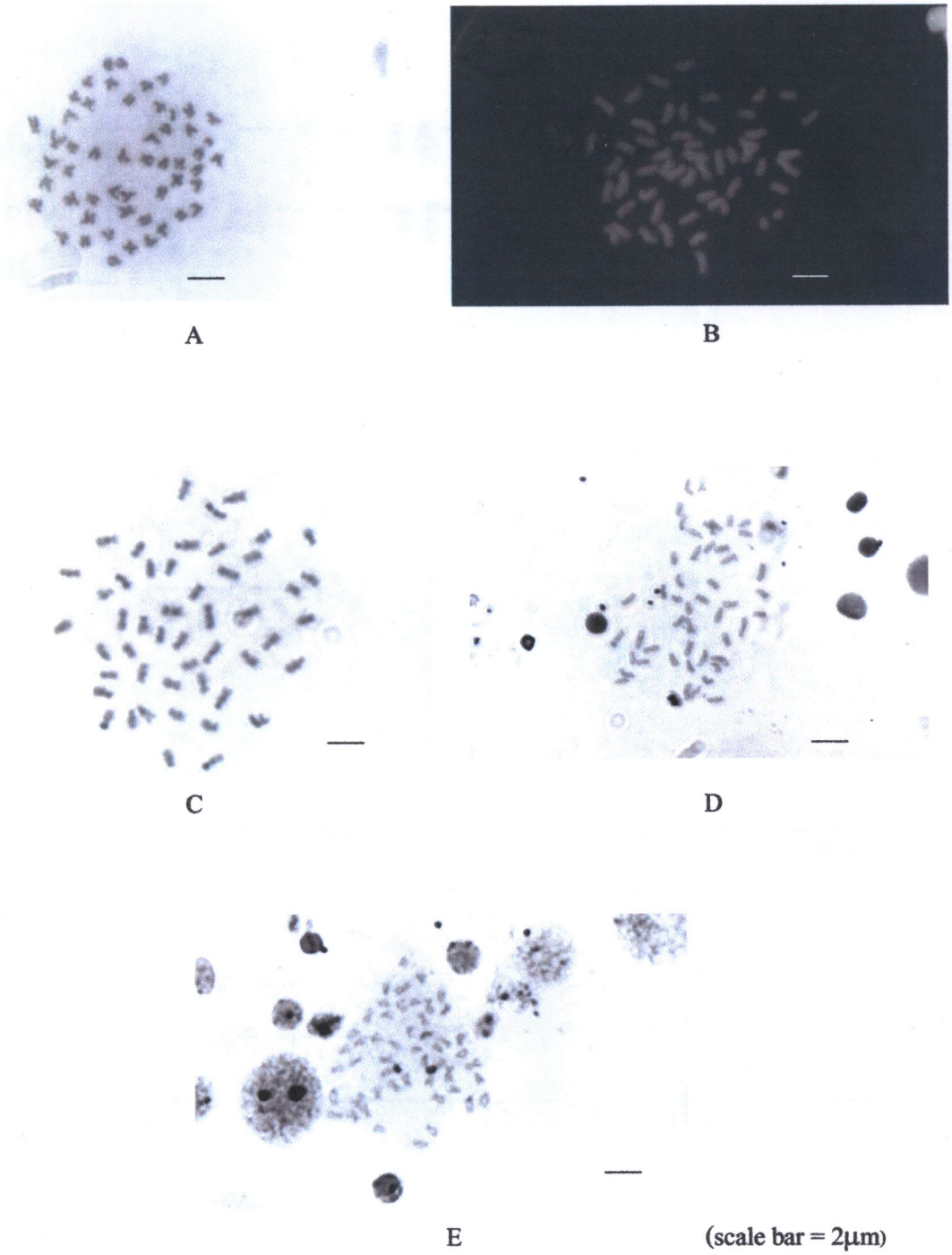


(scale bar = 2μm)

รูป 31 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *robertsi* 2 ย้อมสีแบบ Giemsa stained

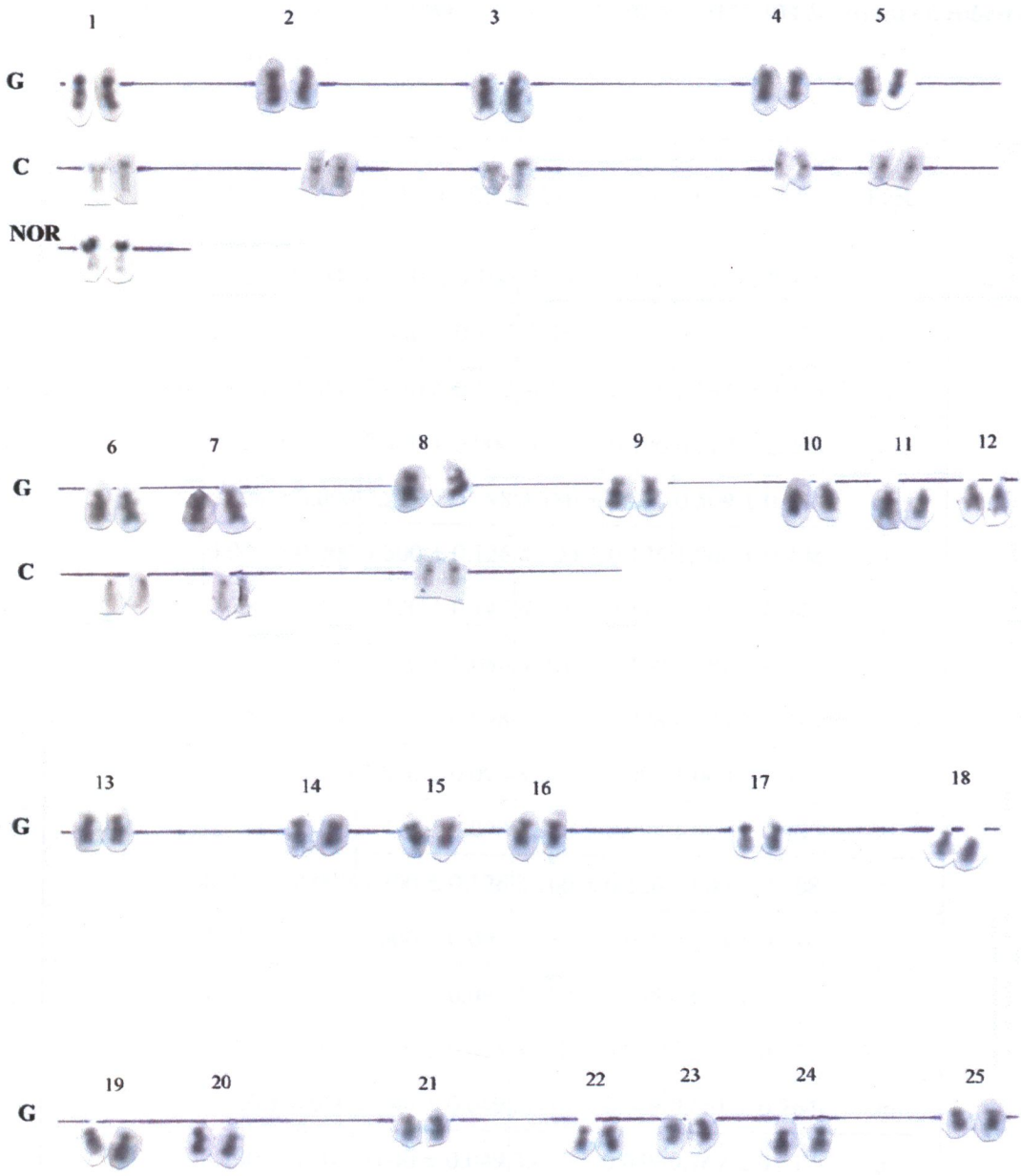


รูป 32 คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *robertsi* 2 ซึ่งประกอบด้วย 6m+12sm+10a+22t (2n=50)



รูป 33 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *robertsi* 2

A) Giemsa stained, B) Q-banding, C) G-banding, D) C-banding, E) NOR banding



รูป 34 คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *robertsi* 2 ย้อมสีแบบพิเศษ

G: G-banding, C: C-banding และ NOR: NOR banding

ตาราง 11 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura* cf. *robertsi* 2 จำนวน 10 เซลล์

Chromosome pair	Ls ± SD	Ll ± SD	Lt ± SD	CI ± SD	Type
1	1.220 ± 0.040	4.520 ± 0.160	5.74 ± 0.196	0.787 ± 0.320	a
2	1.800 ± 0.126	3.68 ± 0.117	5.48 ± 0.240	0.672 ± 0.270	sm
3	0.940 ± 0.049	3.620 ± 0.147	4.56 ± 0.196	0.794 ± 0.323	a
4	2.160 ± 0.196	2.400 ± 0.000	4.56 ± 0.196	0.527 ± 0.206	m
5	2.200 ± 0.000	2.280 ± 0.098	4.480 ± 0.098	0.509 ± 0.204	m
6	0.000 ± 0.000	4.300 ± 0.126	4.300 ± 0.126	1.000 ± 0.408	t
7	0.000 ± 0.000	4.120 ± 0.147	4.120 ± 0.147	1.000 ± 0.408	t
8	1.280 ± 0.098	2.740 ± 0.080	4.020 ± 0.160	0.682 ± 0.272	sm
9	0.900 ± 0.000	3.080 ± 0.098	3.980 ± 0.098	0.774 ± 0.314	a
10	0.000 ± 0.000	3.880 ± 0.098	3.880 ± 0.098	1.000 ± 0.408	t
11	0.000 ± 0.000	3.780 ± 0.098	3.780 ± 0.098	1.000 ± 0.408	t
12	0.000 ± 0.000	3.700 ± 0.126	3.700 ± 0.126	1.000 ± 0.408	t
13	1.680 ± 0.098	2.000 ± 0.000	3.680 ± 0.098	0.544 ± 0.216	m
14	1.300 ± 0.000	2.280 ± 0.098	3.580 ± 0.098	0.637 ± 0.257	sm
15	1.300 ± 0.000	2.180 ± 0.098	3.480 ± 0.098	0.626 ± 0.252	sm
16	1.200 ± 0.000	2.240 ± 0.049	3.440 ± 0.049	0.651 ± 0.264	sm
17	0.800 ± 0.000	2.640 ± 0.049	3.440 ± 0.049	0.767 ± 0.312	a
18	0.000 ± 0.000	3.280 ± 0.098	3.280 ± 0.098	1.000 ± 0.408	t
19	0.000 ± 0.000	3.240 ± 0.049	3.240 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t
20	0.000 ± 0.000	3.100 ± 0.126	3.100 ± 0.126	1.000 ± 0.408	t
21	0.700 ± 0.000	2.360 ± 0.080	3.060 ± 0.080	0.771 ± 0.313	a
22	0.000 ± 0.000	3.040 ± 0.049	3.040 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t
23	0.000 ± 0.000	3.020 ± 0.040	3.020 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
24	0.000 ± 0.000	2.880 ± 0.098	2.880 ± 0.098	1.000 ± 0.408	t
25	0.880 ± 0.117	1.700 ± 0.141	2.580 ± 0.223	0.660 ± 0.262	sm

8. *Schistura* sp.

8.1 จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าร้อยละ 95 ของจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับโครโมโซม มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 50 สรุปว่าปลาชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซม 2n=50 มีความยาวในช่วง 1.8-0.6 μm

8.2 มีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ metacentric จำนวน 3 คู่ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1, 2 และ 6 โครโมโซมแบบ submetacentric จำนวน 4 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 5, 7, 15 และ 24 โครโมโซมแบบ acrocentric จำนวน 4 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 3, 8, 11 และ 16 โครโมโซมแบบ telocentric จำนวน 14 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 4, 9, 10, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 และ 25 (รูป 35, 36 และตาราง 12)

8.3 จากการย้อมสีแบบ Q- banding ไม่พบ band ที่ชัดเจนเกิดขึ้น (รูป 37 B)

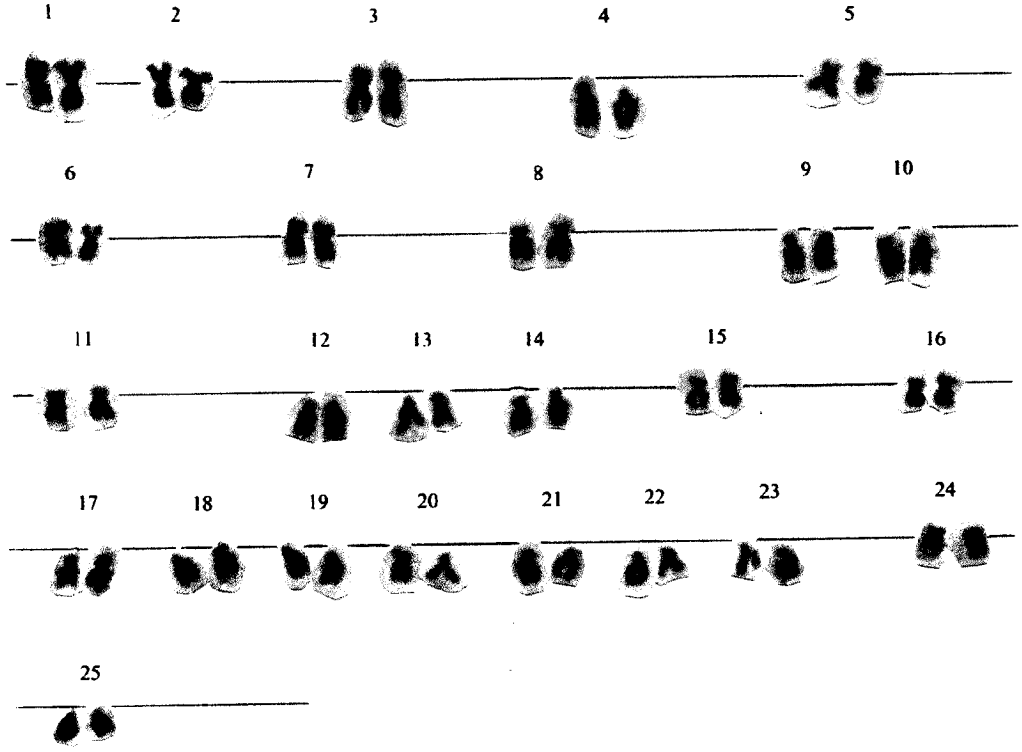
8.4 จากการย้อมสีแบบ G-banding พบว่าโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric และ acrocentric บางคู่มี band ทั้ง 2 แขนที่กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 3, 5, 8, 11 และ 15 โครโมโซมแบบ telocentric บางคู่มี band กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 9, 12, 13, 18, 20, 23, 24 และ 25 (รูป 37 C และ 38)

8.5 จากการย้อมสีแบบ C-banding พบว่ามีโครโมโซมบางคู่มี band เกิดขึ้นชัดเจน ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1 และ 2 พบ band เกิดขึ้นบริเวณ centromere โครโมโซมคู่ที่ 4 พบว่ามี band บริเวณปลายแขนข้างยาวของโครโมโซม และโครโมโซมคู่ที่ 3 และ 5 พบ band บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซม (รูป 37 D และ 38)

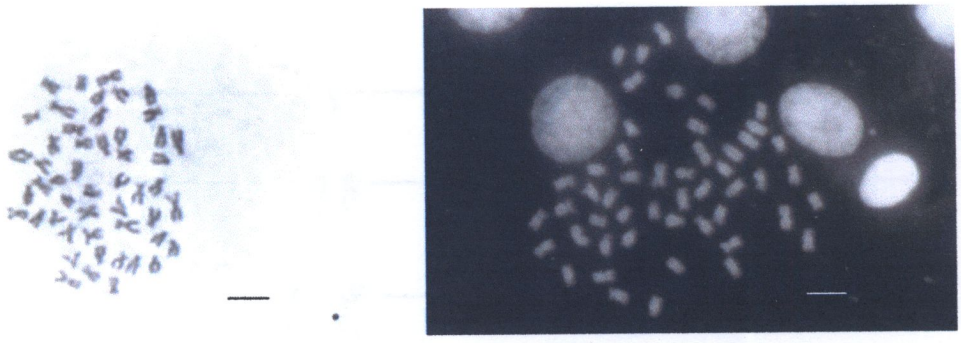
8.6 จากการย้อมสีแบบ NOR banding พบว่าแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 3 ปรากฏ NOR band ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเมื่อย้อมด้วยวิธี C-banding จะติดสีเข้มที่บริเวณเดียวกัน (รูป 37 E และ 38)

(scale bar = 2μm)

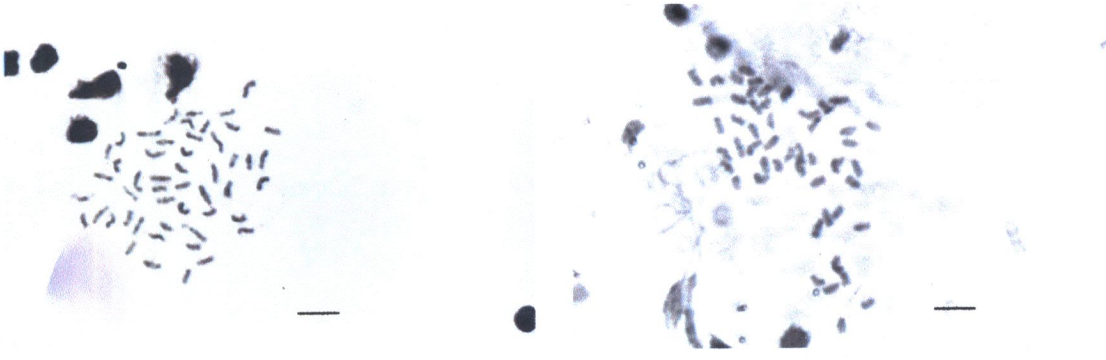
รูป 35 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* sp. ย้อมสีแบบ Giemsa stained



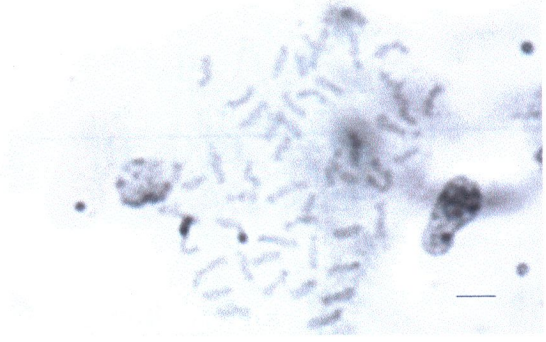
รูป 36 คาริโอไทป์ของ *Schistura* sp. ซึ่งประกอบด้วย 6m+8sm+8a+28t (2n=50)



A B



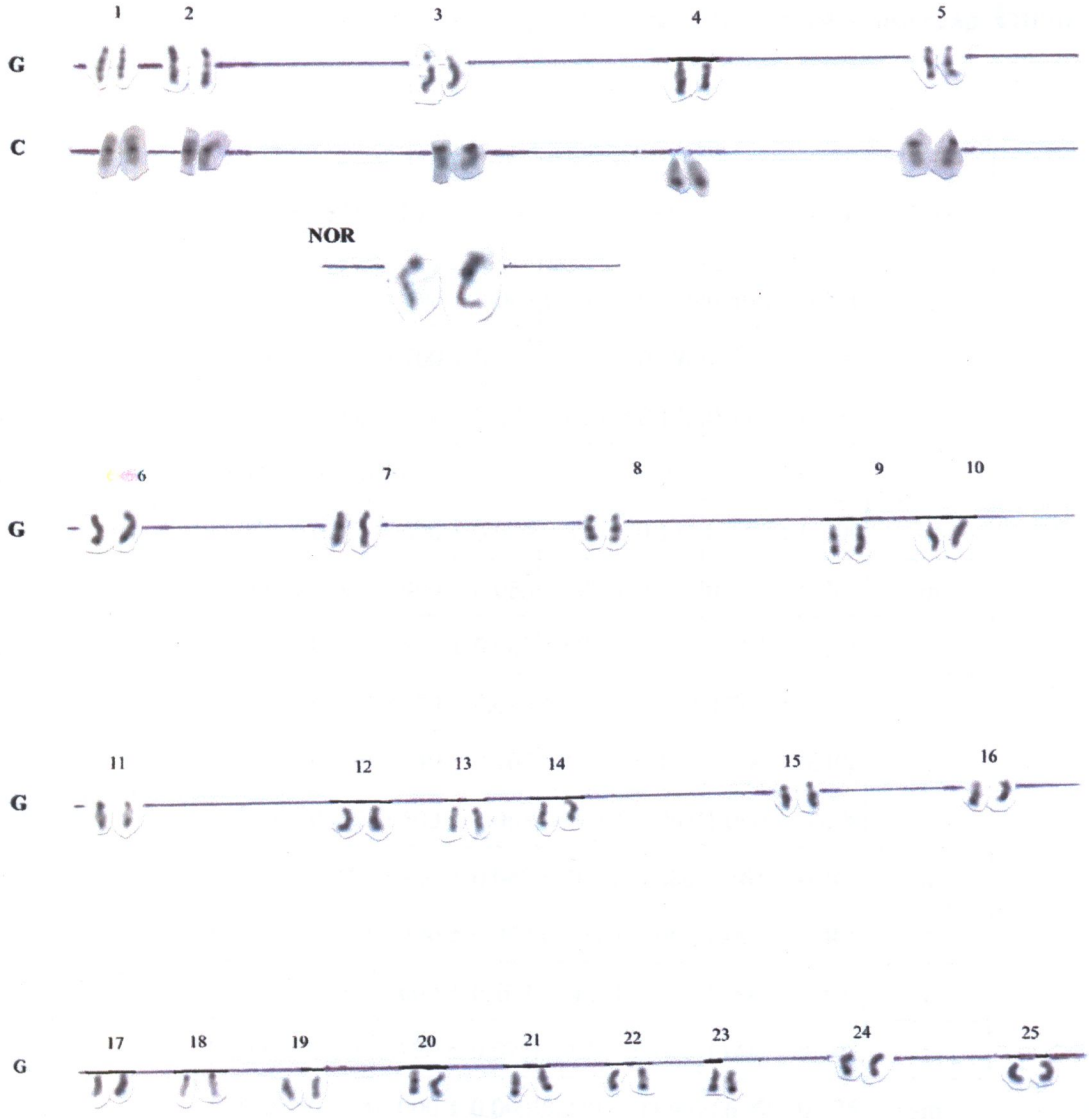
C D



E (scale bar = 2μm)

รูป 37 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* sp.

A) Giemsa stained, B) Q-banding, C) G-banding, D) C-banding, E) NOR banding



รูป 38 คาริโอไทป์ของ *Schistura* sp. ย้อมสีแบบพิเศษ

G: G-banding, C: C-banding และ NOR banding

ตาราง 12 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura* sp. จำนวน 10 เซลล์

Chromosome pair	Ls ± SD	Ll ± SD	Lt ± SD	CI ± SD	Type
1	4.300 ± 0.063	4.400 ± 0.063	8.700 ± 0.126	0.506 ± 0.206	m
2	3.480 ± 0.040	4.700 ± 0.063	8.180 ± 0.098	0.575 ± 0.234	m
3	1.800 ± 0.063	6.220 ± 0.075	8.020 ± 0.133	0.776 ± 0.315	a
4	0.000 ± 0.000	8.020 ± 0.075	8.020 ± 0.075	1.000 ± 0.408	t
5	2.220 ± 0.075	5.600 ± 0.063	7.820 ± 0.133	0.716 ± 0.290	sm
6	3.700 ± 0.063	3.900 ± 0.063	7.600 ± 0.126	0.513 ± 0.209	m
7	2.420 ± 0.040	4.560 ± 0.080	6.980 ± 0.098	0.653 ± 0.265	sm
8	1.620 ± 0.040	5.220 ± 0.040	6.840 ± 0.080	0.763 ± 0.310	a
9	0.000 ± 0.000	6.540 ± 0.102	6.540 ± 0.102	1.000 ± 0.408	t
10	0.000 ± 0.000	6.500 ± 0.063	6.500 ± 0.063	1.000 ± 0.408	t
11	1.520 ± 0.040	4.840 ± 0.049	6.360 ± 0.080	0.761 ± 0.309	a
12	0.000 ± 0.000	6.300 ± 0.063	6.300 ± 0.063	1.000 ± 0.408	t
13	0.000 ± 0.000	6.060 ± 0.102	6.060 ± 0.102	1.000 ± 0.408	t
14	0.000 ± 0.000	5.920 ± 0.075	5.920 ± 0.075	1.000 ± 0.408	t
15	1.920 ± 0.040	4.000 ± 0.063	5.920 ± 0.098	0.676 ± 0.275	sm
16	1.220 ± 0.040	4.620 ± 0.040	5.840 ± 0.080	0.791 ± 0.321	a
17	0.000 ± 0.000	5.800 ± 0.063	5.800 ± 0.063	1.000 ± 0.408	t
18	0.000 ± 0.000	5.700 ± 0.063	5.700 ± 0.063	1.000 ± 0.408	t
19	0.000 ± 0.000	5.660 ± 0.049	5.660 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t
20	0.000 ± 0.000	5.520 ± 0.040	5.520 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
21	0.000 ± 0.000	5.420 ± 0.040	5.420 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
22	0.000 ± 0.000	5.320 ± 0.075	5.320 ± 0.075	1.000 ± 0.408	t
23	0.000 ± 0.000	5.220 ± 0.040	5.220 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
24	1.700 ± 0.063	3.300 ± 0.089	5.000 ± 0.141	0.660 ± 0.267	sm
25	0.000 ± 0.000	4.500 ± 0.063	4.500 ± 0.063	1.000 ± 0.408	t

9. *Schistura spilota*

9.1 จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าร้อยละ 93 ของจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับโครโมโซม มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 50 สรุปว่าปลาชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซม 2n=50 มีความยาวในช่วง 1.8-0.6 μm

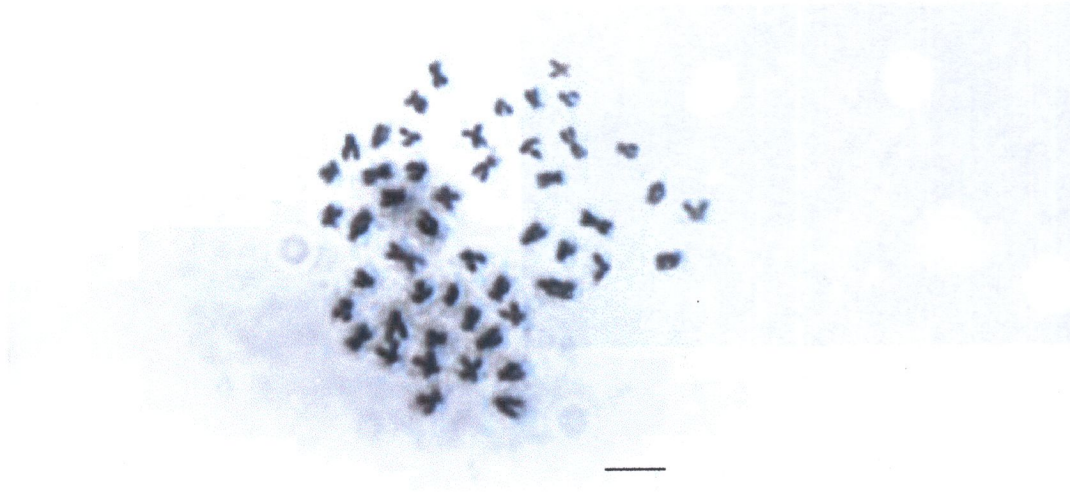
9.2 มีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ metacentric จำนวน 6 คู่ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1, 4, 5, 10, 19 และ 20 โครโมโซมแบบ submetacentric จำนวน 4 คู่ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 6, 11, 12 และ 21 โครโมโซมแบบ acrocentric จำนวน 2 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 7 และ 13 โครโมโซมแบบ telocentric จำนวน 13 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 2, 3, 8, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 24 และ 25 (รูป 39, 40 และตาราง 13)

9.3 จากการย้อมสีแบบ Q-banding พบ band บริเวณปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 3 (รูป 41 B และ 42)

9.4 จากการย้อมสีแบบ G-banding พบว่าโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric และ acrocentric บางคู่มี band ทั้ง 2 แขนที่กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 19 และ 21 โครโมโซมแบบ telocentric บางคู่มี band กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 2, 3, 8, 9, 14, 15, 17, 18 และ 23 (รูป 41 C และ 42)

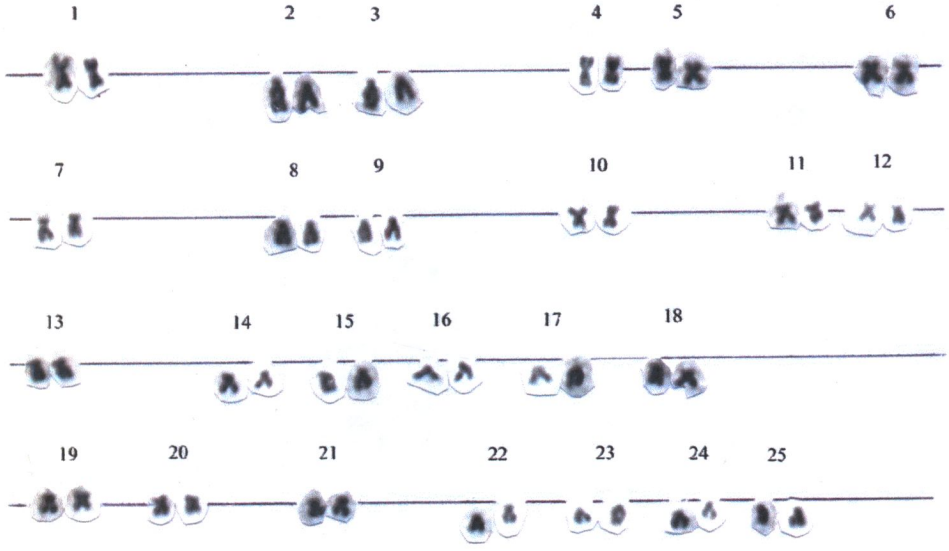
9.5 จากการย้อมสีแบบ C-banding พบว่ามีโครโมโซมบางคู่มี band เกิดขึ้นชัดเจน ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 3, 10, 14, 15 และ 16 พบ band เกิดขึ้นบริเวณ centromere โครโมโซมคู่ที่ 7 มี band เกิดขึ้นบริเวณส่วนบนใกล้กับ centromere ของแขนข้างยาวของโครโมโซม โครโมโซมคู่ที่ 1 และ 4 พบว่ามี band ขนาดใหญ่ที่ตลอดแขนข้างยาวของโครโมโซม โครโมโซมคู่ที่ 6 และ 13 พบ band บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซม และโครโมโซมคู่ที่ 2 พบ band 2 ส่วน คือบริเวณส่วนบนของแขนข้างยาวของโครโมโซมใกล้กับ centromere และส่วนปลายของแขนข้างเดียวกัน (รูป 41 D และ 42)

9.6 จากการย้อมสีแบบ NOR banding พบว่าแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 6 ปรากฏ NOR band ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเมื่อย้อมด้วยวิธี C-banding จะติดสีเข้มที่บริเวณเดียวกัน (รูป 41 E และ 42)

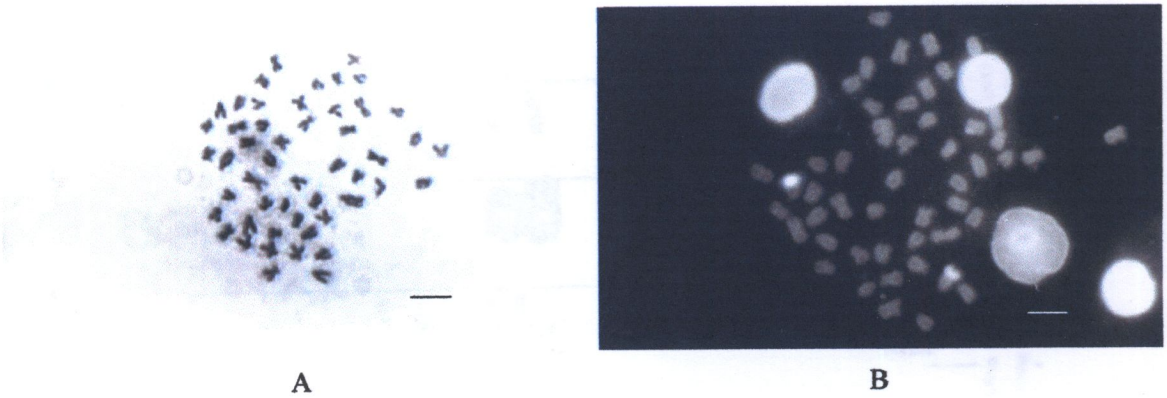


(scale bar = 2μm)

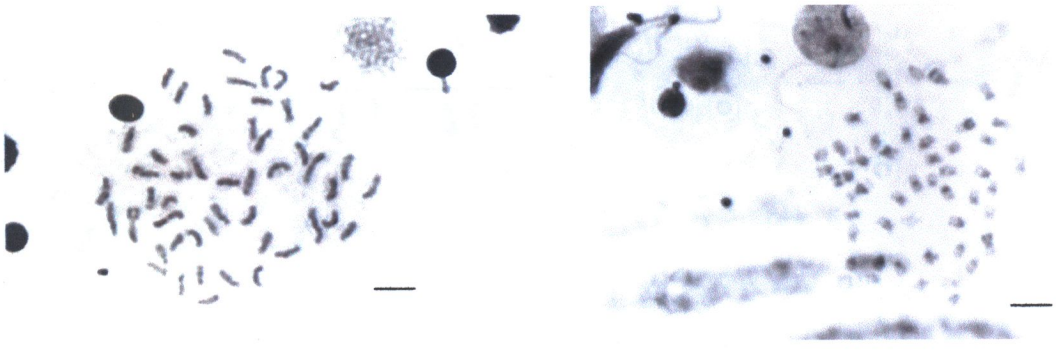
รูป 39 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura spilota* ย้อมสีแบบ Giemsa stained



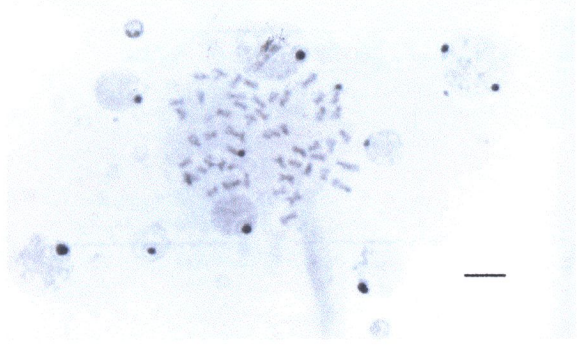
รูป 40 คาริโอไทป์ของ *Schistura spilota* ซึ่งประกอบด้วย 12m+8sm+4a+26t (2n=50)



A B



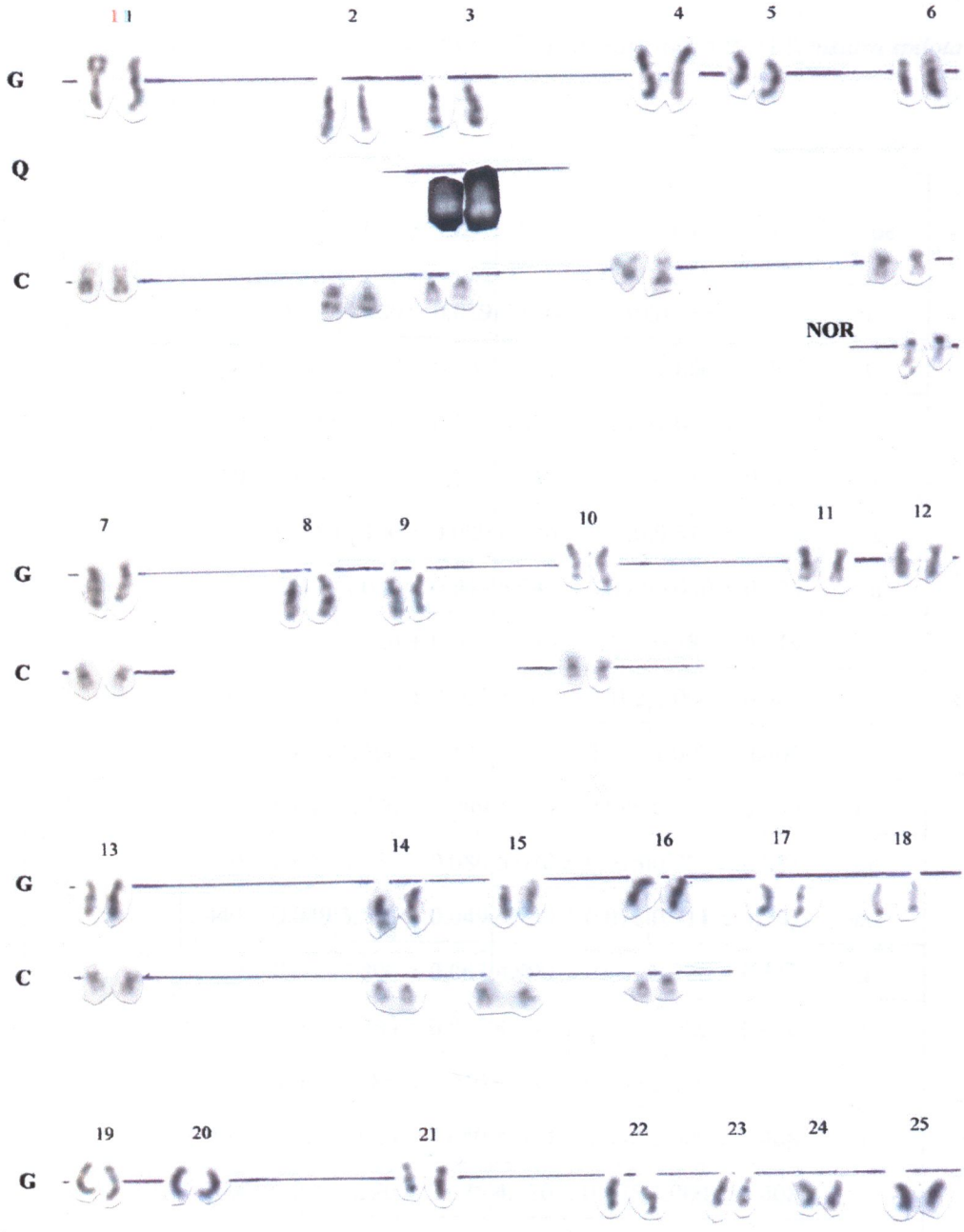
C D



E (scale bar = 2μm)

รูป 41 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura spilota*

A) Giemsa stained, B) Q-banding, C) G-banding, D) C-banding, E) NOR banding



รูป 42 คาริโอไทป์ของ *Schistura spilota* ย้อมสีแบบพิเศษ

G: G-banding, C: C-banding, Q: Q-banding และ NOR: NOR banding

ตาราง 13 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura spilota* จำนวน 10 เซลล์

Chromosome pair	Ls ± SD	Ll ± SD	Lt ± SD	CI ± SD	Type
1	3.800 ± 0.063	4.000 ± 0.089	7.800 ± 0.110	0.513 ± 0.207	m
2	0.000 ± 0.000	7.640 ± 0.102	7.640 ± 0.102	1.000 ± 0.408	t
3	0.000 ± 0.000	6.820 ± 0.147	6.820 ± 0.147	1.000 ± 0.408	t
4	3.220 ± 0.040	3.420 ± 0.117	6.640 ± 0.136	0.515 ± 0.208	m
5	2.980 ± 0.098	3.160 ± 0.080	6.140 ± 0.120	0.515 ± 0.207	m
6	1.900 ± 0.063	4.040 ± 0.049	5.940 ± 0.049	0.680 ± 0.274	sm
7	1.220 ± 0.040	4.520 ± 0.075	5.740 ± 0.102	0.787 ± 0.319	a
8	0.000 ± 0.000	5.560 ± 0.102	5.560 ± 0.102	1.000 ± 0.408	t
9	0.000 ± 0.000	5.300 ± 0.126	5.300 ± 0.126	1.000 ± 0.408	t
10	2.580 ± 0.040	2.700 ± 0.089	5.280 ± 0.098	0.511 ± 0.206	m
11	1.520 ± 0.040	3.560 ± 0.080	5.080 ± 0.075	0.701 ± 0.283	sm
12	1.440 ± 0.049	3.540 ± 0.049	4.980 ± 0.075	0.711 ± 0.287	sm
13	1.100 ± 0.063	3.800 ± 0.063	4.900 ± 0.063	0.776 ± 0.312	a
14	0.000 ± 0.000	4.780 ± 0.075	4.780 ± 0.075	1.000 ± 0.408	t
15	0.000 ± 0.000	4.680 ± 0.040	4.680 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
16	0.000 ± 0.000	4.620 ± 0.040	4.620 ± 0.040	1.000 ± 0.408	t
17	0.000 ± 0.000	4.520 ± 0.075	4.520 ± 0.075	1.000 ± 0.408	t
18	0.000 ± 0.000	4.460 ± 0.080	4.460 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
19	2.200 ± 0.000	2.260 ± 0.080	4.460 ± 0.080	0.507 ± 0.204	m
20	2.140 ± 0.049	2.300 ± 0.063	4.440 ± 0.102	0.518 ± 0.209	m
21	1.500 ± 0.000	2.920 ± 0.075	4.420 ± 0.075	0.661 ± 0.267	sm
22	0.000 ± 0.000	4.260 ± 0.080	4.260 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
23	0.000 ± 0.000	4.100 ± 0.110	4.100 ± 0.110	1.000 ± 0.408	t
24	0.000 ± 0.000	4.060 ± 0.080	4.060 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
25	0.000 ± 0.000	3.920 ± 0.172	3.920 ± 0.172	1.000 ± 0.408	t

10. *Schistura* cf. *spilota*

10.1 จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าร้อยละ 96 ของจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับโครโมโซม มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 50 สรุปว่าปลาชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซม 2n=50 มีความยาวในช่วง 1.6-0.8 μm

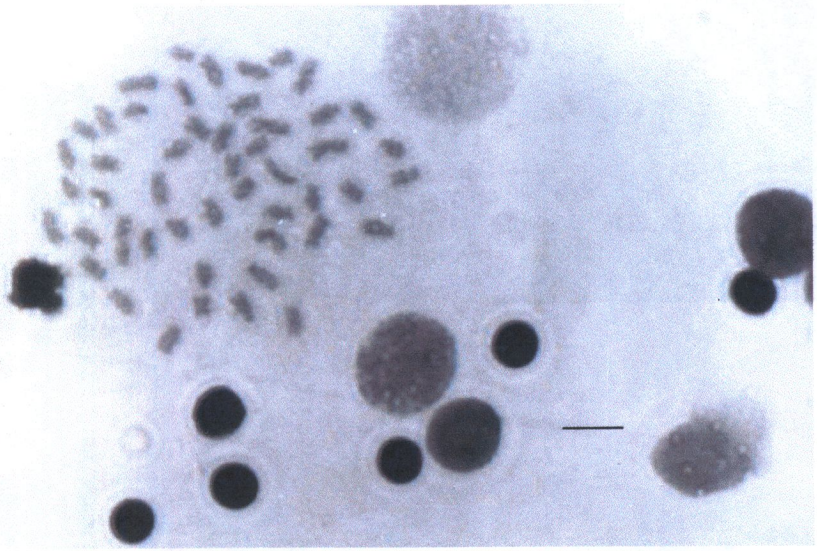
10.2 มีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ metacentric จำนวน 3 คู่ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1, 3 และ 16 โครโมโซมแบบ submetacentric จำนวน 2 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 10 และ 13 โครโมโซมแบบ acrocentric จำนวน 6 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 2, 6, 9, 14, 15 และ 20 โครโมโซมแบบ telocentric จำนวน 14 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 4, 5, 7, 8, 11, 12, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 และ 25 (รูป 43, 44 และตาราง 14)

10.3 จากการย้อมสีแบบ Q- banding ไม่พบ band ที่ชัดเจนเกิดขึ้น (รูป 45 B)

10.4 จากการย้อมสีแบบ G-banding พบว่าโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric และ acrocentric บางคู่มี band ทั้ง 2 แขนที่กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 2, 9, 13, 14 และ 16 โครโมโซมแบบ telocentric บางคู่มี band กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 5, 6, 7, 8, 11, 22, 24 และ 25 (รูป 45 C และ 46)

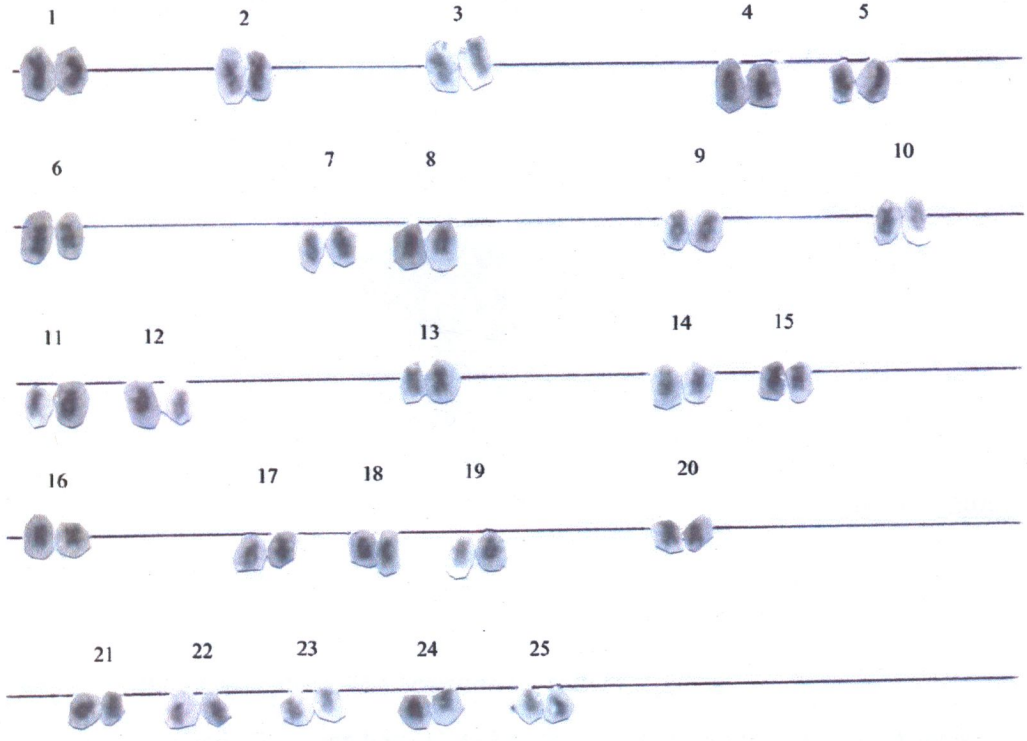
10.5 จากการย้อมสีแบบ C-banding พบว่ามีโครโมโซมบางคู่มี band เกิดขึ้นชัดเจน ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 3, 4, 7, 8 และ 9 พบ band เกิดขึ้นบริเวณ centromere โครโมโซมคู่ที่ 13 พบ band เกิดขึ้นบริเวณแขนข้างยาวใกล้ centromere โครโมโซมคู่ที่ 5 พบว่ามี band ขนาดใหญ่ที่บริเวณ centromere และปลายแขนข้างยาวของโครโมโซม โครโมโซมคู่ที่ 2, 6 และ 10 พบ band บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซม และโครโมโซมคู่ที่ 1 พบ band ตลอดความยาวของแขนข้างยาวของโครโมโซม (รูป 45 D และ 46)

10.6 จากการย้อมสีแบบ NOR banding พบว่าแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 2 ปรากฏ NOR band ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเมื่อย้อมด้วยวิธี C-banding จะติดสีเข้มที่บริเวณเดียวกัน (รูป 45 E และ 46)

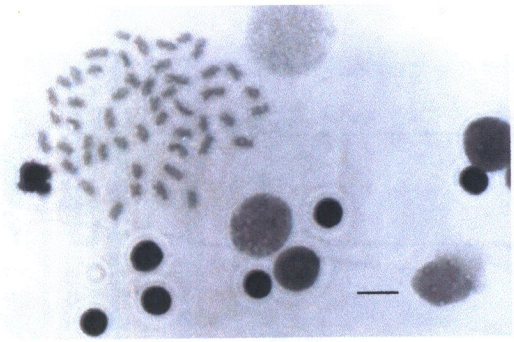


(scale bar = 2μm)

รูป 43 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *spilota* ย้อมสีแบบ Giemsa stained

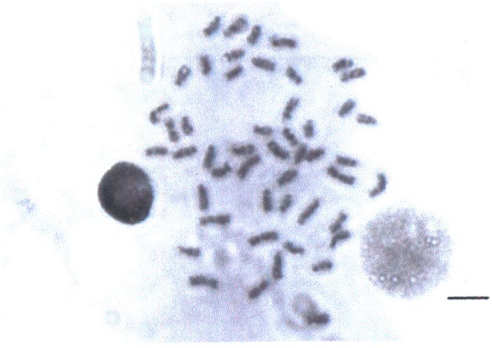


รูป 44 คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *spilota* ซึ่งประกอบด้วย 6m+4sm+12a+28t (2n=50)

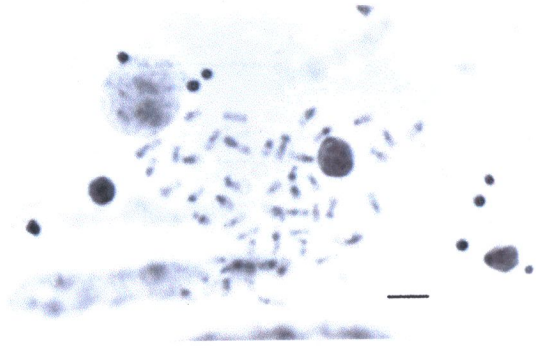


A

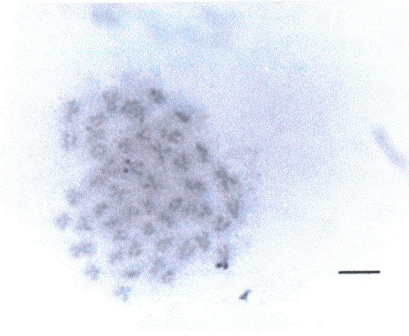
B



C



D

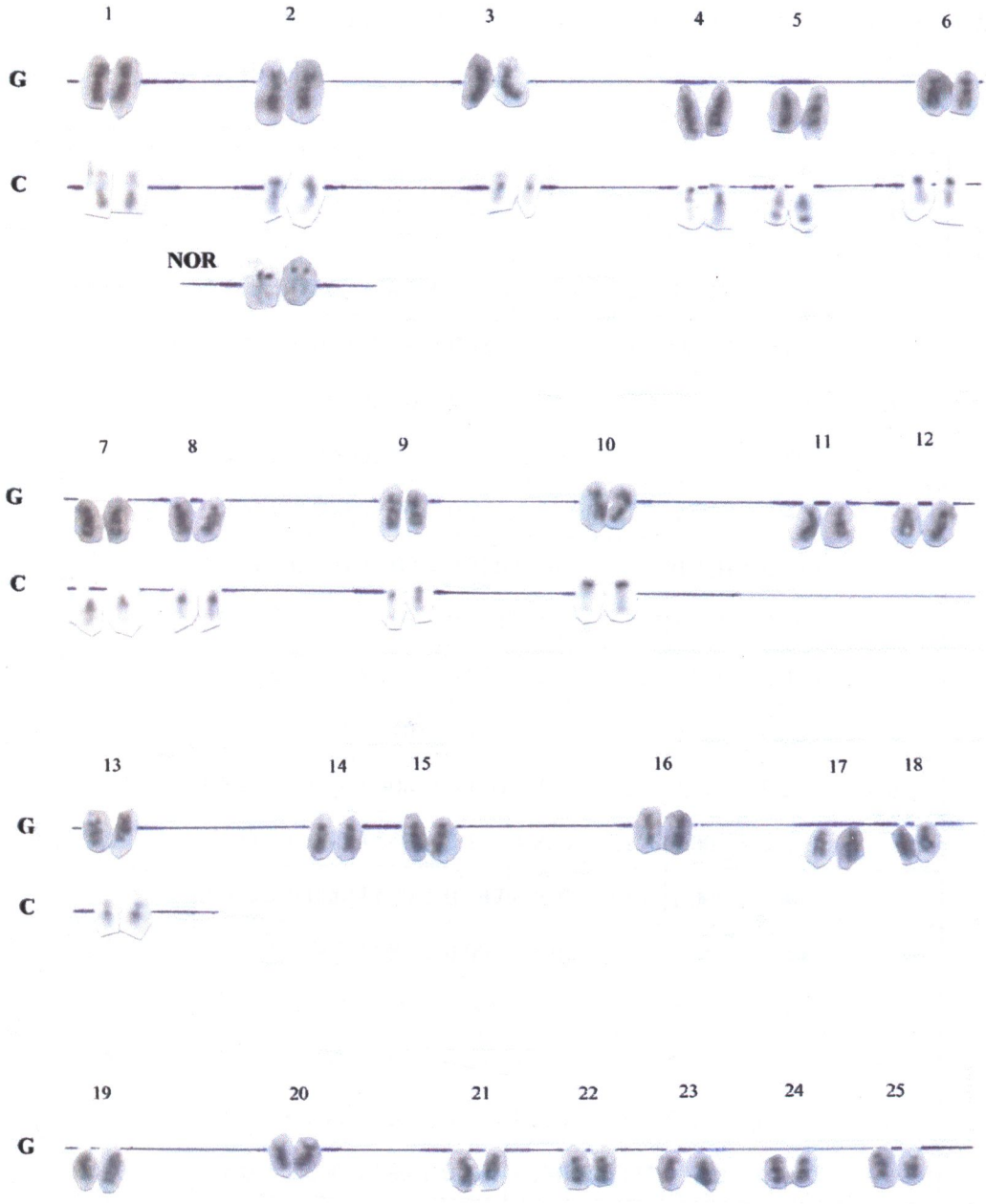


E

(scale bar = 2μm)

รูป 45 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura* cf. *spilota*

A) Giemsa stained, B) Q-banding, C) G-banding, D) C-banding, E) NOR banding



รูป 46 คาริโอไทป์ของ *Schistura* cf. *spilota* ย้อมสีแบบพิเศษ

G: G-banding, C: C-banding และ NOR: NOR banding

ตาราง 14 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura* cf. *spilota* จำนวน 10 เซลล์

Chromosome pair	Ls ± SD	Ll ± SD	Lt ± SD	CI ± SD	Type
1	3.120 ± 0.160	3.360 ± 0.120	6.48 ± 0.271	0.519 ± 0.209	m
2	1.500 ± 0.000	4.94 ± 0.196	6.44 ± 0.196	0.767 ± 0.311	a
3	3.060 ± 0.080	3.100 ± 0.126	6.16 ± 0.206	0.503 ± 0.204	m
4	0.000 ± 0.000	5.680 ± 0.349	5.68 ± 0.349	1.000 ± 0.408	t
5	0.000 ± 0.000	5.620 ± 0.271	5.620 ± 0.271	1.000 ± 0.408	t
6	1.200 ± 0.000	4.260 ± 0.206	5.460 ± 0.206	0.780 ± 0.316	a
7	0.000 ± 0.000	5.300 ± 0.253	5.300 ± 0.253	1.000 ± 0.408	t
8	0.000 ± 0.000	5.180 ± 0.223	5.180 ± 0.223	1.000 ± 0.408	t
9	1.200 ± 0.000	3.840 ± 0.174	5.040 ± 0.174	0.762 ± 0.308	a
10	1.540 ± 0.049	3.300 ± 0.126	4.840 ± 0.174	0.682 ± 0.277	sm
11	0.000 ± 0.000	4.800 ± 0.126	4.800 ± 0.126	1.000 ± 0.408	t
12	0.000 ± 0.000	4.620 ± 0.147	4.620 ± 0.147	1.000 ± 0.408	t
13	1.540 ± 0.049	2.980 ± 0.098	4.520 ± 0.147	0.659 ± 0.269	sm
14	0.940 ± 0.049	3.540 ± 0.049	4.480 ± 0.098	0.790 ± 0.320	a
15	1.000 ± 0.000	3.380 ± 0.098	4.380 ± 0.098	0.772 ± 0.313	a
16	2.120 ± 0.040	2.160 ± 0.080	4.280 ± 0.117	0.505 ± 0.204	m
17	0.000 ± 0.000	4.180 ± 0.117	4.180 ± 0.117	1.000 ± 0.408	t
18	0.000 ± 0.000	4.080 ± 0.117	4.080 ± 0.117	1.000 ± 0.408	t
19	0.000 ± 0.000	3.980 ± 0.117	3.980 ± 0.117	1.000 ± 0.408	t
20	0.900 ± 0.000	3.060 ± 0.080	3.960 ± 0.080	0.773 ± 0.314	a
21	0.000 ± 0.000	3.860 ± 0.080	3.860 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
22	0.000 ± 0.000	3.680 ± 0.117	3.680 ± 0.117	1.000 ± 0.408	t
23	0.000 ± 0.000	3.640 ± 0.080	3.640 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
24	0.000 ± 0.000	3.460 ± 0.080	3.460 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
25	0.000 ± 0.000	3.440 ± 0.049	3.440 ± 0.049	1.000 ± 0.408	t

11. *Schistura poculi*

11.1 จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าร้อยละ 94 ของจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับโครโมโซม มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 50 สรุปว่าปลาชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซม 2n=50 มีความยาวในช่วง 2.0-0.8 μm

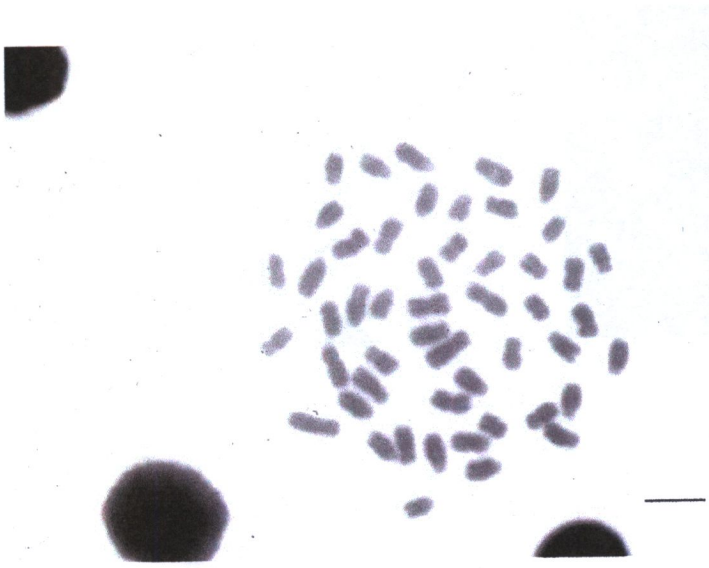
11.2 มีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ metacentric จำนวน 4 คู่ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 2, 5, 14และ 20 โครโมโซมแบบ submetacentric จำนวน 4 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 3, 8 และ 22 โครโมโซมแบบ acrocentric จำนวน 6 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 4, 9, 15, 16, 17 และ 21 โครโมโซมแบบ telocentric จำนวน 11 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 6, 7, 10, 11, 12, 13, 18, 19, 23, 24 และ 25 (รูป 47, 48 และตาราง 15)

11.3 จากการย้อมสีแบบ Q- banding ไม่พบ band ที่ชัดเจนเกิดขึ้น (รูป 49 B)

11.4 จากการย้อมสีแบบ G-banding พบว่าโครโมโซมแบบ metacentric, submetacentric และ acrocentric บางคู่มี band ทั้ง 2 แขนที่กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 3, 9, 16, 17 และ 21 โครโมโซมแบบ telocentric บางคู่มี band กระจายทั่วในรูปแบบที่เหมือนกันเป็นคู่ๆ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 6, 10, 11 และ 23 (รูป 49 C และ 50)

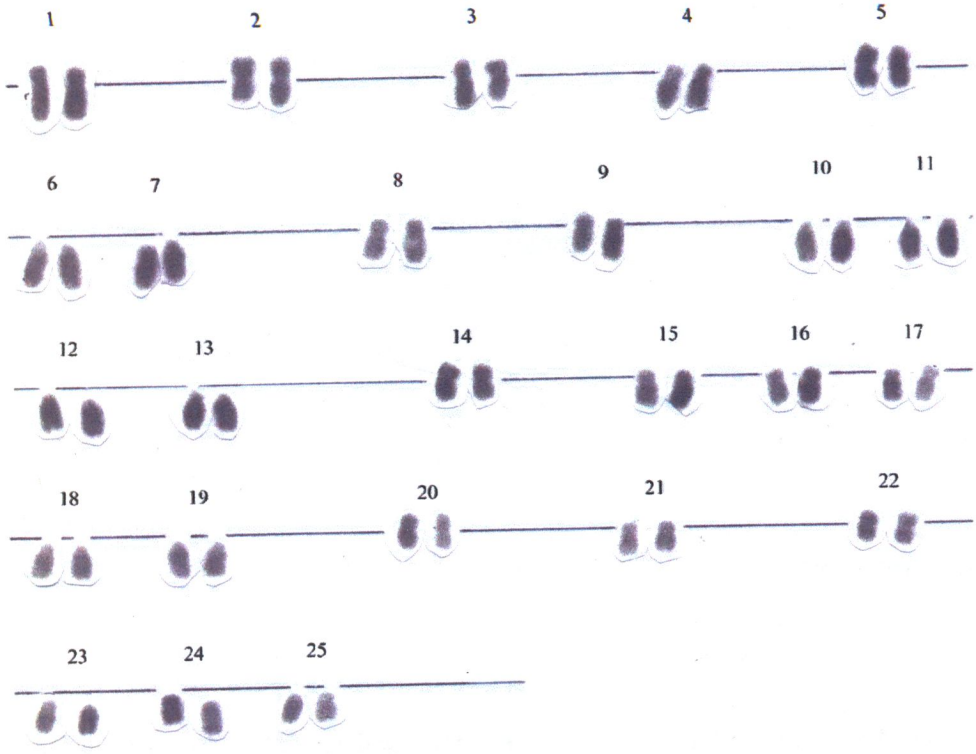
11.5 จากการย้อมสีแบบ C-banding พบว่ามีโครโมโซมบางคู่มี band เกิดขึ้นชัดเจน ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 23, 24 และ 25 พบ band เกิดขึ้นบริเวณ centromere และโครโมโซมคู่ที่ 2, 3 และ 4 พบ band บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซม (รูป 49 D และ 50)

11.6 จากการย้อมสีแบบ NOR banding พบว่าแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 2 ปรากฏ NOR band ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเมื่อย้อมด้วยวิธี C-banding จะติดสีเข้มที่บริเวณเดียวกัน (รูป 49 E และ 50)

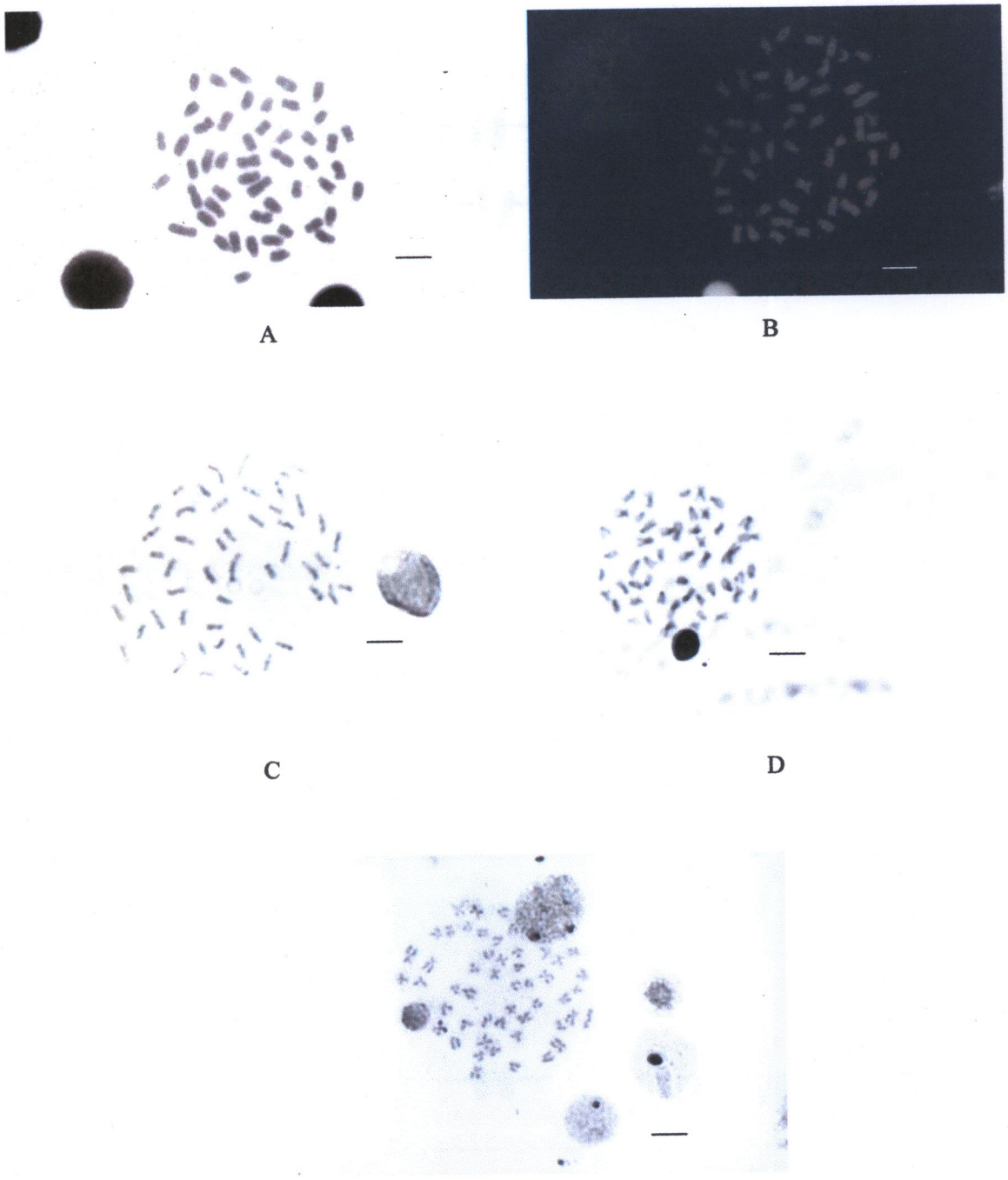


(scale bar = 2μm)

รูป 47 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura poculi* ย้อมสีแบบ Giemsa stained



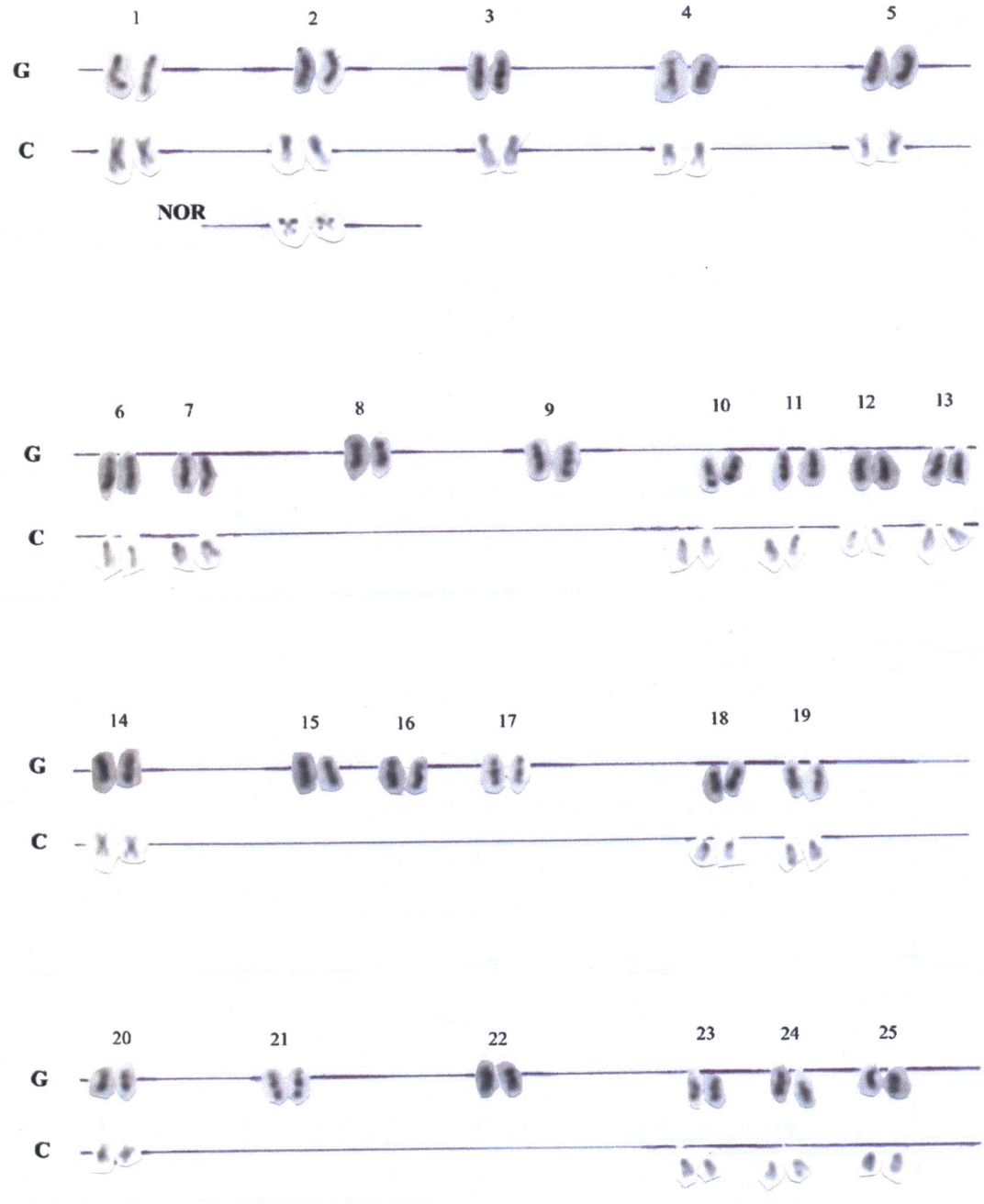
รูป 48 คาริโอไทป์ของ *Schistura poculi* ซึ่งประกอบด้วย 8m+8sm+12a+22t (2n=50)



A B C D E (scale bar = 2μm)

รูป 49 โครโมโซมระยะ metaphase ของ *Schistura poculi*

A) Giemsa stained, B) Q-banding, C) G-banding, D) C-banding, E) NOR banding



รูป 50 คาริโอไทป์ของ *Schistura poculi* ย้อมสีแบบพิเศษ

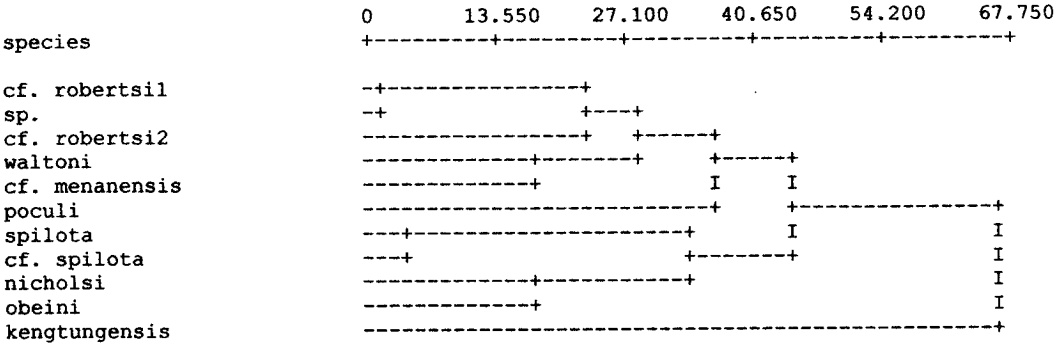
G: G-banding, C: C-banding และ NOR: NOR banding

ตาราง 15 ความยาวเฉลี่ย (หน่วยสัมพัทธ์) ของโครโมโซมจากเซลล์ของ *Schistura poculi* จำนวน 10 เซลล์

Chromosome pair	Ls ± SD	LI ± SD	Lt ± SD	CI ± SD	Type
1	5.100 ± 0.126	8.400 ± 0.126	13.50 ± 0.200	0.622 ± 0.251	sm
2	5.300 ± 0.400	6.60 ± 0.200	11.90 ± 0.400	0.555 ± 0.217	m
3	3.220 ± 0.160	6.760 ± 0.080	9.98 ± 0.160	0.677 ± 0.272	sm
4	2.000 ± 0.000	7.380 ± 0.117	9.38 ± 0.117	0.787 ± 0.320	a
5	4.400 ± 0.000	4.520 ± 0.240	8.920 ± 0.240	0.506 ± 0.202	m
6	0.000 ± 0.000	8.660 ± 0.080	8.660 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
7	0.000 ± 0.000	8.400 ± 0.126	8.400 ± 0.126	1.000 ± 0.408	t
8	3.040 ± 0.080	5.100 ± 0.126	8.140 ± 0.196	0.627 ± 0.254	sm
9	1.700 ± 0.000	6.140 ± 0.196	7.840 ± 0.196	0.783 ± 0.318	a
10	0.000 ± 0.000	7.720 ± 0.160	7.720 ± 0.160	1.000 ± 0.408	t
11	0.000 ± 0.000	7.400 ± 0.126	7.400 ± 0.126	1.000 ± 0.408	t
12	0.000 ± 0.000	7.280 ± 0.117	7.280 ± 0.117	1.000 ± 0.408	t
13	0.000 ± 0.000	7.160 ± 0.080	7.160 ± 0.080	1.000 ± 0.408	t
14	3.280 ± 0.098	3.800 ± 0.000	7.080 ± 0.098	0.537 ± 0.216	m
15	1.500 ± 0.000	5.340 ± 0.174	6.840 ± 0.174	0.781 ± 0.317	a
16	1.400 ± 0.000	5.180 ± 0.098	6.580 ± 0.098	0.787 ± 0.320	a
17	1.400 ± 0.000	5.080 ± 0.098	6.480 ± 0.098	0.784 ± 0.319	a
18	0.000 ± 0.000	6.320 ± 0.147	6.320 ± 0.147	1.000 ± 0.408	t
19	0.000 ± 0.000	5.920 ± 0.160	5.920 ± 0.160	1.000 ± 0.408	t
20	2.840 ± 0.049	2.960 ± 0.080	5.800 ± 0.126	0.510 ± 0.207	m
21	1.200 ± 0.000	4.480 ± 0.098	5.680 ± 0.098	0.789 ± 0.321	a
22	1.740 ± 0.080	3.820 ± 0.040	5.560 ± 0.080	0.687 ± 0.276	sm
23	0.000 ± 0.000	5.200 ± 0.245	5.200 ± 0.245	1.000 ± 0.408	t
24	0.000 ± 0.000	4.820 ± 0.147	4.820 ± 0.147	1.000 ± 0.408	t
25	0.000 ± 0.000	4.280 ± 0.223	4.280 ± 0.223	1.000 ± 0.408	t

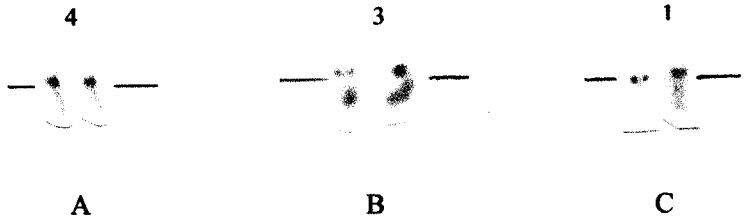
4. ผลการจัดกลุ่มปลาค้อตามลักษณะรูปร่างของโครโมโซม

จากการจัดกลุ่มปลาค้อโดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยวิธี hierarchical cluster analysis โดยใช้ชนิดของโครโมโซมเป็นตัวจัดกลุ่มแบ่งได้ 6 กลุ่ม ดังรูป 51



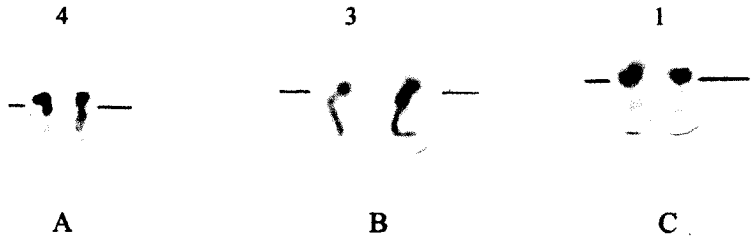
รูป 51 การวิเคราะห์การจัดกลุ่มปลาค้อ 11 ชนิด ด้วยโปรแกรม SPSS วิธี hierarchical cluster analysis

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *S.* cf. *robertsi* 1, *Schistura* sp. และ *S.* cf. *robertsi* 2 (รูป 51) ซึ่งมีคาริโอไทป์ดังนี้ 4m+8sm+8a+30t (2n=50), 6m+8sm+8a+28t (2n=50) และ 6m+12sm+10a+22t (2n=50) ตามลำดับ และพบว่าโครโมโซมคู่ที่ 4 ของ *S.* cf. *robertsi* 1 คล้ายกับโครโมโซมคู่ที่ 3 ของ *Schistura* sp. และโครโมโซมคู่ที่ 1 ของ *S.* cf. *robertsi* 2 เมื่อย้อมด้วยวิธี C-banding และ NOR banding (รูป 52 และ 53) และโครโมโซมทั้ง 3 คู่ เป็นโครโมโซมแบบ acrocentric เหมือนกัน แต่ *S.* cf. *robertsi* 1 และ *Schistura* sp. จะมีความใกล้ชิดกันมากกว่า *S.* cf. *robertsi* 2 ที่เป็นเช่นนี้เพราะ *S.* cf. *robertsi* 1 และ *Schistura* sp. มีรูปแบบของคาริโอไทป์ใกล้เคียงกันมากกว่า *S.* cf. *robertsi* 2



รูป 52 โครโมโซมของปลาค้อ 3 ชนิด ย้อมด้วยวิธี C-banding

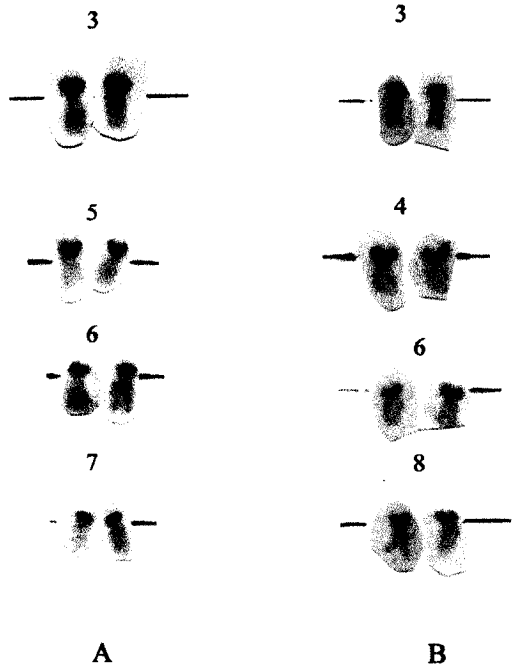
A) *S.* cf. *robertsi* 1, B) *Schistura* sp., C) *S.* cf. *robertsi* 2



รูป 53 โครโมโซมของปลาค้อ 3 ชนิด ย้อมด้วยวิธี NOR banding

A) *S.* cf. *robertsi* 1, B) *Schistura* sp., C) *S.* cf. *robertsi* 2

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *S. waltoni* และ *S.* cf. *menanensis* (รูป 51) ซึ่งมีคาริโอไทป์ดังนี้ 8m+12sm+14a+16t (2n=50) และ 8m+12sm+16a+14t (2n=50) ตามลำดับ และพบว่าบริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 3, 5, 6 และ 7 ของ *S. waltoni* ติดสีแบบ C-banding เหมือนกับโครโมโซมคู่ที่ 3, 4, 6 และ 8 ของ *S.* cf. *menanensis* ตามลำดับ(รูป 54) และเมื่อย้อมสีแบบ NOR banding พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 3 ของปลาทั้ง 2 ชนิดปรากฏ NOR band เหมือนกัน (รูป 55) และโครโมโซมทั้ง 2 คู่ เป็นโครโมโซมแบบ submetacentric เหมือนกัน



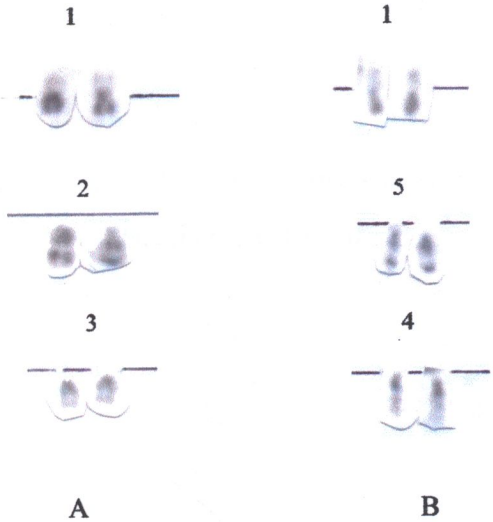
รูป 54 โครโมโซมคู่ที่ 3, 5, 6 และ 7 ของ *S. waltoni* (A) และโครโมโซมคู่ที่ 3, 4, 6 และ 8 ของ *S.* cf. *menanensis* (B) ย้อมด้วยวิธี C-banding

รูป 55 โครโมโซมคู่ที่ 3 ของปลาค้อทั้ง 2 ชนิด ย้อมด้วยวิธี NOR banding

A) *S. waltoni* , B) *S.* cf. *menanensis*

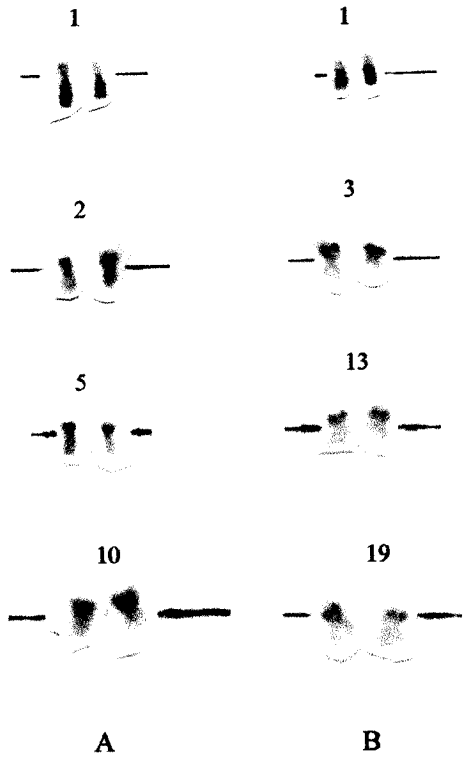
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *S. poculi* เพียงชนิดเดียว (รูป 51) ซึ่งมีคาริโอไทป์ดังนี้ 8m+8sm+12a+22t (2n=50) และเมื่อทำการย้อมสีแบบ C-banding พบว่าโครโมโซมส่วนใหญ่ของปลาชนิดนี้จะติดสีบริเวณ centromere เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นโครโมโซมคู่ที่ 2, 3 และ 4 เท่านั้นที่ปรากฏ band ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซม และเมื่อพิจารณาการย้อมสีแบบ NOR banding พบว่ามี NOR band ปรากฏที่โครโมโซมคู่แบบ metacentric ซึ่งแตกต่างกับชนิดอื่น

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *S. spilota* และ *S.* cf. *spilota* (รูป 51) ซึ่งมีคาริโอไทป์ดังนี้ 12m+8sm+4a+26t (2n=50) และ 6m+4sm+12a+28t (2n=50) ตามลำดับ และเมื่อนำผลที่ได้จากการย้อมสีแบบ C-banding มาประกอบการพิจารณาพบว่าโครโมโซมคู่ที่ 1, 2 และ 3 ของ *S. spilota* ติดสีคล้ายกับโครโมโซมคู่ที่ 1, 5 และ 4 ของ *S.* cf. *spilota* ตามลำดับ (รูป 56)

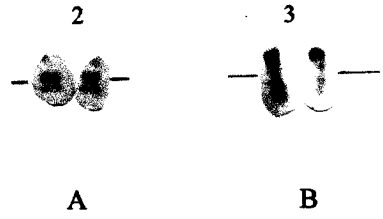


รูป 56 โครโมโซมคู่ที่ 1, 2 และ 3 ของ *S. spilota* (A) และโครโมโซมคู่ที่ 1, 5 และ 4 ของ *S.* cf. *spilota* (B) ย้อมด้วยวิธี C-banding

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *S. nicholsi* และ *S. obeini* (รูป 51) ซึ่งมีคาริโอไทป์ดังนี้ 6m+16sm+8a+20t (2n=50) และ 12m+10sm+4a+24t (2n=50) ตามลำดับ และพบว่าเมื่อนำผลที่ได้จากการย้อมสีแบบ C-banding มาประกอบการพิจารณาจะพบว่า ปลาทั้ง 2 ชนิดมีโครโมโซมคู่ที่ 1 คล้ายกันคือ แขนข้างยาวของโครโมโซมจะติดสีทั้งหมดเหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 2, 5 และ 10 ของ *S. nicholsi* และโครโมโซมคู่ที่ 3, 13 และ 19 ของ *S. obeini* ติดสีคล้ายกันตามลำดับ (รูป 57) และเมื่อย้อมสีแบบ NOR banding พบ NOR band ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมคล้ายกัน (รูป 58)



รูป 57 โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 5 และ 10 ของ *S. nicholsi* (A) และโครโมโซมคู่ที่ 1, 3, 13 และ 19 ของ *S. obeini* (B) ย้อมด้วยวิธี C-banding



รูป 58 โครโมโซมของปลาค้อทั้ง 2 ชนิด ย้อมด้วยวิธี NOR banding

A) *S. nicholsi*, B) *S. obeini*

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย *S. kengtungensis* เพียงชนิดเดียว (รูป 51) ซึ่งมีคาริโอไทป์ดังนี้ 6m+10sm+8a+28t (2n=52) เมื่อย้อมสีแบบ NOR banding จะพบว่ามี NOR band ปรากฏที่ส่วนปลายสุดของโครโมโซมแบบ telocentric

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

การจัดคาริโอไทป์

ได้ทำการศึกษาคาริโอไทป์ของปลาค้อสกุล *Schistura* โดยย้อมด้วยสี Giemsa ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ศึกษาในปลาทั่วๆไป (Ohno and Atkin, 1966) นอกจากนี้ยังได้ทำการย้อมสีโครโมโซมแบบพิเศษอีก 4 แบบ คือ Q-banding, G-banding, C-banding และ NOR banding ซึ่งทั้ง 4 วิธีนี้ได้มีคนได้ทำการศึกษาไว้บ้างแล้วโดยเฉพาะการย้อมแบบ C-banding และ NOR banding ซึ่งนิยมใช้ย้อมในปลาเป็นจำนวนมาก ส่วนการย้อมแบบ Q-banding และ G-banding ได้มีการทำการศึกษาไว้ค่อนข้างน้อย ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปลาค้อทั้ง 10 ชนิดได้แก่ *Schistura* cf. *menanensis*, *S. nicholsi*, *S. obeini*, *S. poculi*, *S.* cf. *robertsi* 1, *S.* cf. *robertsi* 2, *S. spilota*, *S.* cf. *spilota S. waltoni*และ *Schistura* sp. มีจำนวนโครโมโซม 2n=50 ส่วนอีก 1 ชนิดคือ *S. kengtungensis* มีจำนวนโครโมโซม 2n=52 ถึงแม้ว่าปลาทั้ง 10 ชนิดจะมีจำนวนของโครโมโซมเท่ากันแต่ก็มีความแตกต่างกันที่รูปแบบคาริโอไทป์ ซึ่งจำนวนโครโมโซมที่ได้ตรงกับรายงานการศึกษาของปลาค้อสกุล *Noemacheilus* 2 ชนิด คือ *N. aureus* และ *N. barbatulus* ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 2n=50 เท่ากัน (Khuda-Bukhsh *et al.*, 1986; Collares-Pereira *et al.*1995)

สำหรับการย้อมสีแบบ C-banding นั้น พบว่าโครโมโซมของปลาค้อส่วนใหญ่จะย้อมติดสีบริเวณ centromere เช่นเดียวกับการศึกษา C-banding ในปลาชนิดอื่นๆ (Uwa and Ojima, 1981; Ojima, 1983) และยังพบอีกว่าโครโมโซมบางคู่มีการติดสีบริเวณปลายแขนข้างใดข้างหนึ่ง หรืออาจจะติดสีตรงกลางของแขนใดแขนหนึ่ง หรือติดสีทั้ง 2 ตำแหน่ง และบางครั้งอาจติดสีตลอดทั้งแขนข้างใดข้างหนึ่งซึ่งสามารถพบได้ในปลาชนิดอื่นเช่นกัน (Gregury *et al.*,1980; Ojima, 1983; Almeida-Toled *et al.*, 1995; Campos *et al.*, 1997)

การย้อมสีแบบ NOR banding ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมทำมากในปลา (Gold *et al.*, 1990) จากการทดลองนี้พบว่าปลาค้อทุกชนิดเมื่อย้อมสีด้วยวิธีนี้จะพบการติดสีที่บริเวณ Nucleolus Organizer Regions จำนวน 1 คู่ ซึ่งจะสามารถพบได้ในโครโมโซมทุกชนิด ซึ่งตรงกับการรายงานของ Klinkhard (1998) กล่าวว่า NOR band สามารถพบได้ในโครโมโซมทุกชนิดมีตำแหน่งที่ปรากฏทั้งหมด 14 แบบ ยังมีรายงานพบ NOR band ได้ในปลาชนิดอื่นๆ เช่น ปลาซิวข้าวสารสกุล *Oryzias* (Uwa and Ojima, 1981; Uwa, 1986) และปลากลุ่มปลาตะเพียน (จันทิมา, 2542; Forest *et al.*, 1981; Magtoon and Aria, 1993; Almeida-Toledo *et al.*, 1995; García *et al.*, 1995)

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าตำแหน่งที่พบ NOR band ในปลาทั้ง 11 ชนิดเมื่อย้อมสีแบบ C-banding จะปรากฏแถบสีเข้มที่บริเวณเดียวกันซึ่งสามารถพบได้ในปลาชนิดอื่นเช่นกัน (Gregury *et al.*, 1980; Jankun *et al.*, 1998; Woznicki *et al.*, 1998)

การย้อมสีแบบ G-banding วิธีนี้มีคนทำการศึกษาค่อนข้างน้อย อาจเนื่องมาจากปลาส่วนใหญ่มีจำนวนโครโมโซมค่อนข้างมาก และโครโมโซมมีขนาดเล็ก (Gold *et al.*, 1990) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ผลที่ได้ก็ช่วยทำให้การจับคู่โครโมโซมแต่ละคู่ทำได้ง่ายมากยิ่งขึ้นเช่นเดียวกับการศึกษาในปลา *Salmo salar* ผลที่ได้ช่วยทำให้การจับคู่คาริโอไทป์ของโครโมโซมทำได้ง่ายขึ้น (Purdom, 1993)

การย้อมสีแบบ Q-banding วิธีนี้มีการศึกษากันค่อนข้างน้อย อาจเนื่องมาจากการตรวจวิเคราะห์ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ซึ่งมีราคาแพง สีสะท้อนแสงฟลูออเรสเซนต์ไม่ค่อยคงทนจะจางค่อนข้างเร็ว และแสดงรายละเอียดของโครโมโซมน้อยกว่าการย้อมสีแบบ G-banding จึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์โครโมโซมแต่ละแท่งได้ละเอียด (นิตย์ศรี, 2541) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีปลาเพียงชนิดเดียวคือ *Schistura spilota* ที่ปรากฏแถบสีบริเวณปลายแขนของโครโมโซมคู่ที่ 3 แบบ telocentric เพียงคู่เดียวเช่นเดียวกับการศึกษาในปลาตูหนา (*Anguilla anguilla*) (Medrano *et al.*, 1988)

การเปรียบเทียบคาริโอไทป์ระหว่างชนิด

เนื่องจากปลาค้อสกุล *Schistura* ยังไม่มีรายงานว่ามีผู้ใดเคยทำการศึกษามาก่อน จะมีก็เพียงปลาค้อสกุล *Nemacheilus* 2 ชนิด ซึ่งได้มีการรายงานเพียงจำนวนโครโมโซมแต่ไม่ได้รายงานถึงรูปแบบของคาริโอไทป์ พบว่า *N. aureus* และ *N. barbatulus* มีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 2n=50 (Khuda-Bukhah *et al.*, 1986; Collares-Pereira *et al.*1995) ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับปลาค้อสกุล *Schistura* ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ ยกเว้น *S. kengtungensis* ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 2n=52 จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปลาค้อแต่ละชนิดที่ทำการศึกษามีรูปแบบคาริโอไทป์แตกต่างกัน

จากการศึกษาในครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์กับลักษณะภายนอก (ตาราง 16) พบว่าปลาในกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *S. poculi*, กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *S. spilota* กับ *S.* cf. *spilota* และกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *S. nicholsi* กับ *S. obeini* ของการศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์มีความสัมพันธ์กับกลุ่มที่จัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะภายนอก ซึ่งในกลุ่มที่ 3 ที่ประกอบด้วย *S. poculi* จะเห็นว่าปลาชนิดดังกล่าวมีลักษณะของโครโมโซมแตกต่างจากชนิดอื่นๆ ชัดเจน ผลจากการย้อมสีแบบ C-banding พบว่าโครโมโซมส่วนใหญ่ของปลาชนิดนี้จะติดสีบริเวณ centromere เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นโครโมโซมคู่ที่ 2, 3 และ 4 เท่านั้นที่ปรากฏ band ที่แขนข้างสั้น

ของโครโมโซม สำหรับการย้อมสีแบบ NOR banding พบว่ามี NOR band ปรากฏที่โครโมโซมคู่แบบ metacentric ซึ่งแตกต่างกับชนิดอื่น และเมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกพบว่า *S. poculi* มีลักษณะลายบนลำตัวที่แตกต่างจากชนิดอื่นๆ ชัดเจนเช่นกัน สำหรับกลุ่มที่ 4 ที่จัดเป็นกลุ่มเดียวกันตามชนิดของโครโมโซม และพิจารณาร่วมกับการย้อมสีแบบ C- banding พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 1, 2 และ 3 ของ *S. spilota* ติดสีคล้ายกับโครโมโซมคู่ที่ 1, 5 และ 4 ของ *S.* cf. *spilota* ตามลำดับ และลักษณะภายนอกก็มีลักษณะที่เฉพาะคือลายบนลำตัวมีรูปแบบเป็นจุดอยู่บนลำตัวคล้ายกันซึ่งแตกต่างจากชนิดอื่นๆ และกลุ่มที่ 5 ที่จัดเป็นกลุ่มเดียวกันตามชนิดของโครโมโซม และพิจารณาร่วมกับการย้อมสีแบบ C- banding พบว่าปลาทั้ง 2 ชนิดมีโครโมโซมคู่ที่ 1 คล้ายกันคือ แขนข้างยาวของโครโมโซมจะติดสีทั้งหมดเหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 2, 5 และ 10 ของ *S. nicholsi* และโครโมโซมคู่ที่ 3, 13 และ 19 ของ *S. obeini* ติดสีคล้ายกันตามลำดับ และเมื่อย้อมสีแบบ NOR banding พบ NOR band ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซม 1 คู่คล้ายกัน และลักษณะภายนอกของปลากลุ่มนี้ก็คล้ายกัน และขณะมีชีวิตครีบหางของปลาทั้ง 2 ชนิดมีสีแดงเหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบอีกว่าปลากลุ่มที่ 4 และ 5 มีโครโมโซมคู่ที่ 1 ของปลาทั้ง 4 ชนิดจะปรากฏ C- banding ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมตลอดทั้งแท่งเหมือนกัน ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ที่ปลาทั้ง 4 ชนิดซึ่งอยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกันนี้อาจมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก่อนเพราะ heterochromatin สามารถบอกถึงความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ (ดนัย และอังสนา, 2539) ส่วนปลากลุ่มที่ 2 ที่จัดตามชนิดของโครโมโซม คือ *S. waltoni* กับ *S.* cf. *menanensis* เมื่อเปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มโดยดูลักษณะภายนอก ปลา 2 ชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *S. kengtungensis* แต่ *S. kengtungensis* มีจำนวนโครโมโซม 2n=52 จึงทำให้เมื่อจัดตามชนิดโครโมโซมปลาชนิดดังกล่าวจึงถูกจัดแยกออกไป สำหรับปลากลุ่มที่ 1 ที่จัดตามชนิดของโครโมโซมจะประกอบด้วยปลา 3 ชนิด คือ *S.* cf. *robertsi* 1, *Schistura* sp. และ *S.* cf. *robertsi* 2 เมื่อพิจารณาร่วมกับการย้อมสีแบบ C-banding และ NOR banding พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 4 ของ *S.* cf. *robertsi* 1 โครโมโซมคู่ที่ 3 ของ *Schistura* sp. และโครโมโซมคู่ที่ 1 ของ *S.* cf. *robertsi* 2 จะติดสีเหมือนกัน แต่เมื่อทำการจัดกลุ่มตามลักษณะภายนอกจะจัดแยกเป็น 2 กลุ่มที่อยู่ใกล้เคียงกัน คือ *S.* cf. *robertsi* 1 กับ *S.* cf. *robertsi* 2 เป็นกลุ่มเดียวกันซึ่งปลาทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีลายบนลำตัวคล้ายกัน และ *Schistura* sp. เป็นอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งลายบนลำตัวจะต่างจาก *S.* cf. *robertsi* 1 กับ *S.* cf. *robertsi* 2

การเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมในปลาชนิดหนึ่งเป็นอีกชนิดหนึ่งคาดว่ามีผลมาจากการเกิด Robertsonian translocation ซึ่งเหตุการณ์ดังกล่าวมีผลต่อวิวัฒนาการในสัตว์มีกระดูกสันหลังพบมากในรูปแบบของ Robertsonian fusion และ Robertsonian fission (อมรา, 2540) ดังตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย *S. waltoni* และ *S.* cf. *menanensis* ปลาทั้ง 2 ชนิดมีจำนวนโครโมโซมแบบ

metacentric และ submetacentric เท่ากันแต่ *S.* cf. *menanensis* มีจำนวนโครโมโซมแบบ acrocentric มากกว่า *S. waltoni* 1 คู่ และมีโครโมโซมแบบ telocentric น้อยกว่า 1 คู่ ซึ่งจำนวนโครโมโซมแบบ telocentric ที่เพิ่มขึ้น 1 คู่ใน *S. waltoni* อาจเป็นผลมาจากเกิด Robertsonian fission กับโครโมโซมแบบ acrocentric ของ *S.* cf. *menanensis* ได้โครโมโซมแบบ telocentric ชิ้นใหญ่ และชิ้นเล็กอย่างละ 1 คู่ และคาดว่าโครโมโซมชิ้นเล็กหายไปในระหว่างการแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนแปลงในปลากลุ่มอื่นๆ คาดว่าเป็นผลจาก Robertsonian translocation เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ojima (1983) ซึ่งพบ Robertsonian translocation ในปลาชนิดอื่นๆ ด้วย

ตาราง 16 เปรียบเทียบการจัดกลุ่มความใกล้ชิดของปลาค้อ

กลุ่มที่	ตามชนิดของโครโมโซม	ตามลักษณะภายนอก
1	*S.* cf. *robertsi* 1, *Schistura* sp., *S.* cf. *robertsi* 2	*S.* cf. *menanensis*, *S. kengtungensis*, *S. waltoni*
2	*S.* cf. *menanensis*, *S. waltoni*	*S. nicholsi*, *S. obeini*
3	*S. poculi*	*S.* cf. *robertsi* 1, *S.* cf. *robertsi* 2
4	*S. spilota*, *S.* cf. *spilota*	*Schistura* sp.
5	*S. nicholsi*, *S. obeini*	*S. spilota*, *S.* cf. *spilota*
6	*S. kengtungensis*	*S. poculi*

การเตรียมเซลล์

เซลล์ที่เลือกใช้ในการศึกษาตอนแรกเลือกเฉพาะไต (Park and Park, 1979; Rishi, 1979) แต่ได้เซลล์ไม่มากพบเนื่องจากปลาที่ทำการทดลองมีขนาดเล็ก ดังนั้นจึงได้เลือกเอาเหงือก (Chen and Ebeling, 1968; Nanda *et al.*, 1995) มาใช้เตรียมเพิ่มซึ่งทำให้ปริมาณเซลล์ที่ต้องการมีมากเพียงพอ สำหรับการเตรียมเซลล์ในระยะ metaphase นั้น พบว่าในปลาแต่ละชนิดจำนวนโครโมโซมมีความแตกต่างกันไม่มากนัก และความแตกต่างของเวลาที่เกิดระยะ metaphase จะขึ้นกับชนิด และขนาดของปลา ในการใช้สารละลายโคลชิซินได้ทดลองโดยแช่ปลาในสารละลายโคลชิซิน (Chen and Ebeling, 1968) พบว่าวิธีนี้ให้ผลไม่ค่อยดี จึงเปลี่ยนมาใช้วิธีฉีดซึ่งให้ผลดีกว่าวิธีแรก ซึ่งในช่วงแรกหลังจากฉีดปลาแล้ว 6-8 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ พบว่าจะสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ในระยะ metaphase ได้มาก แต่โครโมโซมสั้นมาก และขากางซึ่งไม่เหมาะสมที่จะใช้ย้อมสีแบบ G- และ Q-banding จึงได้ลดเวลาลงเหลือ 1-2 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ได้เซลล์ในระยะ metaphase ที่มีโครโมโซม

ยาวและเหมาะสมกับการย้อมสีแบบพิเศษ แต่การลดเวลาลงก็ทำให้ได้เซลล์ในระยะ metaphase ลดน้อยลงตามไปด้วย แต่ก็เลือกเวลาในช่วงนี้เนื่องจากทำให้ได้โครโมโซมที่เหมาะสมกับการย้อมสี และพบว่าสารละลายโคลชิซิน 0.01% สามารถหยุดการแบ่งเซลล์ให้อยู่ในระยะ metaphase ได้ดี และในระหว่างที่ทำการศึกษายังได้ทดลองเลี้ยงเซลล์โดยเลือกเซลล์ส่วนครีบมาทำการเลี้ยง (ดัดแปลงจากวิธีของ Uwa and Ojima, 1981) สามารถเลี้ยงได้แต่ไม่นานเซลล์ดังกล่าวก็ตาย เนื่องจากไม่มีตู้อบ (incubator) ที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 22-28 องศาเซลเซียส แต่ถ้าเราสามารถเลี้ยงเซลล์ของปลาได้จะช่วยลดปัญหาในเรื่องของจำนวน metaphase และขนาดโครโมโซมได้ โดยเฉพาะปลาที่มีขนาดเล็กเมื่อทำการเตรียมเซลล์แบบเดิมจะทำให้ได้เซลล์ในระยะ metaphase น้อย ขนาดของโครโมโซมในแต่ละ metaphase แตกต่างกันมาก และโครโมโซมที่ได้ก็ไม่ค่อยเหมาะสมที่จะนำมาย้อมสีแบบพิเศษ ดังเช่นการทดลองของ Lingyun (1986) ซึ่งได้ทำการเลี้ยงเซลล์ของปลา *Misgurnus anguillicaudatus* และปลาไหล (*Monopterus albus*) จาก lymphocytes ผลที่ได้ทำให้ได้โครโมโซมที่มีขนาดยาว มีขนานสม่ำเสมอและสามารถย้อมสีแบบ G-band ได้แถบที่ชัดเจนกว่าการย้อมแบบเก่า ที่สำคัญถ้าสามารถเลี้ยงเซลล์ได้จะทำให้ใช้ตัวอย่างปลาในการศึกษาไม่มากเหมือนวิธีเดิม

การย้อมสีแบบพิเศษ

1. การย้อมสีแบบ Q-banding

เวลาที่ใช้แช่สไลด์ใน Methanol (absolute, 75% และ50%) พบว่าช่วงเวลาในการแช่สไลด์ถ้าต่ำกว่า 5 นาที การติดสีจะไม่ค่อยชัดเจน แต่ช่วงเวลาตั้งแต่ 5 นาที เป็นต้นไปจะให้ผลที่ไม่แตกต่างกันดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกช่วงเวลาดังกล่าว สิ่งสำคัญในการย้อมสีวิธีนี้คือ ต้องได้โครโมโซมที่มีคุณภาพดี มีการกระจายตัวดี และมี cytoplasm เหลือน้อยที่สุด สิ่งที่สำคัญอีกประการคือการปรับ pH ของ buffer ให้เหมาะสมกับโครโมโซมที่เตรียมได้ในแต่ละห้องปฏิบัติการ คุณภาพของน้ำกลั่นที่ใช้ ก็มีความจำเป็น ถ้าสามารถปรับปรุงแก้ไขการย้อมจนได้สวยชัดเจนแล้วก็จะสามารถย้อมได้ดีตลอดโดยใช้เทคนิคเดิม

2. การย้อมสีแบบ G-banding

ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้แช่สไลด์ใน Trypsin การทดลองครั้งนี้ได้แบ่งความเข้มข้นออกเป็น 2 ระดับคือ 0.05% และ 0.10% และระยะเวลาแช่สไลด์ประกอบด้วย 1, 2, 3, 4, 5, 10 และ 15 วินาที พบว่าความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมคือ 0.05% Trypsin ใช้เวลา 1-2 วินาที ส่วนความเข้มข้นและเวลาที่เหลือจะไม่เหมาะสมที่จะใช้เนื่องจาก Trypsin จะย่อยโครโมโซมมากเกินไป ทำให้โครโมโซมยุ่ยเมื่อย้อมสีจะไม่เกิด band สิ่งสำคัญในการย้อมสีวิธีนี้คือ ต้องได้โครโมโซมที่มี

คุณภาพดี มีการกระจายตัวดี และมี cytoplasm เหลือน้อยที่สุด นอกจากนี้อายุสไลด์ก็มีผลต่อการย้อมสีในการทดลองครั้งนี้จะใช้สไลด์ที่มีอายุไม่เกิน 3 วัน ถ้าเวลามากกว่านี้ต้องทำการปรับวิธีการใหม่ และสไลด์ไม่ควรมีอายุเกิน 7 วัน เพราะสไลด์ดังกล่าวจะไม่เหมาะที่จะนำมาย้อมสีวิธีนี้

3. การย้อมสีแบบ C-banding

ระยะเวลาในการแช่สไลด์ใน 0.2 N HCl ที่อุณหภูมิห้อง และเวลาในการแช่สไลด์ใน $Ba(OH)_2$ ที่ 50 องศาเซลเซียส ซึ่ง $Ba(OH)_2$ ที่ทดลองในครั้งนี้มี 2 ความเข้มข้นคือ 1% $Ba(OH)_2$ และ 5% $Ba(OH)_2$ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้เลือก 1% $Ba(OH)_2$ แช่นาน 20-40 วินาที มาทำการศึกษา จากการทดลองพบว่าเมื่อแช่สไลด์ใน 0.2 N HCl นาน 2 ชั่วโมงใน 5% $Ba(OH)_2$ และ 1% $Ba(OH)_2$ จะทำให้เซลล์ต่างๆ รวมทั้งโครโมโซมบนสไลด์หายไปหมด และถ้าแช่สไลด์ใน 0.2 N HCl นาน 30 นาที แล้วนำมาแช่ใน $Ba(OH)_2$ ทั้ง 2 ความเข้มข้นจะไม่เกิด band เลย แต่เมื่อแช่สไลด์ใน 0.2 N HCl นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ใน 1% $Ba(OH)_2$ ในช่วงเวลา 20-40 วินาที จะพบ band เกิดขึ้น ซึ่งกรรมวิธีที่เหลือโครโมโซมจะไม่ปรากฏ band เลย สิ่งสำคัญในการย้อมสีวิธีนี้คือ ต้องได้โครโมโซมที่มีคุณภาพดี มีการกระจายตัวดี และมี cytoplasm เหลือน้อยที่สุด นอกจากนี้ 2XSSC และ $Ba(OH)_2$ ที่ใช้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง สี Giemsa ที่ใช้ย้อมควรจะใช้ของ Gurr เพราะจะให้ผลที่ดีกว่าของ Fisher chemicals

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษา

ปลาค้อสกุล *Schistura* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด 11 ชนิด พบว่ามี 10 ชนิดมีจำนวนโครโมโซม 2n=50 เท่ากัน ส่วนอีก 1 ชนิดมีจำนวนโครโมโซม 2n=52 โดยปลาค้อแต่ละชนิดมีคาริโอไทป์ ตำแหน่งการติด C-band และ NOR band บนโครโมโซมแตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 17, 18 และ 19 ตามลำดับ

ตาราง 17 คาริโอไทป์ของปลาค้อสกุล *Schistura* ที่พบจากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิง

กลุ่มที่	ชนิด	รูปแบบคาริโอไทป์
1	*S.* cf. *robertsi* 1	4m+8sm+8a+30t
	Schistura sp.	6m+8sm+8a+28t
	S. cf. *robertsi* 2	6m+12sm+10a+22t
2	*S. waltoni*	8m+12sm+14a+16t
	S. cf. *menanensis*	8m+12sm+16a+14t
3	*S. poculi*	8m+8sm+12a+22t
4	*S. spilota*	12m+8sm+4a+26t
	S. cf. *spilota*	6m+4sm+12a+28t
5	*S. nicholsi*	6m+16sm+8a+20t
	S. obeini	12m+10sm+4a+24t
6	*S. kengtungensis*	6m+10sm+8a+28t

ตาราง 18 ตำแหน่งการติดสี C-band บนโครโมโซมปลาค้อ 11 ชนิด

กลุ่ม	ชนิดปลาค้อ	ตลอดแขนข้างยาว	บางส่วนของแขนข้างยาว	ตลอดแขนข้างสั้น	บริเวณ centromere	2 จุด
1	*S.* cf. *robertsi* 1		1(a), 6(m), 7(sm), 11(t)	4(a)	2(m), 3(sm), 5(t), 10(t), 18(t)	
	Schistura sp.		4(t)	3(a), 5(sm)	1(m), 2(m)	
	S. cf. *robertsi* 2			1(a), 3(a)	2(sm), 4(m), 5(m), 6(t), 7(t), 8(sm)	
2	*S. waltoni*			3(sm), 5(sm), 6(a), 7(a)	1(m), 2(t), 4(sm), 10(m), 11(m)	
	S. cf. *menanensis*			3(sm), 4(sm), 6(a), 8(a)	1(m), 2(m), 5(sm), 7(t), 15(m)	
3	*S. poculi*			2(m), 3(sm), 4(a)	1(sm), 5(m), 6(t), 7(t), 10(t), 11(t), 12(t), 13(t), 14(m), 18(t), 19(t), 20(m), 23(t), 24(t), 25(t)	
4	*S. spilota*	1(m), 4(m)	7(a)	6(sm), 13(a)	3(t), 10(m), 14(t), 15(t), 16(t)	2(t)
	S. cf. *spilota*	1(m)	13(sm)	2(a), 6(a), 10(sm)	3(m), 4(t), 7(t), 8(t), 9(a)	5(t)
5	*S. nicholsi*	1(sm)		2(sm), 5(sm), 9(a), 10(sm)	3(t), 4(m), 6(sm), 7(t), 8(m)	
	S. obeini	1(m), 2(m)	10(t)	3(sm), 13(sm), 19(sm)	4(m), 5((m), 8(t), 9(t), 11(t), 23(t)	7(a), 15(a)
6	*S. kengtungensis*		4(t), 15(a)	9(a), 13(sm)	1(sm), 2(m), 5(t), 6(t), 12(m)	

ตาราง 19 ตำแหน่งการติดสีแบบ NOR band บนโครโมโซมแต่ละคู่ในปลาค้อ 11 ชนิด

กลุ่ม	ชนิดปลาค้อ	metacentric	submetacentric	acrocentric	telocentric
1	*S.* cf. *robertsi* 1			4	
	Schistura sp.			3	
	S. cf. *robertsi* 2			1	
2	*S. waltoni*		3		
	S. cf. *menanensis*		3		
3	*S. poculi*	2			
4	*S. spilota*		6		
	S. cf. *spilota*			2	
5	*S. nicholsi*		2		
	S. obeini		3		
6	*S. kengtungensis*				4

สำหรับการย้อมสีโครโมโซมแบบ G-banding พบว่าโครโมโซมของปลาแต่ละชนิดเมื่อย้อมด้วยวิธีนี้แล้วจะช่วยทำให้การจับคู่โครโมโซมทำได้ง่ายขึ้น เพราะว่าโครโมโซมที่เป็นคู่กันจะมีแถบปรากฏเหมือนหรือใกล้เคียงกัน

การย้อมสีแบบ Q-banding จะพบแถบสว่างชัดเจนเฉพาะส่วนปลายของโครโมโซมแบบ telocentric คู่ที่ 3 ในปลา *S. spilota* เพียงชนิดเดียวไม่พบในปลาค้ออีก 10 ชนิดที่ทำการศึกษา

จากการศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์สามารถจัดกลุ่มปลาค้อได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *S.* cf. *robertsi* 1, *Schistura* sp. และ *S.* cf. *robertsi* 2 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *S. waltoni* และ*S.* cf. *menanensis* กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *S. poculi* กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *S. spilota* และ *S.* cf. *spilota* กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *S. nicholsi* และ *S. obeini* และกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย *S. kengtungensis* ผลที่ได้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะภายนอกพบว่ากลุ่มที่ 3, 4 และ 5 ให้ผลแบบเดียวกัน แต่สำหรับอีก 3 กลุ่มที่เหลือมีความแตกต่างกันเล็กน้อย

บรรณานุกรม

จันทิมา ปิยะพงษ์. (2542). คาริโอไทป์และการกระจายของบริเวณนิวคลิโอลัสออกาไนเซอร์ของปลาตะเพียน 4 ชนิด ในประเทศไทย. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย.

ชวลิต วิทยานนท์, จรัลธาดา กรรณสูต และจารุจินต์ นภีตะภัฏ. (2540). ความหลากหลายชนิดของปลาน้ำจืดในประเทศไทย. สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ.

ชัดนารี มีสุขโข. (2539). คาริโอไทป์ของหอยกาบน้ำจืดวงศ์ Amblemidae ที่พบในลุ่มน้ำยม และน่าน. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย.

ดนัย บุญเกียรติ และอังสนา อัครพิศาล. (2539). ชีววิทยาโมเลกุลของเซลล์. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 116-131.

ธวัช ดอนสกุล. (2534). การศึกษาโครโมโซมของปลาเนื้ออ่อน ปลาแดง และปลาชะโอนของไทย. รายงานการวิจัย เสนอมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ.

ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. (2534). การศึกษาโครโมโซมของปลาช่อน ช่อนงูเห่า ชะโด กระสง และปลาก้าง ที่พบในประเทศไทย. รายงานการวิจัยเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.

นิตย์ศรี แสงเดือน. (2541). พันธุศาสตร์พืช. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. หน้า 45-68.

วัชรี เที่ยงอยู่. (2541). การตรวจวิเคราะห์ไอโซโครโมโซมเอ็กซ์ โดยวิธีเซลล์พันธุศาสตร์ และอณูเซลล์พันธุศาสตร์ ในผู้ป่วยที่มีกลุ่มอาการเทอร์เนอร์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 56-57.

วิสุทธิ์ ใบไม้. (2533). พันธุศาสตร์. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: เจ้าพระยาระบบการพิมพ์, หน้า 31-34.

สรณรัชฎ์ กาญจนะวณิชย์ และนิรมล มูนจินดา. (2542). คู่มือนักสืบสายน้ำ. กรุงเทพมหานคร. แปลน พริ้นท์ติ้ง. หน้า 27-30.

สุมิตรา วิสุทธารมณ์. (2537). พันธุกรรมของเซลล์ยูคาริโอต. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา. หน้า 41-37.

อมรา คัมภิรานนท์. (2536). พันธุศาสตร์ของเซลล์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 197-228, 283-288.

อมรา คัมภิรานนท์. (2540). พันธุศาสตร์ของเซลล์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 73-77.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. (2538). พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 126-130.

Almeida-Toledo, L. F., A. P. V. Bigoni, G. Bernardino, and S. A. T. Filho. (1995). Chromosomal location of NORs and C-bands in F1 hybrids of bighead carp and silver carp reared in Brazil. Aquaculture, 135: 277-284.

Banerjee, S. K., K. K. Misra, S. Banerjee, and S. P. Ray-Chaudhun. (1988). Chromosome number, genome sizes, cell volumes and evolution of snake-head fish (family Channidae). Journal of Fish Biology, 33: 781-789.

Campos, H., G. Arratia, and C. Cuevas. (1997). Karyotypes of the Mos primitive catfishes (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae). Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research, 35(3): 113-119.

Chen, T. R. (1971). A comparative chromosome study of twenty killifish species of the genus *Fundulus* (Teleostei: Cyprinodontidae). Chromosoma, 32: 436-453.

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

Chen, T. R. and F. H. Ruddle. (1970). A chromosome study of four species and a hybrid of the killifish genus *Fundulus* (Teleostei: Cyprinodontidae). Chromosoma, 29: 255-267.

Collares-Pereira, M. J., J. M. Madeira, and P. Rab. (1995). Spontaneous triploidy in the stone loach *Noemacheilus barbatulus* (Balitoridae). Copeia, 2: 483-484.

Foresti, F., L. F. A. Toledo, and S. A. Toledo. (1981). Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. Cytogenetics and Cell Genetics, 37: 137-144.

García, G., E. Scvortzoff, and A. Hernández. (1995). Karyotypic heterogeneity in South American annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Pisces, Cyprinodontiformes Rivulidae). Cytologia, 60: 103-110.

Geocities. (Nodate). Colchicine used in plant breeding work to induce mutation (polyploidy). [Online]. Available: http://www.geocities.com/RainForest/Vines/2259/colchicine.htm.

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

Gregury, P. E., P. N. Howard-Peebles, R. D. Ellender, and B. J. Martin. (1980). C-banding of chromosomes from three established marine fish cell lines. Copeia, 3: 545-547.

Gustashaw, K. M. 1991. Chromosome stains. In. M. J. Barch (eds.), The ACT cytogenetics laboratory manual, second edition. New York: Raven Press. 205-296.

Ida, H., T. Asahida, K. Yano, and S. Tanaka. (1986). Karyotypes of two sharks, *Chamydoselachus anguinens* and *Heterodontus japonicus*, and their systematic implications. In T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi and K. Matsuura (eds.), Indo-Pacific fish biology: Proceedings of the second international conference on Indo-Pacific fishes. The Ichthyological Society of Japan, Tokyo, pp. 158-163.

Jankun, M., P. Woznicki, G. Dajnowicz, K. Demska-Zakes, M. J. Luczynski, and M. Luczynski. (1998). Heterochromatin and NOR location in northern pike (*Esox lucius*). Aquatic Sciences, 60 (1): 17-21. [Online]. Available: http://ois.xmu.edu.cn/mirrorj/as/tppmsgs/msgs0.htm. [2001, June 25].

Khuda-Bukhsh, A. R. and C. Chakrabarty. (1994). Localization of C-band heterochromatin in metaphase chromosome of two species in Indian major carps. Inland Fish Soc. India,26: 44-46.

Khuda-Bukhsh, A. R. and S. Tiwary. (1994). Study of G-band in two species of fish *Anabas testudineus* and *Labeo rohita*. Inland Fish Soc. India, 26: 47-50.

Khuda-Bukhsh, A. R., T. Chanda, and A. Barat. (1986). Karyomorphology and evolution in some Indian Hillstream fishes with particular reference to polyploidy in some species. In T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi and K. Matsuura (eds.), Indo-Pacific fish biology: Proceedings of the second international conference on Indo-Pacific fishes. The Ichthyological Society of Japan, Tokyo, pp. 886-898.

Klinkhardt, M. B. (1998). Some aspects of karyoevolution in fishes. Animal Research and Development, 47: 7-36.

Kottelat, M. (1990). Indochinese nemacheilines: A revision of nemacheiline loaches (Pisces: Cypriniforms) of Thailand, Burma, Laos, Combodia and Southern Viet Nam. Verlag Dr. Friendrich Pfeil, Mii nchen, FRG. Germany.

Kottelat, M. (1998). Ichthyological exploration of freshwaters. An international journal for field-orientated ichthyology, 9 (1). Mii nchen, Germany.

Lingyun, L. (1986). Studies on making fish chromosomes elongated with high resolution G-banding. In T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi and K. Matsuura (eds.), Indo-Pacific Fish Biology: Proceedings of the second international conference on Indo-Pacific fishes. The Ichthyological Society of Japan, Tokyo, pp. 910-917.

Magtoon, W. (1986). Distribution and phyletic relationahips of *Oryzias* fishes in Thailand. In T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi and K. Matsuura (eds.), Indo-Pacific fish biology: Proceedings of the second international conference on Indo-Pacific fishes. The Ichthyological Society of Japan, Tokyo, pp. 859-866.

Magtoon, W. and R. Arai. (1990). Karyotypes of three Cyprinid fishes, *Osteochilus hasselti*, *O. vittatus* and *Labiobarbus lineatus*, from Thailand. Japanese Journal of Ichthyology, 36 (4) : 483-486.

Magtoon, W. and R. Arai. (1993). Karyotypes and distribution of Nucleolus Organizer Regions in Cyprinid fishes from Thailand. Japanese Journal of Ichthyology, 40(1): 77-85.

Magtoon, W. and R. Arai. (1994). Karyotypes of five *Rasbora* species and one *Danio* species (Cyprinidae) from Thailand. In Proceedings of the fourth Indo-Pacific fish conference Bangkok, Thailand, 28 November–4 December 1993. Faculty of Fisheries. Kasetsart University, Bangkok, pp. 484-496.

Medrano, L., G. Bernardi, J. Couturier, B. Dutrillaux, and G. Bernardi. (1988). Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. Chromosoma, 96: 178-183.

Minrong, C., Y. Xinggi, and Y. Xiaomu. (1996). Karyotypes studies on the bisexual nature gynogenetic crucian carp (*Carassius auratus*) of Pengze. Acta-Hydrobiologica Sinica (China), 20(1): 25-31.

Nanda, I., M. Schartl, W. Feichtinger, I. Schlupp, J. Parzefall, and M. Schmid. (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.

Nayyar, R. P. (1966). Karyotype studies in thirteen species of fishes. Genetica, 37: 78-92.

Nelson, J. S. (1994). Fishes of the world. 3rd edition. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Ohno, S. and N. B. Atkin. (1966). Comparative DNA values and chromosome complements of eight species of fishes. Chromosoma, 18: 455-466.

Ojima, Y. 1983. Fish cytogenetics. In. A. K. Sharma, and A. Sharma (eds.), Chromosomes in evolution of eukaryotic groups (I). Florida: CRC Press, Inc. 111-145.

Park, E. H. and S. D. Park. (1979). A culture technique using marine fish kidney to obtain chromosomes. Journal of Fisheries Research. Board Can. 36: 458-461.

Purdom, C. E. (1993). Genetics and fish breeding. London: Chapman & Hall.

Rainboth, W. J. (1996). Fishes of the Cambodian Mekong. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

Rishi, K. K. (1979). Somatic G-banding chromosomes of *Colisa fasciatus* (Perciformes: Belontidae) and confirmation of female heterogamety. Copeia (1). 146-149.

Ren, X., J. Cui, and Q. Yu. (1992). Chromosomal heterochromatin differentiation of cyprinid fishes. Genetica, 87 (1). 47-51.

Smith, H. M. (1945). Fresh-water fish of Siam, or Thailand. United States: Government Printing Office, Washington.

Takai, A. and Y. Ojima. (1986). Some features on nucleolus organizer regions in fish chromosome. In T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi and K. Matsuura (eds.), Indo-Pacific fish biology: Proceedings of the second international conference on Indo-Pacific fishes. The Ichthyological Society of Japan, Tokyo, pp. 899-909.

Uwa, H. (1986). Karyotype evolution and geographical distribution in the ricefish, Genus *Oryzias* (Oryziidae). In T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi and K. Matsuura (eds.), Indo-Pacific fish biology: Proceedings of the second international conference on Indo-Pacific fishes. The Ichthyological Society of Japan, Tokyo, pp. 867-876.

Uwa, H. and W. Magtoon. (1986). Description and karyotype of a new ricefish, *Oryzias mekongensis*, from Thailand. Copeia(2): 473-478.

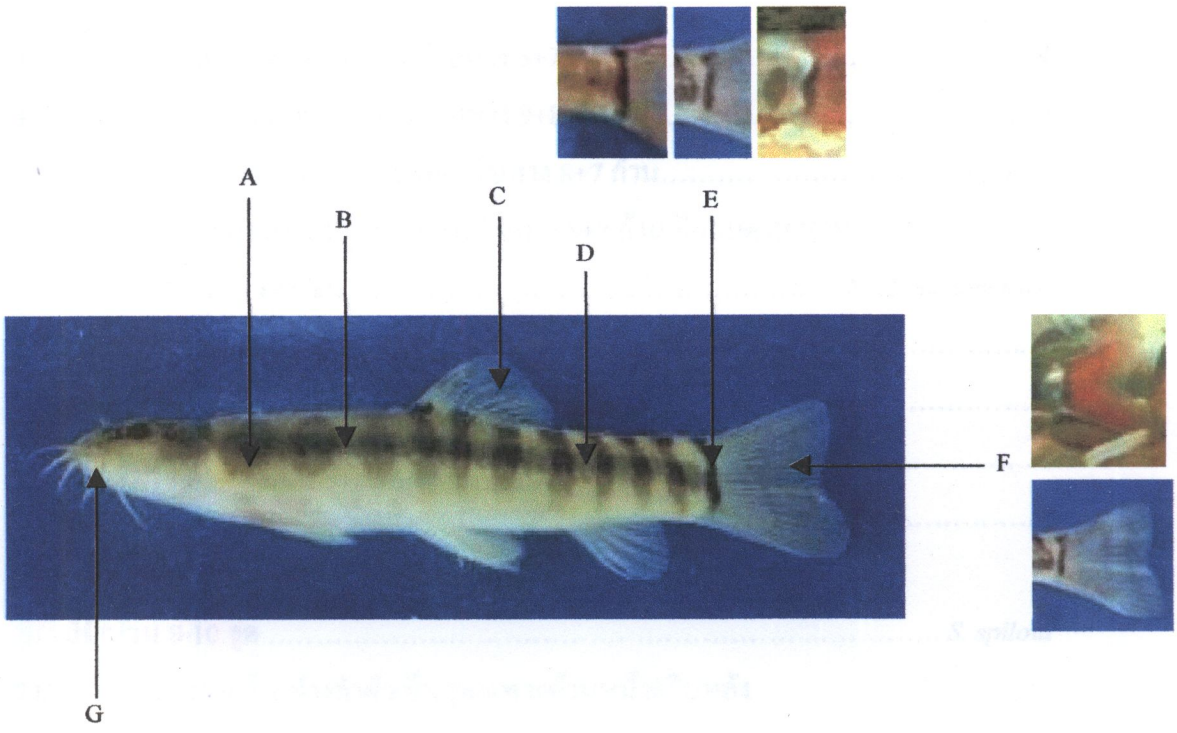
Uwa, H. and Y. Ojima. (1981). Detailed and banding karyotype analyses of the Medaka, *Oryzias latipes* in cultured cells. Proceedings of the Japan Academy, 57: 39-43.

Verma, R. S. 1989. Banding techniques, human chromosomes. New York. 80-86.

White, M. J. D. (1973). Animal cytology and evolution, 3rd ed. Cambridge University Press. London. 334-466.

Woznicki, P., M. Jankun and M. Luczynski. (1998). Chromosome polymorphism in *Salmo trutta morpha lacustris* from Poland, Wdzydze Lake population: Variation in the short arm length of chromosome eleven. Aquatic Sciences, 60 (4): 367-375. [Online]. Available: http://jots.xmu.edu.cn/mirrorj/as/tppmsgs/msgs1.htm. [2001, June 25].

ภาคผนวก ก



รูป 1 ลักษณะบางประการที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิดปลาค้อ

A: ลักษณะแถบดำบนลำตัว, B: เส้นข้างลำตัว, C: จำนวนก้านครีบหลัง, D: แถบดำที่พาดทับแนวเส้นข้างลำตัว, E: ลักษณะแถบดำบริเวณคอดหาง, F: รูปแบบ จำนวนก้านครีบ และสีของหางปลาขณะที่ยังมีชีวิต, G: แถบดำบริเวณริมฝีปากล่าง

การจัดจำแนกปลาค้อสกุล *Schistura* บางชนิดที่พบในจังหวัดเชียงใหม่ ดัดแปลงจาก Smith (1945), Kottelat (1990), Rainboth (1996) และ Kottelat (1998)

1 a) เส้นข้างลำตัวไม่สมบูรณ์ และริมฝีปากล่างมีแถบดำ..... 2

1 b) เส้นข้างลำตัวสมบูรณ์ และริมฝีปากล่างไม่มีแถบดำ..... 3

2 a) จุดเริ่มต้นครีบท้องอยู่หลังจุดเริ่มต้นของครีบหลัง และแถบบนลำตัว ส่วนบนและล่างของแต่ละแถบจะเล็กกว่าตรงกลาง..... *S.* cf. *robertsi* 1

2 b) จุดเริ่มต้นครีบท้องอยู่ตรงกับจุดเริ่มต้นของครีบหลังส่วนบนและล่างของแต่ละแถบมีขนาดใกล้เคียงกัน และบริเวณกลางแถบจะไม่ค่อยชัดเจน ..... *S.* cf. *robertsi* 2

3 a) มีก้านครีบอ่อนที่แตกปลายของครีบหาง 8+7-8 ก้าน..... 4

3 b) มีก้านครีบอ่อนที่แตกปลายของครีบหาง 9+8 ก้าน..... 5

4 a) มีก้านครีบอ่อนที่แตกปลายของครีบหาง 8+7 ก้าน..... *S. poculi*

4 b) มีก้านครีบอ่อนที่แตกปลายของครีบหาง 8+8 ก้าน มีแถบดำพาดทับ
เส้นข้างลำตัวชัดเจน ..... *S.* cf. *menanensis*

5 a) แถบดำที่คอดหางสมบูรณ์..... 6

5 b) แถบดำที่คอดหางไม่สมบูรณ์.....9

6 a) รูปแบบของลายด้านข้างลำตัวบางส่วนหรือทั้งหมดเป็นจุด.....7

6 b) รูปแบบของลายด้านข้างลำตัวเป็นแถบ.....8

7 a) รูปแบบของลายด้านข้างลำตัวเป็นจุดตลอดความยาวลำตัว
มีจำนวน 8-10 จุด ..... *S. spilota*

7 b) รูปแบบของลายด้านข้างลำตัวเป็นจุดเฉพาะด้านหน้าครีบหลัง
มีจำนวน 6-8 แถบ.....*S.* cf. *spilota*

8 a) มีแถบตามขวางบนลำตัว 10-14 แถบ แถบตามขวางส่วนที่อยู่หน้า
ครีบหลังส่วนบนจะเชื่อมติดกัน แถบหลังครีบหลังเฉียงไป
ด้านท้ายลำตัว.....*S. obeini*

8 b) มีแถบตามขวางบนลำตัว 8-11 แถบ แถบดังกล่าวมีความกว้างมากกว่า
ส่วนที่เป็นช่องว่าง และไม่เฉียงไปท้ายลำตัว ..... *S. nicholsi*

9 a) รูปแบบของลายบนลำตัวมีขนาดไม่สม่ำเสมอ บางแถบแตกบริเวณ
ด้านล่างของแถบ 10

9 b) รูปแบบของลายบนลำตัวชัดเจน มีสันบริเวณสันด้านบน และล่าง
ของครีบหาง ..... *Schistura* sp.

10 a) มีแถบตามขวางบนลำตัว 8-12 แถบ แถบบริเวณส่วนท้ายลำตัว
(หลังครีบหลัง) ส่วนด้านล่างจะแยกออกจากกัน.....*S. kengtungensis*

10 b) มีแถบดำพาดทับแนวของเส้นข้างลำตัวจางๆ มีแถบตามขวาง
บนลำตัวไม่สม่ำเสมอเป็นแถบเล็กๆ กระจาย..... *S. waltoni*

ชนิดปลาค้อที่ใช้ในการศึกษา

1. *Schistura kengtungensis* (Fowler, 1936 อ้างตาม Kottelat, 1990)

ลักษณะเด่น

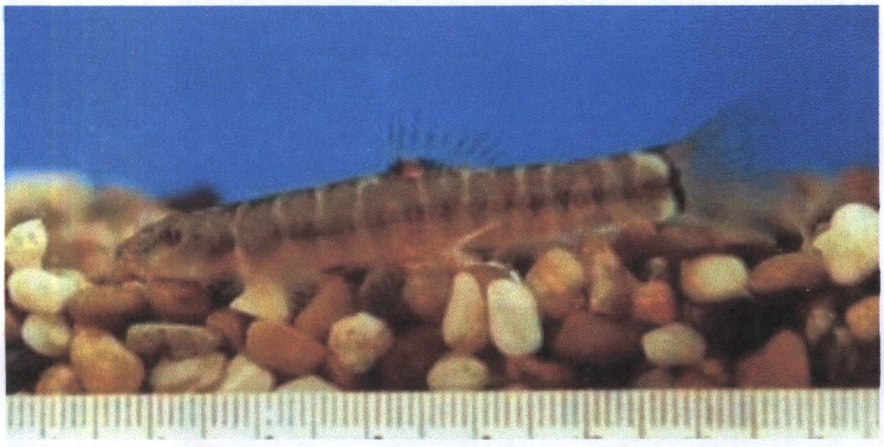
มีเส้นข้างลำตัวสมบูรณ์ มีจำนวนก้านครีบหลังที่แตกปลายจำนวน 8½ ก้าน ครีบหางมีจำนวนก้านครีบที่แตกปลายจำนวน 9+8 ก้าน มีแถบตามขวางบนลำตัว 8-12 แถบ แถบดังกล่าวจะพาดยาวตั้งแต่ส่วนหลังถึงด้านล่าง แต่แถบบริเวณส่วนท้ายลำตัว (ถัดจากครีบหลัง) ส่วนด้านล่างจะแยกออกจากกัน ครีบหางแบบ emaginated มีแถบดำที่ตอดหางไม่สมบูรณ์ (รูป 2)

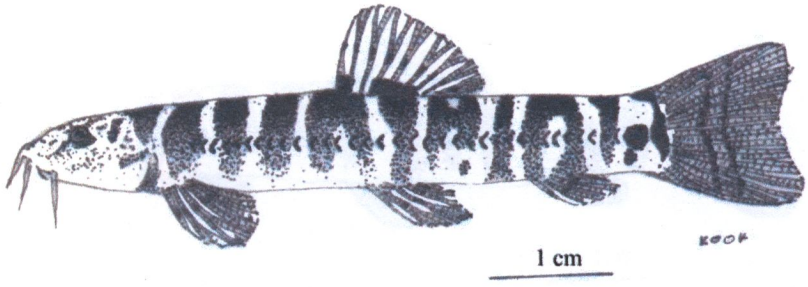
รูป 2 *Schistura kengtungensis*

2. *Schistura* cf. *menanensis*

ลักษณะเด่น

มีเส้นข้างลำตัวสมบูรณ์ มีจำนวนก้านครีบหลังที่แตกปลายจำนวน 8½ ก้าน ครีบหางมีจำนวนก้านครีบที่แตกปลายจำนวน 8+8 ก้าน (แต่ Kottelat (1990) บอกว่ามี 9+8 ก้าน) มีแถบตามขวางบนลำตัวจำนวน 9-11 แถบ มีแถบดำชัดเจนพาดยาวตามแนวเส้นข้างลำตัวตั้งแต่ครีบอกถึงโคนครีบหาง แถบตามขวางบนลำตัวชัดเจนแต่มีขนาดไม่สม่ำเสมอคือบางแถบเล็กบางแถบใหญ่ไม่แน่นอน มีครีบหางแบบ emaginated มีแถบดำที่คอดหางไม่สมบูรณ์ (รูป 3)





รูป 3 *Schistura* cf. *menanensis*

3. *Schistura nicholsi* (Smith, 1933 อ้างตาม Kottelat, 1990)

ลักษณะเด่น

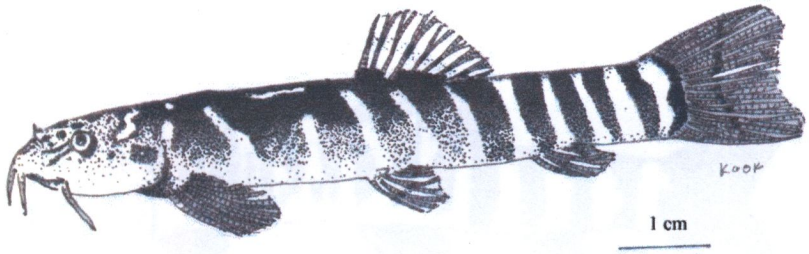
มีเส้นข้างลำตัวสมบูรณ์ มีจำนวนก้านครีบหลังที่แตกปลายจำนวน 8½ ก้าน ครีบหางมีจำนวนก้านครีบที่แตกปลายจำนวน 9+8 ก้าน มีแถบตามขวางบนลำตัว 8-11 แถบ แถบดังกล่าวมีความกว้างมากกว่าส่วนที่เป็นช่องว่าง แถบสีด้านหน้ามีขนาดใหญ่กว่าส่วนที่อยู่ด้านท้าย แถบดังกล่าวจะพาดยาวตั้งแต่ส่วนหลังถึงด้านล่างอย่างชัดเจน และแต่ละแถบจะแยกเป็นอิสระจากกันอย่างชัดเจน ครีบหางแบบ emaginated ขณะมีชีวิตจะมีสีแดงชัดเจน มีแถบดำที่คอดหางสมบูรณ์ (รูป 4)

รูป 4 *Schistura nicholsi*

4. *Schistura obeini* Kottelat, 1990

ลักษณะเด่น

มีเส้นข้างลำตัวสมบูรณ์ มีจำนวนก้านครีบหลังที่แตกปลายจำนวน 8½ ก้าน ครีบหางมีจำนวนก้านครีบที่แตกปลายจำนวน 9+8 ก้าน มีแถบตามขวางบนลำตัว 10-14 แถบ แต่ละแถบจะพาดยาวตั้งแต่ส่วนหลังถึงด้านล่างชัดเจนและจะเฉียงไปท้ายลำตัว แถบตามขวางส่วนที่อยู่หน้าครีบหลังส่วนบนจะเชื่อมติดกันและจะแยกจากกันเมื่อลงมาด้านล่าง ครีบหางแบบ emaginated ขณะที่มีชีวิตจะแดงมาก มีแถบดำที่คอดหาง สมบูรณ์ (รูป 5)



รูป 5 *Schistura obeini*

5. *Schistura poculi* (Smith, 1945)

ลักษณะเด่น

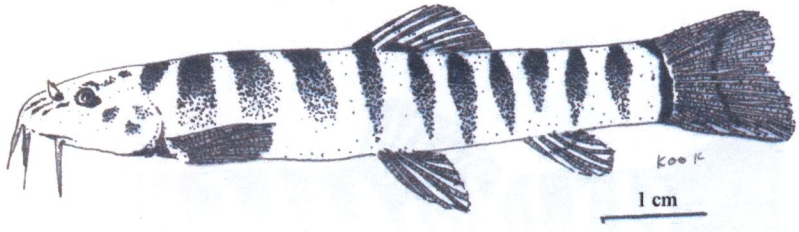
มีเส้นข้างลำตัวสมบูรณ์ มีจำนวนก้านครีบหลังที่แตกปลายจำนวน 8½ ก้าน ครีบหางมีจำนวนก้านครีบที่แตกปลายจำนวน 8+7 ก้าน ลักษณะของแถบสีทางตอนหน้าของครีบหลังถี่มากซึ่งแถบส่วนบนจะเชื่อมติดกันและส่วนล่างจะแยกจากกัน แถบสีที่อยู่ทางตอนท้ายของครีบหลังจะมีขนาดใหญ่และแยกจากกันชัดเจน มีครีบหางแบบ forked ขณะมีชีวิตจะมีสีแดง แถบดำที่คอดหางไม่สมบูรณ์ (รูป 6)

รูป 6 *Schistura poculi*

6. *Schistura* cf. *robertsi* 1

ลักษณะเด่น

มีเส้นข้างลำตัวไม่สมบูรณ์ มีจำนวนก้านครีบหลังที่แตกปลายจำนวน 8½ ก้าน ครีบหางมีจำนวนก้านครีบที่แตกปลายจำนวน 9+8 ก้าน มีแถบตามขวาง (bar) บนลำตัว 9-10 แถบ ยาวตั้งแต่ด้านบนถึงด้านล่าง ส่วนบนและล่างของแต่ละแถบจะเล็กกว่าตรงกลาง และแยกเป็นอิสระจากกันชัดเจน แถบด้านหน้าจะใหญ่กว่าด้านหลัง จุดเริ่มต้นของครีบท้องอยู่หลังจุดเริ่มต้นของครีบหลัง ริมฝีปากล่างมีแต้มสีดำ มีครีบหางแบบ emaginated มีแถบดำที่ขอบหางสมบูรณ์ (รูป 7)

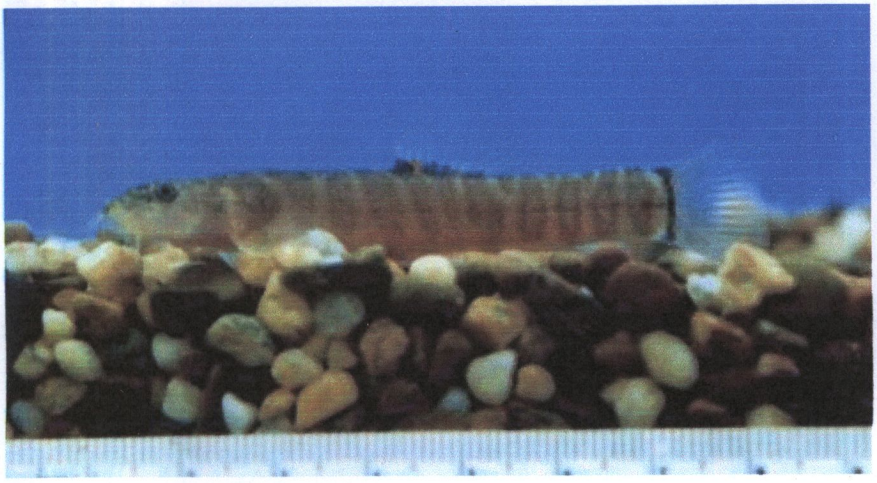


รูป 7 *Schistura* cf. *robertsi* 1

7. *Schistura* cf. *robertsi* 2

ลักษณะเด่น

มีเส้นข้างลำตัวไม่สมบูรณ์ มีจำนวนก้านครีบหลังที่แตกปลายจำนวน 8½ ก้าน ครีบหางมีจำนวนก้านครีบที่แตกปลายจำนวน 9+8 ก้าน มีแถบตามขวางบนลำตัว 8-10 แถบ ยาวตั้งแต่ด้านบนถึงด้านล่าง ส่วนบนและล่างของแต่ละแถบมีขนาดใกล้เคียงกัน และบริเวณกลางแถบจะไม่ค่อยชัดเจน แต่ละแถบแยกเป็นอิสระจากกันชัดเจนแถบดังกล่าวมีความกว้างมากกว่าส่วนที่เป็นช่องว่าง จุดเริ่มต้นของครีบท้องอยู่ตรงกับจุดเริ่มต้นของครีบหลัง ริมฝีปากล่างมีแต้มสีดำอยู่ทั้ง 2 ด้าน มีครีบหางแบบ emaginated มีแถบดำที่ขอบหางสมบูรณ์ (รูป 8)

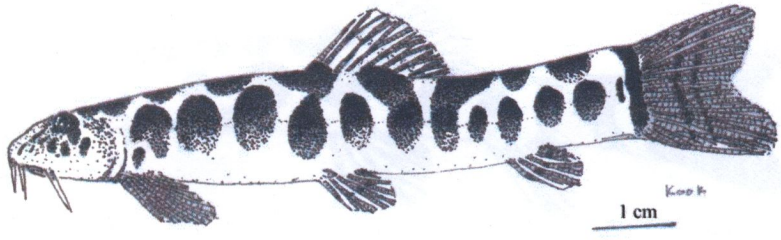


รูป 8 *Schistura* cf. *robertsi* 2

8. *Schistura spilota* (Fowler, 1934 อ้างตาม Kottelat, 1990)

ลักษณะเด่น

มีเส้นข้างลำตัวสมบูรณ์ มีจำนวนก้านครีบหลังที่แตกปลายจำนวน 8½ ก้าน ครีบหางมีจำนวนก้านครีบที่แตกปลายจำนวน 9+8 ก้าน มีคอดหางเรียว ลักษณะของรูปแบบของแถบสีปกติเป็นจุดมีขนาดใหญ่จำนวน 8-10 จุด อยู่ด้านข้างของลำตัวในแนวของเส้นข้างลำตัว โดยจุดด้านหน้าจะมีขนาดใหญ่กว่าจุดที่อยู่ด้านท้ายของลำตัว มีครีบหางแบบ forked ขณะมีชีวิตจะมีสีส้ม มีแถบดำที่คอดหางสมบูรณ์ (รูป 9)

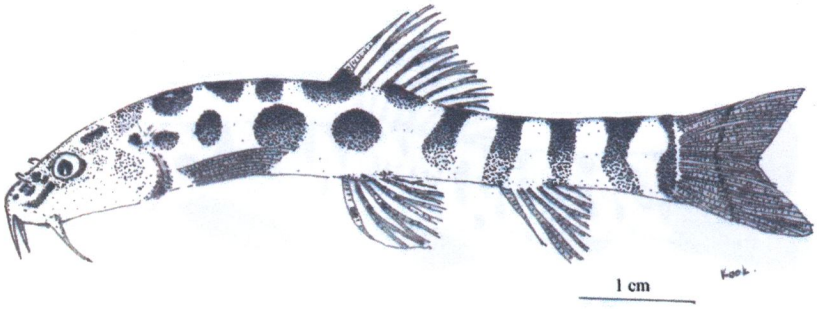


รูป 9 *Schistura spilota*

9. *Schistura* cf. *spilota*

ลักษณะเด่น

มีเส้นข้างลำตัวสมบูรณ์ มีจำนวนก้านครีบหลังที่แตกปลายจำนวน 8½ ก้าน ครีบหางมีจำนวนก้านครีบที่แตกปลายจำนวน 9+8 ก้าน มีคอดหางเรียว ลักษณะของรูปแบบของแถบสีบนลำตัวส่วนหน้าครีบหลังเป็นจุดมีขนาดใหญ่ ส่วนหลังจะเป็นแถบยาวตามขวางลำตัวชัดเจนหรืออาจเป็นจุดบ้าง จำนวนแถบบนลำตัวเท่ากับ 6-8 แถบ มีครีบหางแบบ forked ขณะมีชีวิตจะมีสีส้ม มีแถบดำที่คอดหางสมบูรณ์ (รูป 10)

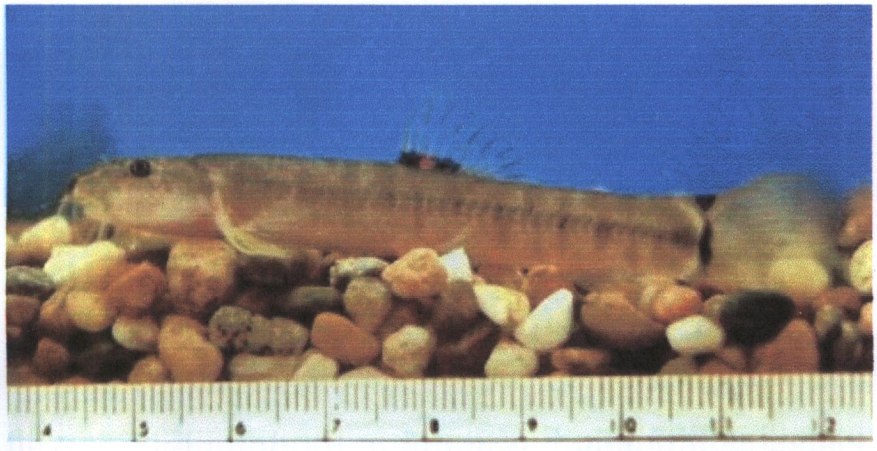


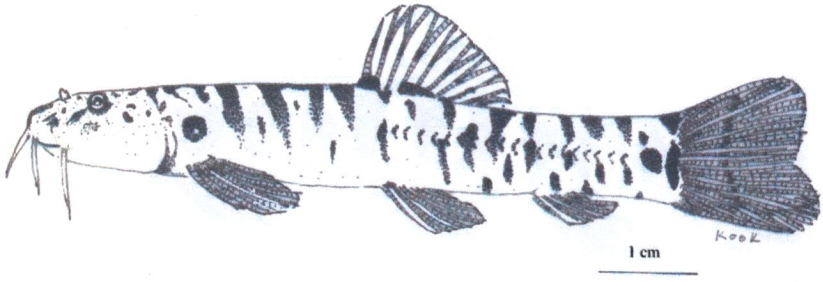
รูป 10 *Schistura* cf. *spilota*

10. *Schistura waltoni* (Fowler, 1937 อ้างตาม Kottelat, 1990)

ลักษณะเด่น

มีเส้นข้างลำตัวสมบูรณ์ มีจำนวนก้านครีบหลังที่แตกปลายจำนวน 8½ ก้าน ครีบหางมีจำนวนก้านครีบที่แตกปลายจำนวน 9+8 ก้าน มีแถบดำด้านข้างลำตัวพาดทับแนวของเส้นข้างลำตัวจางๆ มีแถบตามขวางบนลำตัวไม่สม่ำเสมอเป็นแถบเล็กๆ กระจายโดยเฉพาะส่วนท้ายของลำตัว (หลังครีบหลัง) แถบด้านบนจะกว้างกว่าด้านล่าง ครีบหางแบบ emaginated มีแถบดำที่คอดหางไม่สมบูรณ์ (รูป 11)



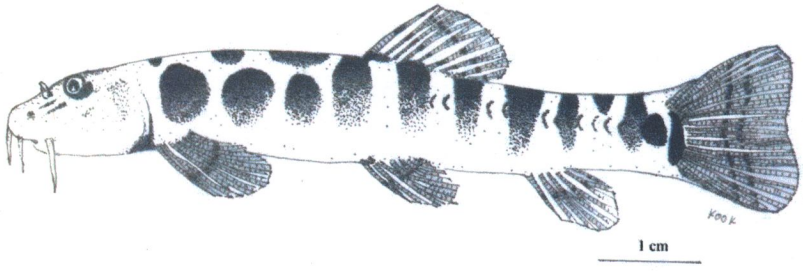


รูป 11 *Schistura waltoni*

11. *Schistura* sp.

ลักษณะเด่น

มีเส้นข้างลำตัวสมบูรณ์ มีจำนวนก้านครีบหลังที่แตกปลายจำนวน 8½ ก้าน ครีบหางมีจำนวนก้านครีบที่แตกปลายจำนวน 9+8 ก้าน จำนวนแถบบนลำตัวเท่ากับ 9-10 แถบ คอดหางไม่เรียว ลักษณะของรูปแบบของแถบสีบนลำตัวส่วนหน้าครีบหลังเป็นจุดมีขนาดใหญ่ ส่วนหลังจะเป็นแถบยาวตามขวางลำตัว บางครั้งก็เป็นจุด ครีบหางแบบ emaginated มีสันบริเวณสันด้านบนและล่างของครีบหาง มีแถบดำที่คอดหางไม่สมบูรณ์ (รูป 12)



รูป 12 *Schistura* sp.

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลาย

1. น้ำยาคงสภาพ (Fixative 3:1)

99.98% Methanol	3 ส่วน
Glacial acetic acid	1 ส่วน

น้ำยาคงสภาพ (Fixative 2:1)

99.98% Methanol	2 ส่วน
Glacial acetic acid	1 ส่วน

2. สารละลาย Hypotonic (0.075 M KCl)

KCl	5.62 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. McIlvain buffer

0.2 M $Na_2HPO_4.H_2O$ (35.6 กรัม/ลิตร)	200 มิลลิลิตร
0.1M Citric acid (21.0 กรัม/ลิตร)	30 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:10 เสมอ

4. สารละลาย Quinacrine

ละลาย Quinacrine. 2HCl 3 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร แล้วเติม McIlvain buffer อีก 23 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 30 มิลลิลิตร

5. สารละลาย 1% $Ba(OH)_2$

$Ba(OH)_2.8H_2O$	1 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

นำสารละลายไปปั่นด้วยเครื่องปั่น 15-20 นาที กรองด้วยกระดาษกรองก่อนใช้ ควรเตรียมเสร็จแล้วใช้ทันที

6. สารละลาย 2 X saline sodium citrate (2XSSC)

sodium chloride (NaCl)	17.5 กรัม
sodium citrate, 2 hydrate ($Na_3C_6H_5O_7$. $2H_2O$)	8.8 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ปรับให้ได้ pH 7.0 โดยใช้ 1N NaOH

7. สารละลาย Weise buffer

KH_2PO_4	0.49 กรัม
Na_2HPO_4	1.14 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

8. สารละลาย 5% Giemsa

Giemsa solution	5 มิลลิลิตร
Weise buffer	95 มิลลิลิตร

กรองด้วยกระดาษกรอง(เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้)

9. สารละลาย trypsin

trypsin (1:250)	2.5 กรัม
0.9% NaCl	100 มิลลิลิตร

สารละลายที่ได้มีความเข้มข้น 2.5% trypsin เก็บไว้ในตู้เย็นช่องแช่แข็ง

2.5% trypsin	1 มิลลิลิตร
0.9% NaCl	49 มิลลิลิตร

จะได้สารละลาย 0.05% trypsin

10. สารละลาย Gelatin

Gelatin	2 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร
Formic acid	1 มิลลิลิตร

สารละลายที่เตรียมได้ควรเก็บไว้ในขวดสีชา และมีอายุนาน 2-3 สัปดาห์

11. สารละลาย Silver nitrate ($AgNO_3$)

$AgNO_3$	5 กรัม
น้ำกลั่น	10 มิลลิลิตร

สารละลายที่เตรียมได้ควรเก็บไว้ในขวดสีชา และเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

การทดลองการย้อมสีแบบพิเศษ

การย้อมสีแบบ Q-banding

ทำการทดลองหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแช่สไลด์ใน Methanol ตั้งแต่ 2-10 วินาที ตามตาราง 1

ตาราง 1 เวลาในการแช่สไลด์ใน Methanol และย้อมในสารละลาย 20 % Quinacrine 20 นาที

Methanol	เวลา (นาที)								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Absolute, 75% และ 50%	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9

หมายเหตุ T = กรรมวิธี รวมทั้งหมด 9 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 สไลด์

ผลการทดลอง

พบว่าช่วงเวลาในการแช่ สไลด์ถ้าต่ำกว่า 5 นาที โครโมโซมจะติดสีเรืองแสงไม่ค่อยชัดเจน แต่ช่วงเวลาตั้งแต่ 5 นาที เป็นต้นไปจะติดสีเรืองแสงชัดเจน ซึ่งผลที่ได้ในแต่ละช่วงเวลาตั้งแต่ 5-10 นาที ไม่แตกต่างกันดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกช่วงเวลาที่ 5 นาที มาใช้ทำการศึกษา

การย้อมสีแบบ G-banding

ทำการทดลองหาความเข้มข้น และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแช่สไลด์ใน Trypsin ตามตาราง 2

ตาราง 2 ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้แช่สไลด์ใน Trypsin

ความเข้มข้น	เวลา (วินาที)						
Trypsin	1	2	3	4	5	10	15
0.05%	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0.10%	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14

หมายเหตุ T = กรรมวิธี รวมทั้งหมด 14 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 สไลด์

ผลการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ได้แบ่งความเข้มข้นของ Trypsin ออกเป็น 2 ระดับคือ 0.05% และ 0.10% และระยะเวลาแช่สไลด์ใน Trypsin ประกอบด้วย 1, 2, 3, 4, 5, 10 และ 15 วินาที พบว่าที่ความเข้มข้น 0.10% Trypsin ในทุกๆ ช่วงเวลาโครโมโซมจะยุ่ยเนื่องจากถูก Trypsin ย่อยมากเกินไป และเมื่อย้อมด้วยสี Giemsa จะไม่มี band เกิดขึ้น

ที่ความเข้มข้น 0.05% Trypsin ในช่วงเวลา 1-2 วินาที โครโมโซมจะไม่ถูกย่อยมากเกินไป และเมื่อย้อมด้วยสี Giemsa จะมี band เกิดขึ้น สำหรับช่วงเวลาที่เหลือโครโมโซมจะยุ่ย และเมื่อย้อมด้วยสี Giemsa จะไม่มี band เกิดขึ้น ดังนั้นจึงเลือกเวลาที่ความเข้มข้น 0.05% Trypsin และใช้เวลา 1-2 วินาที มาใช้ทำการทดลอง

การย้อมสีแบบ C-banding

ทำการทดลองหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแช่สไลด์ใน 0.2 N HCl และหาความเข้มข้นและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแช่สไลด์ใน $Ba(OH)_2$ ตามตาราง 3 และ 4

ตาราง 3 ระยะเวลาในการแช่สไลด์ใน 0.2 N HCl ที่อุณหภูมิห้อง และเวลาในการแช่สไลด์ใน 5% $Ba(OH)_2$ ที่ 50 องศาเซลเซียส

0.2 N HCl	เวลาแช่ใน 5% $Ba(OH)_2$ (นาที)									
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
30 นาที	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
1 ชั่วโมง	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20
2 ชั่วโมง	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30

หมายเหตุ T = กรรมวิธี รวมทั้งหมด 30 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 สไลด์

ตาราง 4 ระยะเวลาในการแช่สไลด์ใน 0.2 N HCl ที่อุณหภูมิห้อง และเวลาในการแช่สไลด์ใน 1% $Ba(OH)_2$ ที่ 50 องศาเซลเซียส

0.2 N HCl	เวลาแช่ใน 1% $Ba(OH)_2$ (นาที)									
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
30 นาที	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
1 ชั่วโมง	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20
2 ชั่วโมง	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30

หมายเหตุ T = กรรมวิธี รวมทั้งหมด 30 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 สไลด์

ผลการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ได้แบ่งช่วงเวลาในการแช่สไลด์ใน 0.2 N HCl ออกเป็น 3 ช่วงคือ 30 นาที 1 และ 2 ชั่วโมง แบ่งความเข้มข้นของ $Ba(OH)_2$ ออกเป็น 2 ระดับคือ 1% และ 5% และระยะเวลาแช่สไลด์ใน $Ba(OH)_2$ แบ่งได้เป็น 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 นาที พบว่าเมื่อแช่สไลด์ใน 0.2 N HCl นาน 2 ชั่วโมง ใน 5% $Ba(OH)_2$ และ 1% $Ba(OH)_2$ จะทำให้เซลล์ต่างๆ รวมทั้งโครโมโซมบนสไลด์หายไปหมด และถ้าแช่สไลด์ใน 0.2 N HCl นาน 30 นาที แล้วนำมาแช่ใน $Ba(OH)_2$ ทั้ง 2 ความเข้มข้นแล้วจึงนำไปย้อมสี Giemsa พบว่าโครโมโซมไม่เกิด band เลย แต่เมื่อแช่สไลด์ใน 0.2 N HCl นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ใน 1% $Ba(OH)_2$ ในช่วงเวลา 20-40 วินาที แล้วนำไปย้อมสี Giemsa พบว่าโครโมโซมมี band เกิดขึ้น สำหรับกรรมวิธีที่เหลือโครโมโซมจะไม่ปรากฏ band เลย ดังนั้นจึงเลือกทำการย้อมสีโครโมโซมแบบ C-banding โดยแช่สไลด์ใน 0.2 N HCl นาน 1 ชั่วโมง และแช่ใน 1% $Ba(OH)_2$ นาน 20-40 วินาที หลังจากนั้นจึงนำสไลด์ไปย้อมด้วยสี Giemsa มาใช้ทำการศึกษา

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ นายเกรียงไกร สีตะพันธุ์

วุฒิการศึกษา สำเร็จมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนพะเยาพิทยาคม จังหวัดพะเยา
สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี จากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ภูมิลำเนา 258 ถนนซุปเปอร์ไฮเวย์ ตำบลต่อม อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000

ทุนการศึกษา ได้รับทุนสนับสนุนจาก โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (BRT 542085) ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยี