พันธุศาสตร์เซลล์และพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาวงศ์อมไข่ (Family Apogonidae) 4 ชนิด

วรรณภา กสิฤกษ์

ดุษฎีนิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวาริชศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ธันวาคม 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมดุษฎีนิพนธ์และคณะกรรมการสอบดุษฎีนิพนธ์ ได้พิจารณาดุษฎีนิพนธ์ของ วรรณภา กสิฤกษ์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมดุษฎีนิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ดร.จันทรา อินทนนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ศาสตราจารย์ ดร.อลงกลด แทนออมทอง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณ์ ปิ่นทอง)

คณะกรรมการสอบดุษฎีนิพนธ์

..... ประธาน

(ดร.วีระยุทธ สุภิวงค์)

..... กรรมการ

(ดร.จันทรา อินทนนท์)

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.อลงกลด แทนออมทอง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณ์ ปิ่นทอง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับดุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 23 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2559

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนดุษฎีนิพนธ์ ระดับปริญญาเอก
จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ 2558

กิตติกรรมประกาศ

ดุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้ได้รับความกรุณาจาก ดร.จันทรา อินทนนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ศาสตราจารย์ ดร.อลงกลด แทนออมทอง และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณ์ ปิ่นทอง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำปรึกษาและให้โอกาสในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดีเสมอมา ตลอดจนให้คำแนะนำในเรื่องการตีพิมพ์ ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ ดร. วีระยุทธ สุภิวงค์ อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย ประธานกรรมการสอบดุษฎีนิพนธ์ และผศ.ดร.ชูตา บุญภักดี อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา กรรมการสอบดุษฎีนิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ ตรวจแก้ไข และวิจารณ์ผลงานวิจัย ทำให้ผลงานวิจัยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมถวิล จริตควร หัวหน้าภาควิชาวาริชศาสตร์ ผศ.ดร. ปภาศิริ บาร์เนท ประธานกรรมการบริหารหลักสูตร และ ดร. วันศุกร์ เสนานาญ อาจารย์ประจำภาควิชาวาริชศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและแนะนำในการทำดุษฎีนิพนธ์ตลอดมา ตลอดจนอาจารย์ประจำภาควิชาวาริชศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความรู้แก่ผู้ทำวิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลที่ให้โอกาสและให้ทุนผู้วิจัยในการเพิ่มพูนความรู้ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนอุดหนุนทำดุษฎีนิพนธ์จากเงินงบประมาณเงินรายได้ รวมทั้งภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ที่ทำงานวิจัย ให้ความสะดวกในการใช้เครื่องมือ และสารเคมีในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณนิสิตกลุ่มพันธุศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความร่วมมือในการทำงานวิจัย รวมถึงนางสาวนภาวัลย์ กสิฤกษ์ นางสาวโสภิต ทองระอา นางสาวชุตินันท์ ศรีสัมพันธ์ และนางสุพัตรา นำพา ที่คอยช่วยเหลือให้ความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีมาตลอด ที่สำคัญขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่วิญญา กสิฤกษ์ ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในการทำวิจัยในทุกๆ ครั้ง

ประโยชน์และคุณค่าของดุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ผู้วิจัยเป็นผู้ที่มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบทุกวันนี้

วรรณภา กสิฤกษ์

54810253: สาขาวิชา: วาริชศาสตร์; ปร.ด.(วาริชศาสตร์)
คำสำคัญ: พันธุศาสตร์เซลล์/ พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล/ ปลาวงศ์อมไข่

วรรณภา กสิฤกษ์: พันธุศาสตร์เซลล์และพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาวงศ์อมไข่ (Family Apogonidae) 4 ชนิด (CYTOGENETICS AND MOLECULAR CYTOGENETICS OF 4 SPICIES OF CARDINALFISHES (FAMILY APOGONIDAE)) คณะกรรมการควบคุมดุษฎีนิพนธ์: จันทรา อินทนนท์, ปร.ด., อลงกลด แทนออมทอง, ปร.ด., กฤษณ์ ปิ่นทอง, ปร.ด. 225 หน้า. ปี พ.ศ. 2559

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์โดยเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์ และศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชันโดยใช้โพรบเทโลเมียร์และโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S ของปลาวงศ์ปลาอมไข่ 4 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis* (Valenciennes, 1832)), ปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis* (Cuvier, 1828)), ปลาอมไข่ตาแดง (*S. nematoptera* (Bleeker, 1856)) และปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni* Kaumans, 1933) โดยการเตรียมโครโมโซมจากอวัยวะส่วนไตของตัวอย่างปลาชนิดละ 20 ตัว (เพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว) นำโครโมโซมที่เตรียมได้ไปย้อมสีด้วยเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาแบบนอร์และเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน เพื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน ชนิด ขนาด และโครโมโซมเครื่องหมาย

ผลการศึกษาพบว่าจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ในปลาทั้ง 4 ชนิด เท่ากัน คือ 46 แท่ง และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 54, 68, 74 และ 92 ตามลำดับ ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ไม่สามารถระบุโครโมโซมเพศในปลาทั้ง 4 ชนิดได้ โครโมโซมเครื่องหมายพบโครโมโซมที่มีนอร์ชนิดละ 1 คู่ ตำแหน่งของนอร์อยู่บริเวณใกล้เทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 2, 7, 10 และ 13 ในปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาฟ้า ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาว ตามลำดับ ผลจากการศึกษาด้วยเทคนิคฟิช โดยใช้โพรบเทโลเมียร์พบว่าสัญญาณปรากฏตรงตำแหน่งของเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกแท่ง และไม่พบตรงตำแหน่งอื่นของโครโมโซมในปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด สำหรับโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S พบสัญญาณปรากฏจำนวน 2 แท่ง ตรงกับโครโมโซมที่มีนอร์ในปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด สามารถจัดสูตรแคริโอไทป์ ได้ดังนี้

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

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

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

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

54810253: MAJOR: AQUATIC SCIENCE; Ph.D. (AQUATIC SCIENCE)
KEYWORDS: CYTOGENETICS/ MOLECULAR CYTOGENETICS/ APOGONIDAE

WANNAPA KASIROEK: CYTOGENETICS AND MOLECULAR CYTOGENETICS OF 4 SPECIES OF CARDINAL FISHES (FAMILY APOGONIDAE). ADVISORY COMMITTEE: CHANTRA INDANANDA, Ph.D., ALONGKLOD TANOMTONG, Ph.D., KRIT PINTHONG, Ph.D. 225 P. 2016.

The purpose of this research was to study cytogenetics by conventional staining and NOR banding techniques and molecular cytogenetics by FISH technique using telomeric and 18S rDNA probes by analyzing four fish species in the family Apogonidae. Ten males and ten females of each species such as Humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis* (Valenciennes, 1832)), Orbiculate cardinalfish (*Sphaeramia orbicularis* (Cuvier, 1828)), Pajama cardinalfish (*S. nematoptera* (Bleeker, 1856)) and Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni* Kaumans, 1933) were taken the kidney cells for preparing the chromosomes. Conventional, Ag-NOR and FISH staining techniques were applied to stain the chromosomes for examining the diploid number, fundamental number, type, size and the marker chromosome.

The results showed that the diploid chromosome number of *F. lateralis, S. orbicularis*, *S. nematotera* and *P. kauderni* was 2*n*=46 and the fundamental numbers (NF) or chromosome arm was 54, 68, 74 and 92, respectively. There was not different in males and females. Sex chromosomes could not be identified. The marker chromosome was NOR-bearing chromosomes, which found one chromosome pair in all species. NOR locations were on region adjacent to the telomeres of the chromosome pairs of 2, 7, 10 and 13 in *F. lateralis, S. orbicularis*, *S. nematotera* and *P. kauderni*, respectively. FISH with telomeric probe showed hybridization signals on each telomere of all chromosomes and interstitial telomeric sites were not detected. For the 18S RDNA probe mapping, the 18S RDNA was terminally located on the short arm adjacent to the telomere of the single pair at the same positions as found in NOR-bearing technique. The karyotypic formulae for four species studied were as follows:

F. lateralis (Valenciennes, 1832): 2*n* (diploid) 46 = $L^{a}_{8} + L^{t}_{12} + M^{t}_{24} + S^{t}_{2}$

S. orbicularis (Cuvier, 1828): 2*n* (diploid) 46 = $L^{sm}_{8} + L^{a}_{12} + L^{t}_{12} + M^{a}_{2} + M^{t}_{10} + S^{t}_{2}$

S. nematoptera (Bleeker, 1856): 2*n* (diploid) 46 = $L^{sm}_{10} + L^{a}_{10} + L^{t}_{4} + M^{sm}_{4} + M^{a}_{4} + M^{t}_{12} + S^{t}_{2}$

P. kauderni Kaumans, 1933: 2*n* (diploid) 46 = $L^{a}_{6} + M^{m}_{4} + M^{sm}_{14} + M^{a}_{22}$

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

สถานที่ทำการวิจัย..... 4

สัญลักษณ์และคำย่อ..... 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

ชีววิทยาของปลาอมไข่..... 5

ลักษณะทั่วไปของวงศ์ปลาอมไข่..... 5

อุปนิสัยของปลาอมไข่..... 6

พฤติกรรมการสืบพันธุ์..... 6

พันธุศาสตร์เซลล์ของปลา..... 7

โครงสร้างของโครโมโซม..... 7

รูปร่างและชนิดของโครโมโซม..... 10

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์..... 12

การย้อมสีโครโมโซม..... 12

การกำหนดเพศในปลา..... 13

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ในวงศ์ปลาอมไข่..... 15

พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล..... 18

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	การแยกสกัดและการสร้างโพรบ	20
	การติดฉลากโพรบ	20
	การเตรียมตัวอย่างโครโมโซม	22
	การไฮโดรไลซ์โพรบกับตัวอย่างโครโมโซมหรือดีเอ็นเอเป้าหมาย	22
	การตรวจสอบและการวิเคราะห์ผล	23
	การประยุกต์ใช้เทคนิค FISH กับปลา	23
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	25
	การเก็บตัวอย่าง	25
	การศึกษาลักษณะภายนอกตามสัณฐานวิทยาเพื่อระบุชนิดตัวอย่างปลาอมไข่	25
	การศึกษาด้านพันธุศาสตร์เซลล์	25
	การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล	30
4	ผลการวิจัย	34
	ลักษณะของปลาอมไข่ที่ศึกษา	34
	จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (diploid number, 2n) และโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number, NF) ของปลาอมไข่	37
	ชนิดและขนาดของโครโมโซมของปลาอมไข่	37
	โครโมโซมเครื่องหมายของปลาอมไข่	43
	แคริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานของปลาอมไข่	48
	พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาอมไข่	65
5	สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	70
	สรุปผลการวิจัย	70
	อภิปรายผลการวิจัย	71
	ข้อเสนอแนะ	71
บรรณานุกรม		82
ภาคผนวก		89
	ภาคผนวก ก	90

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

ภาคผนวก ข..... 93

ภาคผนวก ค..... 189

ประวัติย่อของผู้วิจัย..... 225

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 ความแตกต่างของการเรียกชื่อชนิดของโครโมโซมของปลา..... 11

2-2 รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของวงศ์ปลาอมไข่..... 16

3-1 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อสร้างโพรบ..... 31

4-1 ข้อมูลพันธุศาสตร์เซลล์ปลาอมไข่ 4 ชนิด..... 38

4-2 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (total length; LT), ค่าความยาวสัมพัทธ์ (relative length; RL), ค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (centromeric index; CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (CI+SD), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความยาวสัมพัทธ์ (RL+SD), ชนิด และขนาดของโครโมโซมแต่ละคู่ของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) เพศผู้และเพศเมีย..... 39

4-3 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมต่ละคู่ (total length; LT), ค่าความยาวสัมพัทธ์ (relative length; RL), ค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (centromeric index; CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (CI+SD), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความยาวสัมพัทธ์ (RL+SD), ชนิด และขนาดของโครโมโซมแต่ละคู่ของปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) เพศผู้และเพศเมีย... 40

4-4 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (total length; LT), ค่าความยาวสัมพัทธ์ (relative length; RL), ค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (centromeric index; CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (CI+SD), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความยาวสัมพัทธ์ (RL+SD), ชนิด และขนาดของโครโมโซมแต่ละคู่ของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematotera*) เพศผู้และเพศเมีย..... 41

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4-5 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (total length; LT), ค่าความยาวสัมพัทธ์ (relative length; RL), ค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (centromeric index; CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (CI+SD), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความยาวสัมพัทธ์ (RL+SD), ชนิด และขนาดของโครโมโซมแต่ละคู่ของปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) เพศผู้และเพศเมีย... 42

5-1 ลักษณะภายนอกที่พบในวงศ์ปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด..... 70

5-2 ผลเปรียบเทียบการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาอมไข่ 4 ชนิด..... 73

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 ลักษณะทั่วไปของวงศ์ปลาอมไข่ (family Apogonidae)..... 6

2-2 โครงสร้างของโครโมโซม..... 9

2-3 ชนิดของโครโมโซม..... 11

2-4 หลักการพื้นฐานของเทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH)..... 19

4-1 ลักษณะปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*)..... 34

4-2 ลักษณะปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*)..... 35

4-3 ลักษณะปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematotera*)..... 36

4-4 ลักษณะปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*)..... 36

4-5 โครโมโซมเครื่องหมายของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*)
จากการย้อมแถบสีแบบนอร์..... 44

4-6 โครโมโซมเครื่องหมายของปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*)
จากการย้อมแถบสีแบบนอร์..... 45

4-7 โครโมโซมเครื่องหมายของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematotera*)
จากการย้อมแถบสีแบบนอร์..... 46

4-8 โครโมโซมเครื่องหมายของปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*)
จากการย้อมแถบสีแบบนอร์..... 47

4-9 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*)
เพศผู้ (A.) และเพศเมีย (B.) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ($2n$=46)
ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 49

4-10 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*)
เพศผู้ (A.) และเพศเมีย (B.) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ($2n$=46)
ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique)..... 50

4-11 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ตาดำ
(*Fibramia lateralis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ($2n$=46)
ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-12 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*)มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique)..... 52

4-13 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) เพศผู้ (A) และเพศเมีย (B) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 53

4-14 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) เพศผู้ (A) และเพศเมีย (B) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique)..... 54

4-15 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 55

4-16 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique)..... 56

4-17 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematotera*) เพศผู้ (A) และเพศเมีย (B) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 57

4-18 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematotera*) เพศผู้ (A) และเพศเมีย (B) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique)..... 58

4-19 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematotera*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 59

4-20 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematotera*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique)..... 60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-21 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) เพศผู้ (A) และเพศเมีย (B) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 61

4-22 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) เพศผู้ (A) และเพศเมีย (B) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์..... 62

4-23 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 63

4-24 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique)..... 64

4-25 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปี และโพรบ)..... 66

4-26 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematotera*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปี และโพรบ)..... 67

4-27 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ)..... 68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-28 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematotera*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ)..... 69

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลาอมไข่ (Cardinalfishes) จัดอยู่ในวงศ์ปลาอมไข่ (family Apogonidae) มีรายงานทั่วโลกพบ 38 สกุล และ 351 ชนิด ส่วนในประเทศไทยพบ 15 สกุล และ 32 ชนิด (Froese & Pauly, 2016) ปลาอมไข่เป็นปลาทะเลสวยงามชนิดหนึ่งที่มีผู้สนใจนำมาเลี้ยงเป็นปลาตู้ ด้วยปลาอมไข่มีขนาดเล็ก มีรูปทรงแปลกตา มีดวงตาใหญ่ ปากหนา มีความหลากหลายของสีสันและลวดลาย ว่ายน้ำรวมกันเป็นฝูง มีนิสัยไม่ก้าวร้าว สามารถเลี้ยงรวมกับปลาชนิดอื่นได้ มีความอดทน ที่สำคัญมีราคาไม่แพง (Fenner, 2014) ปลาอมไข่เป็นปลาทะเลสวยงามอีกชนิดหนึ่งซึ่งมีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งปัจจุบันกรมประมงได้นำปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) ซึ่งเป็นปลาสายพันธุ์จากต่างประเทศมาเพาะเลี้ยงได้สำเร็จ และสามารถส่งเสริมให้เป็นธุรกิจการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ได้ (สามารถ เดชสถิตย์ และพรจันทร์ ปิ่นสุวรรณ, 2552) ปลาอมไข่จัดอยู่ในปลาทะเลสวยงามที่สามารถส่งออกนอกราชอาณาจักรได้ โดยมีเงื่อนไขว่าได้จากการเพาะพันธุ์ การนำเข้า และการศึกษาวิจัย (กรมประมง, 2553)

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ในปลาพบว่าจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2*n*) มีความผันแปรของจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันในช่วงกว้างจาก 14 ถึง 140 แท่ง โดยส่วนใหญ่เป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกที่มีจำนวนโครโมโซม 2*n*=48 โดยมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 48 (fundamental number, NF=48) (Cipistano et al., 2008) จากการตรวจสอบเอกสารงานวิจัยที่ผ่านมามีรายงานทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์อมไข่พบว่าโครโมโซมดิพลอยด์ของวงศ์ปลาอมไข่นั้นมีลักษณะเฉพาะ โดยมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่ำ (2n= 34-46) เมื่อเทียบกับปลาในอันดับเดียวกัน (order Perciforms) โดยส่วนมากปลาในอันดับเพอซิฟอร์มประมาณร้อยละ 60 มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 2n=48 มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน NF=48 เช่นเดียวกับปลากระดูกแข็งทั่วไป (Galetti Jr., Aguilar, & Molina, 2000)

การศึกษาด้านพันธุศาสตร์ในปลาวงศอมไข่เป็นเรื่องที่น่าสนใจ เนื่องจากปลาวงศ์อมไข่มีความหลากหลายทางด้านรูปแบบของแคริโอไทป์ (karyotype) เมื่อเทียบกับปลาในอันดับเดียวกันที่อาศัยอยู่ร่วมกันอยู่ในระบบนิเวศเดียวกัน ปลาอมไข่จึงเหมาะสมที่จะเป็นตัวแทนของปลาในอันดับเพอซิฟอร์มในการศึกษารูปแบบการวิวัฒนาการของโครโมโซม (Araújo, Martínez, & Molina,

2010). สำหรับในการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์อมไข่พบว่ามีเพียง 15 ชนิด จาก 6 สกุล คิดเป็นจำนวนน้อยกว่าร้อยละ 4.3 ของจำนวนปลาวงศ์อมไข่ทั้งหมดซึ่งมีประมาณ 351 ชนิด จาก 38 สกุลทั่วโลก รายงานทั้งหมดเป็นการศึกษาโดยการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา ยังไม่มีข้อมูลการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาวงศ์อมไข่ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญ และยิ่งไปกว่านั้นยังไม่มีรายงานการศึกษาในปลาวงศ์อมไข่จากประเทศไทยเลย ดังนั้นจึงควรดำเนินการศึกษาอย่างเร่งด่วน เพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญของปลาวงศ์อมไข่สำหรับการประยุกต์ใช้ต่อไป

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของวงศ์ปลาอมไข่ในครั้งนี้ เพื่อช่วยในการเพิ่มข้อมูลพื้นฐานทางพันธุศาสตร์เซลล์และพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล โดยศึกษาลักษณะของโครโมโซม และตรวจสอบเครื่องหมายโครโมโซม (chromosome marker) ที่เป็นลักษณะเฉพาะของของปลาวงศ์อมไข่ โดยใช้เทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining) แถบสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding) และเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อิน ซิทู ไฮบริไดเซชัน (Fluorescencs *in situ* hybridization, FISH) โดยใช้โพรบเทโลเมียร์ และ โพรบไรโซมอลดีเอ็นเอยีน (18S rDNA) ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับในการวิจัยต่อไปได้ รวมทั้งยังช่วยในการบริหารจัดการทรัพยากรทางน้ำให้มีประสิทธิภาพ ประกอบไปด้วยการใช้ประโยชน์ การอนุรักษ์ และการฟื้นฟู ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะต้องใช้พื้นฐานความรู้ที่ถูกต้อง โดยเฉพาะพื้นฐานความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์ของสัตว์น้ำ สิ่งที่เห็นได้ชัดที่สุดคือการนำความหลากหลายทางด้านชนิดมาใช้ประโยชน์และความหลากหลายทางพันธุกรรมมาใช้วางแผนจัดการทรัพยากรที่ยั่งยืนและให้ได้ประโยชน์สูงสุด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา ของปลาวงศ์อมไข่ 4 ชนิด
2. เพื่อวิเคราะห์แคริโอไทป์ (karyotype) และอิดิโอแกรมมาตรฐาน (standardized idiogram) ของปลาวงศ์อมไข่ 4 ชนิด
3. เพื่อตรวจสอบเครื่องหมายโครโมโซม (chromosome marker) ที่เป็นลักษณะเฉพาะของของปลาวงศ์อมไข่ 4 ชนิด โดยใช้เทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining) แถบสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding) และเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อิน ซิทู ไฮบริไดเซชัน (Fluorescencs *in situ* hybridization, FISH) โดยใช้โพรบเทโลเมียร์ และ โพรบไรโซมอลดีเอ็นเอยีน (18S rDNA)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบข้อมูลด้านสัณฐานวิทยา ด้านพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ เทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อิน ซิทู ไฮบริไดเซชัน ของวงศ์ปลาอมไข่ในการช่วยระบุชนิด

2. ทราบจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน ชนิด และขนาดของโครโมโซมของปลาวงศ์อมไข่ ซึ่งข้อมูลเอกลักษณ์จำเพาะชนิดของวงศ์ปลาอมไข่

3. ทราบแคริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐาน ของวงศ์ปลาอมไข่ เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาขั้นสูง การศึกษาทางด้านวิวัฒนาการของปลาทะเล

4. ทราบเครื่องหมายทางพันธุกรรมของวงศ์ปลาอมไข่

5. ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานอ้างอิงในการทำงานวิจัยในลำดับต่อไปได้

ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างปลาวงศ์ปลาอมไข่เพศเมียและเพศผู้ อย่างละ 10 ตัว ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในประเทศไทย และร้านจำหน่ายปลาสวยงาม นำมาศึกษาโครโมโซม โดยใช้เทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา การย้อมแถบสีแบบนอร์ โดยศึกษาเปรียบเทียบจำนวน รูปร่าง และโครโมโซมเครื่องหมาย นำมาจัดคาริโอไทป์ สร้างอิดิโอแกรมมาตรฐาน ศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชั่น โดยใช้โพรบ (probe) ที่จำเพาะต่อตำแหน่งเทโลเมียร์ (telomere) และตำแหน่งยีนที่สร้างไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA gene; 18S rDNA) ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะชนิดของวงศ์ปลาอมไข่ 4 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis* (Valenciennes, 1832)), ปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni* Kaumans, 1933), ปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera* (Bleeker, 1856)), และปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis* (Cuvier, 1828))

สถานที่ดำเนินงานวิจัย

1. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

2. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

สัญลักษณ์และคำย่อ

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

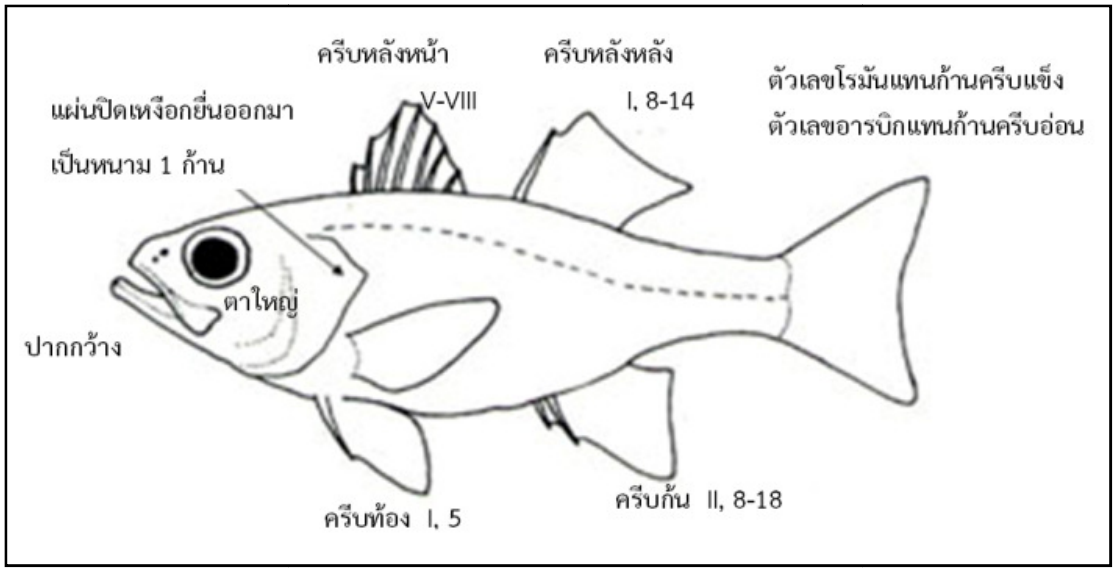
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชีววิทยาของปลาอมไข่

ปลาอมไข่เป็นปลาที่จัดอยู่ในชั้นแอคติโนเธอริจิอี (class Actinopterygii) ชั้นย่อย นีโอเธอริจิไอ (subclass Neopterygii) อันดับเพอซิฟอร์มส์ (order Perciforms) อันดับย่อย เพอคอยดีอี (suborder Percoidei) วงศ์ใหญ่เพอคอยเดีย (superfamily Percoidea) วงศ์อโพโกนิดี (family Apogonidae) มีทั้งหมด 38 สกุล แบ่งออกเป็น 3 วงศ์ย่อย คือ วงศ์ย่อยอโพโกนินี (Subfamily Apogoninae) มี 32 สกุล (genera) ได้แก่ *Apogon*, *Apogonichthys*, *Apogonichthyoides*, *Archamia*, *Astrapogon*, *Cercamia*, *Cheilodipterus*, *Fibramia*, *Foa*, *Fowleria*, *Glossamia*, *Jaydia*, *Lachneratus*, *Lepidamia, Neamia*, *Nectamia*, *Ostorhinchus*, *Paroncheilus*, *Phaeoptyx*, *Pristiapogon*, *Pristigon*, *Pterapogon*, *Quinta*, *Rhabdamia*, *Siphamia*, *Sphaeramia, Taeniamia, Verulux*, *Vincentia, Yarica*, *Zapogon* และ *Zoramia* วงศ์ย่อย อะมิออยดินี (Subfamily Amioidinae) มี 2 สกุล ได้แก่ Amiodes และ *Holapogon* และวงศ์ย่อยซูดามินี (Subfamily Psuedaminae) มี 4 สกุล ได้แก่ *Gymnapogon*, *Paxton*, *Pseudamia* และ *Pseudamiops* พบทั่วโลกทั้งหมด 351 ชนิด สำหรับในประเทศไทยพบ 15 สกุล 32 ชนิด (Froese & Pauly, 2016)

ลักษณะทั่วไปของวงศ์ปลาอมไข่

วงศ์ปลาอมไข่ส่วนใหญ่เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก อาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูง ในทะเลเขตร้อนและเขตอบอุ่น เป็นปลาที่มีลำตัวค่อนข้างยาว แบนข้าง มีเกล็ดขนาดใหญ่มีทั้งแบบเกล็ดขอบเรียบ (cycloid scales) และขอบหยัก (ctenoid scales) มีดวงตาใหญ่ มีปากค่อนข้างกว้าง เฉียงลง มีฟันซี่เล็กเรียวยาวไม่เท่ากันอยู่ติดกันเป็นแถว (villiform) แผ่นปิดเหงือกยื่นออกมาเป็นหนาม 1 ก้าน ครีบหลังแยกออกจากกันเป็น 2 ครีบชัดเจน โดยครีบหลังหน้ามีลักษณะเป็นก้านครีบแข็งประมาณ V-VIII ก้าน ส่วนครีบหลังหลังมีก้านครีบแข็ง I ก้าน และก้านครีบอ่อน 8-14 ก้าน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง II ก้าน ก้านครีบอ่อน 8-18 ก้าน ครีบท้องมีก้านครีบแข็ง I ก้าน และก้านครีบอ่อน 5 ก้าน (ภาพที่ 2-1) (Kimura, Shibukawa, Matsuura, Peristiwady, & Suharti, 2003, p. 61)



ภาพที่ 2-1 ลักษณะทั่วไปของวงศ์ปลาอมไข่ (family Apogonidae)
(ที่มา : ดัดแปลงจาก Kimura et al., 2003)

อุปนิสัยของปลาอมไข่

ปลาอมไข่มีนิสัยไม่ก้าวร้าว อยู่รวมกันเป็นฝูง อาศัยอยู่ตามแนวปะการัง ชอบหลบซ่อนตัวอยู่ตามหลืบกิ่งก้านของปะการัง ส่วนใหญ่เป็นพวกออกหากินเวลากลางคืน กินพวกแพลงตอนสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหน้าดิน และพวกปลาตัวเล็ก ๆ (Marnane & Bellwood, 2002)

พฤติกรรมการสืบพันธุ์

โดยปกติปลาอมไข่จะไม่สามารถแยกเพศออกได้ชัดเจนเมื่อดูจากลักษณะภายนอก แต่เมื่อถึงช่วงเวลาสืบพันธุ์ จะพบว่าปลาอมไข่เพศเมียมีท้องขยายใหญ่ขึ้นกว่าเดิม ส่วนปลาอมไข่เพศผู้ปากจะขยายกว้างขึ้น ปลาอมไข่เพศเมียจะมีพฤติกรรมเกี้ยวพาราสีเพศผู้ โดยจะว่ายเข้าหาปลาเพศผู้ เมื่อปลาอมไข่เพศผู้ยอมรับก็จะแสดงอาการเกี้ยวพาราสีตอบกลับเช่นเดียวกัน จากนั้นทั้งคู่ก็แยกตัวออกจากกลุ่มไปอยู่เป็นคู่ เพศเมียจะเริ่มทำการผสมพันธุ์ครั้งแรกโดยการเคลื่อนไหวแบบกระตุกถี่ ๆ และสั้น ๆ เข้าใกล้เพศผู้ พร้อมกับทำตัวบิดงอว่ายน้ำเสียดสีเพศผู้และดุนตัวเพศผู้แบบถี่ ๆ ก่อนที่จะวางไข่ ส่วนเพศผู้ก็จะเอาปากชนตรงบริเวณช่องเปิดใต้ท้องของปลาเพศเมียซ้ำ ๆ กันตลอดเวลา ปากของปลาเพศผู้จะเปิดกว้างและเคลื่อนที่เข้าไปใกล้เพศเมีย ปลาอมไข่เพศเมียก็จะปล่อยไข่ออกมาเป็นกลุ่มซึ่งยังคงติดอยู่ที่บริเวณช่องเปิดของปลาเพศเมีย ส่วนปลาเพศผู้ก็จะปล่อยน้ำเชื้อมาผสมพันธุ์กับไข่ที่ติดอยู่กับเพศเมีย จากนั้นปลาเพศผู้ก็จะเอาปากเขมือบไข่ทั้งกลุ่มจากปลาเพศเมีย

มาไว้ในปาก ในขณะที่ปลาเพศเมียจะว่ายวนเวียนแสดงอาการปกป้องไข่อยู่ชั่วระยะหนึ่ง จากนั้นประมาณ 2-3 ชั่วโมง ปลาอมไข่ทั้งคู่ต่างก็แยกย้ายจากกันไป หลังจากนั้นภายใน 2-3 สัปดาห์ ปลาอมไข่เพศเมียก็จะหาคู่ใหม่เพื่อทำการสืบพันธุ์ต่อไป ส่วนปลาอมไข่เพศผู้ก็จะทำการฟักไข่ที่อยู่ในปากโดยใช้เวลาประมาณ 4-5 วัน โดยไข่ที่ถูกผสมพันธุ์ใหม่ ๆ จะมีสีชมพู เมื่อถึงเวลาที่จะฟักจะเห็นว่าในปากปลาเพศผู้จะเต็มไปด้วยสีดำประมาณ 2-3 ชั่วโมง ไข่จะถูกฟักออกมาเป็นตัวปล่อยสู่ผิวน้ำ ในระหว่างที่ฟักไข่ปลาเพศผู้จะไม่กินอาหารเลย แต่หลังจากที่ปล่อยตัวอ่อนออกมาแล้ว ปลาเพศผู้จะกินอาหารอย่างตะกละ หลังจากนั้นภายใน 10-17 วัน ปลาอมไข่เพศผู้ก็สามารถพร้อมที่จะหาคู่ใหม่ต่อไป (Saravanan et al., 2013)

พันธุศาสตร์เซลล์ของปลา

พันธุศาสตร์เซลล์เป็นสาขาที่ศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซม และบทบาทการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม โครโมโซมเป็นโครงสร้างที่สำคัญในการถ่ายทอดและแสดงออกของข้อมูลพันธุกรรม การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมย่อมมีผลโดยตรงต่อการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ทำให้เกิดการแสดงออกในสิ่งมีชีวิตในรูปแบบที่จำเพาะตัวและแตกต่างกัน มีผลต่อการเจริญพัฒนาและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (อมรา คัมภิรานนท์, 2546) การศึกษารายละเอียดของโครโมโซมทั้งจำนวน รูปร่าง และขนาด แล้วนำมาจัดเรียงเป็นคู่ ๆ จากขนาดใหญ่ไปขนาดเล็ก เรียกว่าการศึกษาแคริโอไทป์ โดยปกติจะนิยมศึกษาโครโมโซมในระยะเมทาเฟส (metaphase) เพราะเป็นระยะที่โครโมโซมมีการหดตัวสั้นมากที่สุด (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2543)

โครงสร้างของโครโมโซม

ส่วนประกอบโครงสร้างของโครโมโซมจำแนกได้ ดังนี้ (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

1. เซนโทรเมียร์ เป็นตำแหน่งที่แขนทั้ง 2 ข้างของโครโมโซมมาพบกัน เป็นองค์ประกอบของโครมาทินชนิดที่เรียกว่า constitutive heterochromatin ตรงบริเวณรอยคอดที่หนึ่ง (primary constriction) ของโครโมโซมเมทาเฟส ทำหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของโครโมโซมในการแบ่งเซลล์ คือ เป็นบริเวณที่ถูกจับโดยไมโครทูบูล (microtubule) ของเส้นใยสปินเดิลขณะที่มีการแบ่งเซลล์ เป็นตำแหน่งสุดท้ายของการสิ้นสุดการจำลองดีเอ็นเอ และยังเป็นตำแหน่งสุดท้ายของการแยกกันของซิสเตอร์โครมาทิด (sister chromatid) เมื่อมีการแบ่งเซลล์ในระยะแอนาเฟส (anaphase) ทุกโครโมโซมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีดีเอ็นเอชนิด repetitive sequence คือ มีจำนวนชุดซ้ำ ๆ กันมาก หรือเรียกว่า satellite DNA อยู่บริเวณเซนโทรเมียร์ ตำแหน่งเซนโทรเมียร์

ยังเป็นตำแหน่งสำคัญที่ให้โปรตีนชนิดพิเศษมาจับ โปรตีนนี้ คือ ไคนีโทคอร์ (kinetochore) สามารถตรวจสอบบริเวณเซนโทรเมียร์ได้โดยการย้อมแถบสีแบบซี (C-banding)

2. รอยคอดที่หนึ่งของโครโมโซม เป็นบริเวณเดียวกันกับเซนโทรเมียร์

3. รอยคอดที่สองของโครโมโซม (secondary constriction) หรือแซทเทิลไลท์โครโมโซม (satellite chromosome) เป็นบริเวณอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับเซนโทรเมียร์ เป็นตำแหน่งที่มีเบสซ้ำ ๆ กัน จะเห็นได้ชัดในระยะแพไคทีน (pachytene) แต่อาจมียีนอาร์อาร์เอ็นเอ (rRNA gene) ได้หลายชุดบนแขนข้างหนึ่งหรือทั้งสองแขน พบการสร้างนิวคลีโอไล (nucleoli) นอกจากนี้ในพืชบางชนิดยังพบโครโมโซมที่มีแซทเทิลไลท์ขนาดต่าง ๆ กัน เรียกว่า SAT-chromosome ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับหรือเล็กกว่าโครโมโซม โดยเส้นใยฟิลาเมนต์ที่เชื่อมแซทเทิลไลท์กับโครโมโซมนั้นอาจสั้นหรือยาวก็ได้ แต่ทั้งแซทเทิลไลท์และฟิลาเมนต์จะมีรูปแบบและขนาดคงที่ในแต่ละโครโมโซม ตำแหน่งรอยคอดที่สองของโครโมโซม หรือเรียกว่า nucleolar organizing region (NORs) เป็นบริเวณที่ประกอบด้วยยีนที่ควบคุมการสร้างไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) ชนิด 18S และ 28S ซึ่งมีความสัมพันธ์กับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Howell, 1977; Howell & Black, 1980) เป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญในการศึกษาบางอย่าง เช่น วิวัฒนาการและเซลล์อนุกรมวิธาน (Galetti, 1998) ตำแหน่ง NORs สามารถใช้เป็นเครื่องหมายได้เป็นอย่างดีเนื่องจากพบได้เฉพาะในสิ่งมีชีวิตบางชนิดเท่านั้น

4. โครมาทิด ในระยะการแบ่งเซลล์โครโมโซมประกอบด้วยโครมาทิด 2 แท่ง แต่ละแท่งยังติดกันตรงตำแหน่งเซนโทรเมียร์ โครมาทิดเกิดการจำลองโครโมโซมในระยะ S ของอินเตอร์เฟส

5. เทโลเมียร์ เป็นองค์ประกอบที่พบในทุก ๆ โครโมโซมของยูคาริโอต (eukaryote) อยู่บริเวณปลายแขนของโครโมโซม มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กัน (basic repeat unit) ขนาดสั้น ๆ 6-11 เบส ลักษณะการซ้ำเป็นแบบ tandem repeat เป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละสิ่งมีชีวิต ถ้าบริเวณนี้ขาดไปจะทำให้โครโมโซมมีลักษณะเหนียวและง่ายต่อการเชื่อมต่อกับโครโมโซมอื่น ๆ ที่มีปลายเทโลเมียร์ขาดออกเช่นกัน โครโมโซมของยูคาริโอตมีเทโลเมียร์ไว้เพื่อทำหน้าที่ 3 ประการ คือ

5.1 ป้องกันการเชื่อมต่อกันระหว่างปลายแท่งโครโมโซมในระหว่างแท่งโครโมโซม

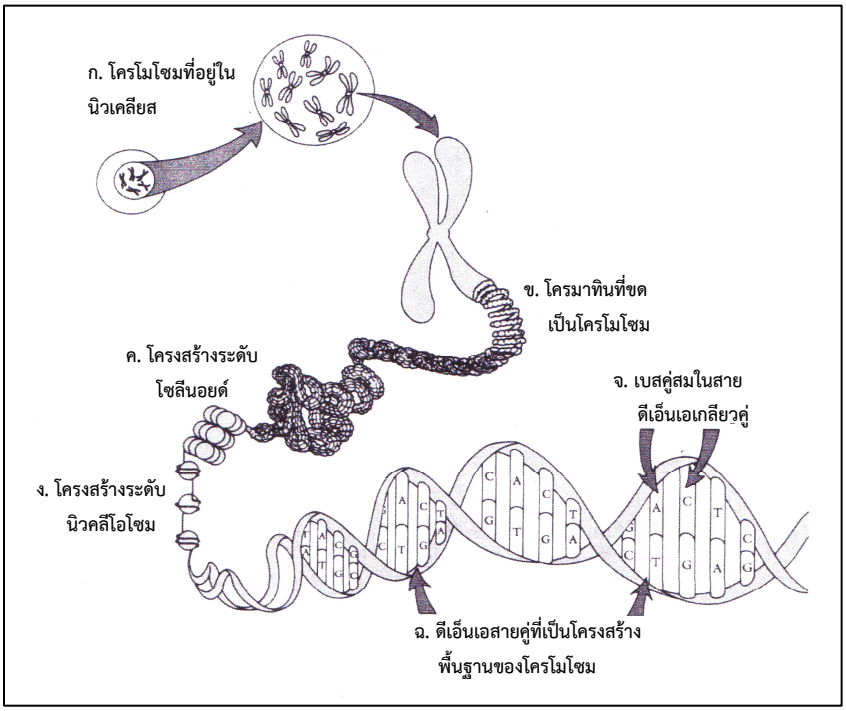
5.2 ป้องกันการถูกย่อยปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (deoxyribonuclease)

5.3 ลำดับเบสของหน่วยซ้ำ (telomeric sequence) ช่วยทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ปลายสุดของโครโมโซม (ซึ่งเป็นปลายสุดของเส้นคู่ดีเอ็นเอ) โดยทั้งนี้ต้องได้รับการ

ทำงานร่วมกันของเอนไซม์เทโลเมอเรส (telomerase) ช่วยป้องกันการสั้นลงของโครโมโซมแต่ละครั้งของการแบ่งเซลล์

ในเซลล์ปกติของร่างกายจะมีโครโมโซม 2 ชุด เรียกสภาพที่มีโครโมโซม 2 ชุดนี้ว่า ดิพลอยด์ (diploid, 2n) แต่ในเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) มีจำนวนโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของเซลล์ร่างกาย เรียกสภาพโครโมโซมนี้ว่าแฮพลอยด์ (haploid, n) ในสัตว์ต่างชนิดกันจะมีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกัน แต่สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นโครโมโซมที่ไม่เกี่ยวข้องกับเพศ (autosome) และอีกกลุ่มหนึ่งเป็นโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับเพศ (sex chromosome) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพศผู้จะมีโครโมโซมเพศเป็น XY ในเพศเมียจะมีโครโมโซมเพศเป็น XX โครโมโซมเอ็กซ์ (X) มักจะมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมวาย (Y)

โครงสร้างโดยทั่วไปของโครโมโซมปลาจะเริ่มต้นจากสายดีเอ็นเอ (DNA) สายคู่พันรอบก้อนโปรตีนฮีสโตน (histone) แปดก้อนที่เกาะติดกันเป็นนิวคลีโอโซม (nucleosome) จากนั้นนิวคลีโอโซมพันกันเป็นโครงสร้างโซลีนอยด์ แล้วพันกันอีกครั้งเป็นสายโครมาตินที่ขดกันแน่นจนกลายเป็นโครโมโซมที่อยู่ในนิวเคลียส (ภาพที่ 2-2) (อลงกลด แทนออมทอง, 2554)



ภาพที่ 2-2 โครงสร้างของโครโมโซม (ที่มา : ดัดแปลงจาก อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

รูปร่างและชนิดของโครโมโซม

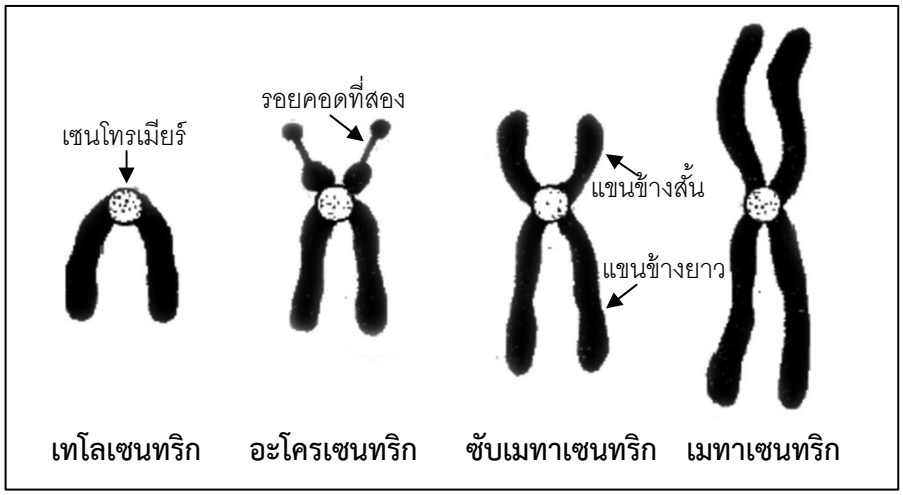
เนื่องจากรูปร่างของโครโมโซมจะเปลี่ยนแปลงไปตามระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์ แต่ในระยะเมทาเฟส เป็นระยะที่โครโมโซมหดสั้นที่สุด มีขนาดใหญ่สุด จึงสามารถมองเห็นชัดเจนที่สุด ดังนั้นรูปร่างของโครโมโซมโดยทั่วไปหมายถึง รูปร่างในระยะเมทาเฟส เรียกว่า metaphase chromosome ประกอบด้วยโครมาทิด (chromatid) 2 เส้นติดกันที่ตำแหน่งที่เรียกว่า เซนโทรเมียร์ ตำแหน่งของเซนโทรเมียร์บนโครโมโซมแต่ละแท่ง จะมีความจำเพาะและคงที่เสมอ ส่วนของโครโมโซมที่ยื่นออกมาจากเซนโทรเมียร์ เรียกว่าแขน (arm) ประกอบด้วยแขนข้างสั้น (short arm; p) และแขนข้างยาว (long arm; q) ชนิดของโครโมโซมที่พบในสิ่งมีชีวิต แบ่งได้ 4 ชนิด โดยอาศัยตำแหน่งของเซนโทรเมียร์เป็นหลัก (ภาพที่ 2-3) หรืออาจใช้วิธีคำนวณค่าสัดส่วนระหว่างความยาวของแขนยาวหารด้วยความยาวของโครโมโซมทั้งแท่ง เรียกว่า ค่าดัชนีเซนโทรเมียร์ (centromere index, CI) ดังนี้ (อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

1. โครโมโซมแบบเมทาเซนทริก (metacentric chromosome) เป็นโครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ตรงกลางแท่ง ทำให้แขนสั้น และแขนยาว มีขนาดเท่ากัน หรือใกล้เคียงกัน มีค่า CI เท่ากับ 0.50-0.59

2. โครโมโซมแบบซับเมทาเซนทริก (submetacentric chromosome) เป็นโครโมโซมที่มีตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ อยู่ค่อนไปทางปลายด้านใดด้านหนึ่ง ทำให้แขนยาวมีความยาวกว่าแขนสั้นอย่างเห็นได้ชัด มีค่า CI เท่ากับ 0.60-0.69

3. โครโมโซมแบบอะโครเซนทริก (acrocentric chromosome) เป็นโครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่ค่อนไปทางปลายด้านใดด้านหนึ่งมาก จนเกือบอยู่ปลายสุดของแท่งโครโมโซม โครโมโซมที่มีรูปร่างแบบนี้ บางทีอาจจะพบโครงสร้างพิเศษคล้ายกระเปาะ (satellite) ติดอยู่ที่ปลายสุดของโครโมโซมในส่วนแขนสั้น การที่ส่วนปลายแขนสั้นมีลักษณะเป็นกระเปาะนี้ บางทีจึงเรียกโครโมโซมแบบนี้ว่าแซทเทิลไลท์ โครโมโซม (satellite chromosome) หรือโครโมโซมรูปร่างแบบนี้อาจเรียกว่า ซับเทโลเซนทริก โครโมโซม (subtelocentric chromosome) มีค่า CI เท่ากับ 0.70-0.89

4. โครโมโซมแบบเทโลเซนทริก (telocentric chromosome) เป็นโครโมโซมที่มีตำแหน่ง เซนโทรเมียร์ อยู่ปลายสุดของแท่งโครโมโซม จึงไม่มีการแยกเป็นแขนสั้นและแขนยาว หรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นโครโมโซมแขนเดียว มีค่า CI เท่ากับ 0.90-1.00



ภาพที่ 2-3 ชนิดของโครโมโซม (ที่มา : ดัดแปลงจาก อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

อย่างไรก็ตาม การกำหนดชนิดของโครโมโซมมีความแตกต่างกันในการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลา ดังตารางที่ 2-1 (อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

ตารางที่ 2-1 ความแตกต่างของการเรียกชื่อชนิดของโครโมโซมของปลา

เอกสารอ้างอิง	**ชนิดของโครโมโซม**			
Turpin and Lejeune (1965)	m	sm	a	t
Levan et al. (1964)	m	sm	st	t
Strickberger (1968)	m		a	t
Chen (1974)	m	sm	a	
อุทัยรัตน์ ณ นคร (2543)	m	sm	st	a

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์เป็นการศึกษาโครโมโซมเพื่อตรวจจำนวน และรูปร่างของโครโมโซม ซึ่งมีหลายวิธี แต่ละวิธีจะเลือกศึกษาเซลล์ระยะเมทาเฟส เพราะเป็นระยะที่มีโครโมโซมหดสั้นมากที่สุดเห็นลักษณะได้ชัดเจน เพื่อที่จะเก็บเกี่ยวเซลล์ในระยะเมทาเฟส ได้นำสารโคลชิซิน (colchicine) ซึ่งเป็นสารสกัดจากพืชสกุล *Colchicum* มาใช้เพื่อยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิล ทำให้เซลล์ที่มีการแบ่งตัวไม่สามารถเข้าสู่ระยะแอนาเฟส (anaphase) ได้ วิธีการ

เตรียมโครโมโซมแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีโดยตรง (direct chromosome preparation) เป็นวิธีที่เลือกเอาเซลล์ในร่างกายที่กำลังมีการแบ่งตัวมาศึกษาโครโมโซม เป็นเซลล์ที่ยังอ่อนและยังมีการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลา เช่น เซลล์เม็ดเลือดจากไขกระดูก (bone marrow) อีกวิธี คือ วิธีโดยอ้อม (indirect chromosome preparation) จะเลือกเซลล์ในร่างกายชนิดที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย (in vitro) ให้เซลล์มีการแบ่งตัว หรือใช้สารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

การย้อมสีโครโมโซม

การย้อมสีโครโมโซมมีด้วยกันหลายแบบขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่ต้องการศึกษา (Halnan, 1989) ดังนี้

1. การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา จะใช้สีย้อมที่ติดกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) โดยสีที่นิยมใช้ได้แก่ ออร์ซีน (orcein) คาร์มีน (carmine) และจิมซ่า (Giemsa's) ภาพโครโมโซมจะติดสีตลอดแท่งสามารถบอกจำนวน และชนิดของโครโมโซมประจำสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ได้ และอาจบอกลักษณะบางอย่างของโครโมโซม เช่น รอยคอดที่หนึ่ง รอยคอดที่สอง และแซทเทลไลท์

2. การย้อมแถบสีแบบจี (G- banding) เป็นเทคนิคที่นิยมทำกันมากที่สุด เพราะเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย และวัสดุที่ใช้ย้อมไม่สิ้นเปลือง เทคนิคนี้เหนี่ยวนำให้เกิดแถบโดยใช้สารเคมีที่สามารถย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของโครโมโซม สารเคมีที่นิยมใช้ คือ เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) แล้วจึงย้อมด้วยสีจิมซ่าตามปกติ จะทำให้เกิดแถบสีเข้มสลับกับจางเนื่องจากคุณสมบัติที่ต่างกันในแต่ละบริเวณบนแท่งโครโมโซม

3. การย้อมแถบสีแบบคิว (Q-banding) วิธีนี้ย้อมโครโมโซมให้เกิดแถบมืด และสว่างเป็นช่วง ๆ ตลอดความยาวแท่งโครโมโซมได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ โดยใช้สีย้อมชนิด Quinacrine mustard ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างของโครโมโซมทุกแท่งได้

4. การย้อมแถบสีแบบซี เป็นเทคนิคที่ทำให้แถบสีเข้มบริเวณ constitutive heterochromatin เป็นบริเวณที่โครโมโซมขดตัวกันแน่น มีคุณสมบัติเป็น highly repetitive DNA sequence ซึ่งได้แก่ บริเวณเซนโทรเมียร์ของเกือบทุก ๆ โครโมโซม นอกจากนี้ยังพบที่บริเวณเทโลเมียร์ ของโครโมโซมบางแท่งอีกด้วย

5. การย้อมแถบสีแบบอาร์ (R-banding) เป็นเทคนิคที่เกิดแถบสีเข้ม และจางสลับกันเช่นเดียวกับแถบสีแบบคิว และแถบสีแบบจี แต่แถบสีที่เกิดขึ้นจะตรงข้ามกับแถบสีแบบคิว และแถบสีแบบจี คือ แถบที่ติดสีเข้มในแถบสีแบบคิว และแถบสีแบบจีจะติดสีจางแทนในแถบสีแบบอาร์

6. การย้อมแถบสีแบบนอร์ เป็นเทคนิคที่ทำให้ส่วน nucleolar organizer regions (NORs) ติดสีเข้ม โดยการใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) ซึ่งจะเลือกติดบริเวณนี้เท่านั้น ในสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนนี้มียีนสำหรับสังเคราะห์ ribosomal RNA ชนิด 18S และ 28S อยู่ NORs นี้ โครโมโซมที่มีรอยคอดที่สองนี้เรียกว่าแซทเทลไลท์โครโมโซม ซึ่งใช้เป็นโครโมโซมเครื่องหมายได้ (Howell & Black, 1980)

การกำหนดเพศในปลา (Jesus et al.,1999; Born & Bertollo, 2000; Artoni et al., 2001)

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

การกำหนดเพศในปลาเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่ซับซ้อนเพื่อนำไปสู่การการกำหนดเซลล์เพศ แล้วเกิดการเปลี่ยนสภาพรูปร่างของเซลล์ จากการศึกษาพบว่ายีนบางยีนอาจมีผลโดยตรงต่อการพัฒนาของรังไข่ และบางยีนมีผลต่อการพัฒนาของอัณฑะ เช่น ในกรณีของปลา Medaka (*Oryzias latipes*)พ ว่ายีน *DMY* เป็นยีนที่กำหนดเพศ และมีผลต่อการพัฒนาของอัณฑะ ส่วนในปลานิล (tilapia) ชนิด *Oreochromis niloticus* พบว่ามีทั้งยีนและปัจจัยภายในร่างกาย ที่จะมีผลต่อการกำหนดเพศและการพัฒนาของโกแนด โดยฮอร์โมนเอสโทรเจน (estrogen) ภายในร่างกายเป็นตัวเหนี่ยวนำตามธรรมชาติ สำหรับการพัฒนาการของรังไข่ ขณะที่ยีน *DMRT1* จะมีความสำคัญต่อการพัฒนาการของอัณฑะ ในปลาส่วนใหญ่แล้วการกำหนดเพศจะถูกควบคุมโดยพันธุกรรม ดังนี้

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

แบบที่มีโครโมโซมเพศ แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ

1. Homomorphic sex chromosome โครโมโซมเพศมีลักษณะไม่แตกต่างกับโครโมโซมร่างกาย และไม่แตกต่างระหว่างโครโมโซมที่กำหนดเพศผู้และเพศเมีย ปลาเหล่านี้

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

เพศผู้ XX (แปลงเพศ) x เพศเมีย XX ⟶100% เพศเมีย (XX)

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

จากแผนการผสมพันธุ์ ในกรณีได้ลูกเพศเมียทั้งหมดแสดงว่าการควบคุมเพศเป็นระบบ XY และในกรณีได้ลูกทั้ง 2 เพศ แสดงว่าการควบคุมเพศเป็นระบบ ZW

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

2.1 แบบเฮเทอโรแกมีติกเมล ปลาเพศผู้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ 2 แบบ เพศเมียสร้างได้แบบเดียวดังนี้

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

ระบบ XX/XO เป็นระบบการกำหนดเพศที่คล้ายกับระบบแรก แตกต่างตรงที่โครโมโซม Y สูญหายไป และเพศผู้มีโครโมโซมน้อยกว่าเพศเมีย 1 แท่ง เช่น ปลา Mediterranean rainbow wrasse (*Coris julis*)

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

ระบบ XX/XY_1Y_2 เป็นระบบโครโมโซมเพศมีหลายแท่ง โดยที่โครโมโซม X ชนิดอะโครเซนทริก หรือเทโลเซนทริก ได้ไปเชื่อมรวมกับโครโมโซมร่างกาย ทำให้ปลาเพศผู้และปลาเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่างกัน เช่น ปลา wolf fish(*Hopliasmalabaricus*)

2.2 แบบเฮเทอโรแกมีติกฟีเมล ปลาเมียเพศสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ 2 แบบ ปลาเพศผู้สร้างได้แบบเดียว

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

ระบบ ZZ/ZO เป็นระบบการกำหนดเพศที่คล้ายกับระบบแรก มีความแตกต่างกันตรงที่โครโมโซม W สูญหายไป และเพศเมียมีโครโมโซมน้อยกว่าเพศผู้ 1 แท่ง ระบบนี้มีรายงานค่อนข้างน้อย เช่น ปลา *Lepidocephalichthys guntea*

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

ระบบ ZZ/ZW_1W_2 เป็นระบบที่มีโครโมโซมเพศหลายแท่ง โดยโครโมโซม Z ได้ไปเชื่อมรวมกับโครโมโซมร่างกาย ส่งผลให้ปลาเพศผู้และปลาเพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่างกัน ลักษณะจะตรงข้ามกับระบบ XX/XY_1Y_2 เช่น ปลา *Apareiodon affinis*

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ในวงศ์ปลาอมไข่

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ในปลาพบว่าจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) มีความผันแปรของจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันในช่วงกว้างจาก 14 ถึง 140 แท่ง โดยส่วนใหญ่เป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกที่มีจำนวนโครโมโซม $2n$=48 โดยมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน

เท่ากับ 48 (fundamental number, NF=48) (Cipistano et al., 2008) ส่วนปลาทะเลในปัจจุบันมีประมาณ 13,000 ชนิด แต่มีการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์เพียงประมาณร้อยละ 2 และพบว่าส่วนใหญ่เป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกที่มีจำนวนโครโมโซม 2*n*=48 เช่นเดียวกัน (Burm, 1996) จำนวนโครโมโซมในปลาทะเลมีความผันแปรตั้งแต่ 2*n*= 22 พบในปลาบางชนิดในวงศ์ Nototheniidae (Ozouf-Costaz, Pisano, Thaeron, & Hureau, 1997) และ 2*n*=260 พบในปลาบางชนิดในวงศ์ Acipenseridae (Fontana, Rossi,Lanfredi, Arlati, & Bronzi, 1997) สำหรับในการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของวงศ์ปลาอมไข่พบว่ามีเพียง 15 ชนิด จาก 6 สกุล คิดเป็นจำนวนน้อยกว่าร้อยละ 4.3 ของจำนวนปลาวงศ์อมไข่ทั้งหมดซึ่งมีประมาณ 351 ชนิด จาก 38 สกุลทั่วโลก รายงานทั้งหมดเป็นการศึกษาโดยการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา ยังไม่มีการศึกษาการย้อมแถบสีแบบต่างๆ ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญยิ่ง นอกจากนี้ไม่มีรายงานการศึกษาในปลาอมไข่จากประเทศไทย โดยรายละเอียดสรุปได้ดังตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของวงศ์ปลาอมไข่ (Family Apogonidae)

ชนิด	2*n*	NF	สูตรแคริโอไทป์	Ag-NORs	ประเทศที่ศึกษา	อ้างอิง
Apogon americanus	36	70	12m+6sm+16a+2t	2(TR)	Brazil	Araújo et al. (2010)
A. binotatus	36	50	14m/sm+22a/t	-	USA	Rivlin et al. (1987)
	36	62	26m/sm+10a/t	-	USA	Rivlin et al. (1987)
	35	49	14m/sm+21a/t	-	USA	Rivlin et al. (1987)
A. imberbis	36	56	-	-	Spain	Alvarez et al. (1991)
A. maculatus	34	61	27m/sm+7a/t	-	Puerto Rico	Rivlin et al. (1988)
A. pseudomaculatus	36	66	30m/sm+2a+4t	-	Puerto Rico	Rivlin et al. (1986)
A. lineatus	46	52	2m+4sm+2a+38t	-	Japan	Murofushi (1986)
A. nubilus	46	-	2m+44sm/a/t	-	Pacific	Rivlin et al. (1986)
	46	92	2m+36sm+8a	-	USA	Rivlin et al. (1986)
A. doederleini	46	54	2m+6sm+38a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

ชนิด	2*n*	NF	สูตรแคริโอไทป์	Ag-NORs	ประเทศที่ศึกษา	อ้างอิง
A. endekataenia	46	46	46a/t	-	India	Rishi (1973)
	46	52	2m+4sm+16a+24t	-	Japan	Murofushi (1986)
A. moluccensis	46	46	46a/t	-	India	Rishi (1973)
A. notatus	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
	46	53	2m+5sm+39a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Japan	Murofushi (1986)
*A. semilineatus**	46	52	2m+4sm+20a+20t	-	Japan	Murofushi et al. (1980)
	46	54	2m+6sm+38a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
Phaeoptyx pigmentaria	38	-	6m+32sm/a/t	-	Atlantic	Rivlin et al. (1986)
Sphaeramia orbicularis	46	50	4sm+42a/t	-	Pacific	Ojima and Kojima (1985)

หมายเหตุ - = ไม่มีข้อมูล

จากตารางจะพบว่าจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของวงศ์ปลาอมไข่นั้นมีลักษณะเฉพาะ โดยมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่ำ (2n= 34-46) เมื่อเทียบกับปลาในอันดับเดียวกัน (order Perciforms) ด้วยกัน โดยส่วนมากปลาในอันดับเพอซิฟอร์มประมาณร้อยละ 60 มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 2n=48 มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน NF=48 เช่นเดียวกับปลากระดูกแข็งทั่วไป

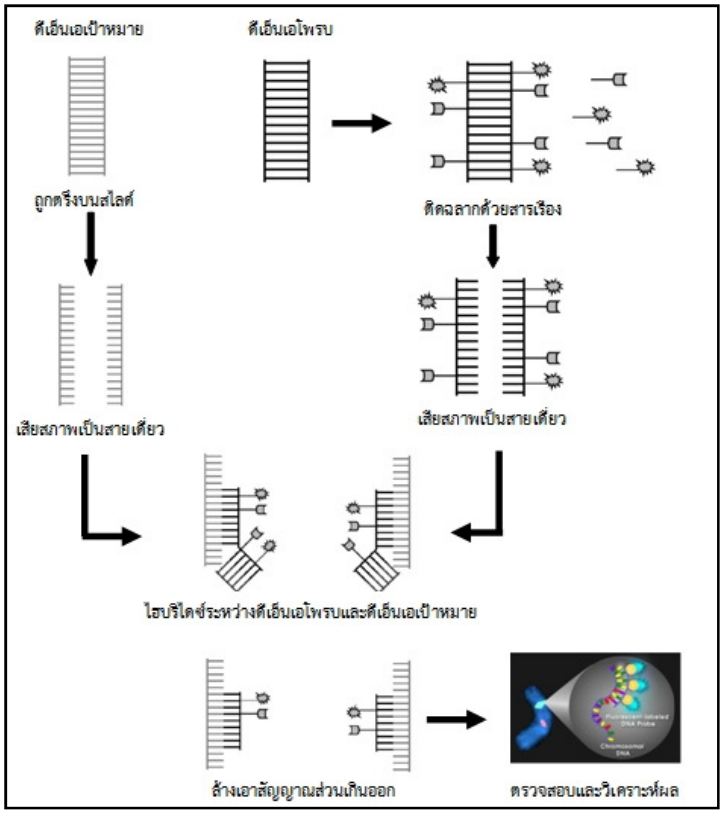
(Galetti Jr., Aguilar, & Molina, 2000) แคริโอไทป์ของปลาวงศ์อมไข่มีความหลากหลายสูง โดยบางชนิดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ต่ำถึง 2n=34 ซึ่งพบได้ในปลา *Apogon maculatus* (Rivlin, Rachlin, & Warkentine, 1988) แต่ส่วนใหญ่ปลาในวงศ์นี้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง พบได้ใน 9 ชนิดจาก 15 ชนิด ดังนี้ ปลา *A. doederleini* (2n=46, NF=50) ปลา *A. endekataenia* (2n=46, NF=46) ปลา *A. lineatus* (2n=46, NF=52) ปลา *A. moluccensis* (2n=46, NF=46) ปลา *A. notatus* (2n=46, NF=52) ปลา *A. nubilis* (2n=46, NF=92) ปลา *A. semilineatus* (2n=46, NF=54) ปลา *Nectamia fusca* (2n=46, NF=48) ปลา *Phaeoptyx pigmentaria* (2n=46, NF=74) และปลา *Sphaeramia orbicularis* (2n=46, NF=50) (Ojima & Kojima, 1985; Rishi, 1973; Murofushi, 1986; Rivlin, Dale, & Rachlin, 1986 ; Rivlin et al., 1988) ในบางชนิดมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานสูงถึง NF=92 พบได้ในปลา *A. nubilis* (2n=46, NF=92) (Rivlin et al., 1986) อย่างไรก็ตามการที่จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ที่ลดลงอาจเกิดจากการเชื่อมรวมกันของโครโมโซมที่ไม่ใช่โครโมโซมคู่เหมือน โดยเชื่อมกันตรงตำแหน่งเซนโทรเมียร์ (centric fusion) ของโครโมโซมชนิดทโลเซนทริก ส่งผลทำให้จำนวนโครโมโซมที่มีสองแขนเพิ่มขึ้น แต่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ลดลง หรือการที่โครโมโซมดิพลอยด์เท่าเดิมแต่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน อาจเกิดจากการที่โครโมโซมดิพลอยด์ที่มีแขนเดียวเกิดการหักแล้วต่อสลับแบบมีเซนโทรเมียร์ร่วมด้วย (pericentric inversion) จนกลายเป็นโครโมโซมชนิดใหม่ที่มีสองแขน จึงทำให้จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่มีการเปลี่ยนแปลงที่จำนวนแขนของโครโมโซมที่มีเพิ่มขึ้นมา

การเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมมีบทบาทสำคัญทำให้เกิดความหลากหลายของจำนวน และรูปแบบของโครโมโซมในปลาวงศ์อมไข่ (Araújo, Martínez, & Molina, 2010) กลไกการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมที่ทำให้เกิดความผันแปรของโครโมโซมปลาทะเลจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่สำคัญ 3 กระบวนการ ได้แก่ 1) การหักและต่อสลับใหม่แบบมีเซนโทรเมียร์ร่วมด้วย 2) การเชื่อมรวมกันของโครโมโซม และ 3) การหักของชิ้นส่วนของโครโมโซม วงศ์ปลาทะเลที่มีวิวัฒนาการเปลี่ยนแปลงทางโครโมโซมนั้น อาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการใดกระบวนการหนึ่ง หรือทุกกระบวนการ ซึ่งทำให้มีลักษณะเฉพาะในแต่ละวงศ์ที่แตกต่างกันออกไป (Galetii et al., 2000)

พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล (Molecular Cytogenetics)

การจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนบนโครโมโซมด้วย การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล โดยวิธีอินซิทูไฮบริไดเซชัน (*in situ* hybridization, ISH) จึงถูกนำมาใช้ในการอธิบายการเปลี่ยนแปลงยีนบนโครโมโซมดังกล่าว ต่อมาวิธี ISH ได้ถูก

พัฒนาโดยการติดฉลากโพรบด้วยสารเรืองแสง (fluorescein) แทนสารกัมมตรังสีจึงถูกตั้งชื่อใหม่ว่า ฟลูออเรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน (Fluorescence *in situ* hybridization ,FISH) หรือเรียกว่า เทคนิคฟิช ซึ่งถูกใช้กันอย่างแพร่หลายพร้อมกับมีการพัฒนาและประยุกต์ใช้อย่างต่อเนื่องแตกต่างกันออกไปตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการศึกษา แต่ยังคงมีหลักการพื้นฐานของเทคนิค FISH กล่าวคือ ดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกตรึงบนสไลด์ ส่วนดีเอ็นเอโพรบจะถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เพื่อให้สัญญาณที่ตรวจสอบได้ จากนั้นทั้งดีเอ็นเอเป้าหมายและดีเอ็นเอโพรบจะถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติเป็นสายเดี่ยวแล้วนำมาไฮบริไดซ์หรือทำให้เกิดการเข้าคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษา แล้วล้างเอาสัญญาณส่วนที่เกินออกเพื่อจะได้ตำแหน่งที่ต้องการศึกษาเท่านั้น (Fan, 2002) (ภาพที่ 2-4)



ภาพที่ 2-4 หลักการพื้นฐานของเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน (เทคนิคฟิช)
(ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Liehr, 2009 อ้างถึงใน อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

การแยกสกัด และการสร้างโพรบ

โดยทั่วไปโพรบจะประกอบด้วยจีโนมิคดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ซึ่งได้มาจากกระบวนการเพิ่มจำนวนของคอมพลิเมนทารี ดีเอ็นเอ (complementary DNA หรือ cDNA) โดยใช้เวคเตอร์ (vector) เวคเตอร์เหล่านี้ ได้แก่ พลาสมิด (plasmid) โพรบที่เตรียมได้จากเวคเตอร์ชนิดนี้จะเรียกว่าพลาสมิด อาร์ทิฟิเชียลโครโมโซม (plasmid artificial chromosomes, PACs) โพรบที่เพิ่มปริมาณจากยีสต์เรียกว่ายีสต์ อาร์ทิฟิเชียล โครโมโซม (yeast artificial chromosomes, YACs) โพรบที่เพิ่มปริมาณจากแบคทีเรียเรียกว่าแบคทีเรียล อาร์ทิฟิเชียล โครโมโซม (bacterial artificial chromosomes, BACs) และโพรบที่เตรียมมาจากโครโมโซมของมนุษย์เรียกว่าฮิวแมน อาร์ทิฟิเชียล โครโมโซม (human artificial chromosomes, HACs)

การแยกสกัดเพื่อนำไปสร้างโพรบมีหลายเทคนิค ได้แก่

1. กระบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะ ไพรเมอร์ที่จำเพาะนี้จะเพิ่มปริมาณบริเวณยีนที่สนใจศึกษาเท่านั้น จากนั้นนำไปติดฉลากโพรบต่อไป

2. เทคนิคโฟลว์-ซอร์ท โครโมโซม (flow-sorted chromosomes) โดยใช้เครื่องโฟลว์ไซโตเมทตรี (flow cytometry) แยกโครโมโซมโดยอาศัยน้ำหนักของโครโมโซม โครโมโซมขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักมากจะถูกแยกออกมาก่อน และตามด้วยโครโมโซมขนาดเล็กที่มีน้ำหนักน้อยกว่า หลังจากนั้นโครโมโซมทั้งแท่งที่ถูกแยกออกมาจะถูกนำไปสร้างโพรบชนิดโฮล โครโมโซม เพนทิง (whole chromosome painting probes)

3. เทคนิคไมโครดิสเซคชัน (microdissection) เป็นอีกเทคนิคที่ใช้แยกโครโมโซมทั้งแท่ง หรือบางบริเวณของโครโมโซมที่สนใจออกมาจากเซลล์เมทาเฟสบนสไลด์ กระทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เตท (inverted microscope) ที่มีกำลังขยายสูงสุด 1,250 เท่า สามารถตัดโครโมโซมแต่ละแถบสีบนโครโมโซมได้ หลังจากได้ชิ้นส่วนโครโมโซมทั้งแท่งหรือบางส่วนที่สนใจจากเทคนิคโฟลว์ซอร์ท โครโมโซม และไมโครดิสเซคชัน จะถูกนำมาเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์สากล หรือที่เรียกว่าเทคนิคดอพ-พีซีอาร์ (DOP-PCR, degenerated oligonucleotide primer-PCR) (อลงกลด แทนออมทอง, 2554 ; Liehr, 2009)

การติดฉลากโพรบ

ภายหลังจากที่แยกสกัดโพรบได้แล้ว จะต้องติดฉลากโพรบด้วยวิธีนิค ทรานสเลชัน (nick translation) โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอส 1 (DNase I) ที่ความเข้มข้นระดับต่ำในสภาวะที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยาจะทำให้มีการตัดสายดีเอ็นเอ แล้วนำโมเลกุลนิค (ทำหน้าที่เป็น

ไพรเมอร์) เข้าสู่สายดีเอ็นเอ วิธีการนิค ทรานสเลชันอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส 1 (DNA polymerase I) ของ *E. coli* ที่มีคุณสมบัติเอกโซนิวคลีเอส (exonucleolytic activity) และโพลิเมอเรส (polymerase activity) เอนไซม์ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส 1 จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมในทิศทางมาตรฐาน 5’ ไป 3’ โดยใช้ปลาย 3’-OH ของโมเลกุลนิคเป็นเสมือนไพรเมอร์ โดยเริ่มแรกคุณสมบัติเอกโซนิวคลีเอสจะตัดนิวคลีโอไทด์ออกในทิศทางเดียวกับการสังเคราะห์ คือ ทิศทาง 5’ ไป 3’ ขณะเดียวกันคุณสมบัติที่เป็นพลิเมอเรสจะทำงานโดยแทนที่นิวคลีโอไทด์ที่ถูกกำจัดออกด้วยโมเลกุลนิวคลีโอไทด์ที่ติดกับโมเลกุลของสารเรืองแสง หรือโมเลกุลของแฮปเทน และในสภาวะอุณหภูมิต่ำ ๆ (15 องศาเซลเซียส) ดีเอ็นเอที่ไม่ถูกติดฉลากจะถูกแทนที่ด้วยดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลากซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ ๆ วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอส่วนใหญ่ในการนำมาสร้างโพรบ แต่ในกรณีที่ดีเอ็นเอมีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น ซีดีเอ็นเอ (cDNAs) การสร้างโพรบและติดฉลากได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้หลักการของพีซีอาร์ นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวยังเหมาะกับดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และดีเอ็นเอโพรบทุกประเภท ซึ่งจะช่วยในการเพิ่มชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ได้มาจากเทคนิคไมโครดิสเซคชัน และเทคนิคโฟลว์ซอร์ท โครโมโซมโดยการใช้ไพรเมอร์สากล หรือที่เรียกว่าเทคนิคดอพ-พีซีอาร์ ปัจจุบันเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในเรื่องของขั้นตอนที่ง่าย สะดวก และคุณภาพของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของโพรบที่ถูกติดฉลากด้วยวิธีนี้จะชัดเจน (อลงกลด แทนออมทอง, 2554 ; Liehr, 2009)

ปัจจุบันโพรบที่ใช้ในเทคนิคฟิชอาจติดฉลากด้วยสารเรืองแสงซึ่งมีอยู่หลายชนิด หรืออาจติดฉลากด้วยแฮปเทนซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับเบสที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ โมเลกุลของแฮปเทนที่นิยมใช้ คือ ไบโอทิน และไดโกซิเจนิน ดังนั้นประเภทของการติดฉลากโพรบจึงแบ่งเป็น สองแบบ คือ ติดฉลากโพรบด้วยสารเรืองแสงที่เรียกว่าการติดฉลากแบบทางตรง (direct labeled) ส่วนการติดฉลากด้วยแฮปเทนเรียกว่าการติดฉลากแบบทางอ้อม (indirect labeled) การติดฉลากทั้งสองวิธีนี้แตกต่างกันตรงที่การติดฉลากแบบทางตรงนั้น สามารถตรวจสอบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ทันทีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์แต่มีข้อเสีย คือ ต้องรีบทำการตรวจวิเคราะห์ผลก่อนที่สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่อยู่บนตัวอย่างสไลด์นั้นจะอ่อนหรือจางหายไป ส่วนการติดฉลากโพรบแบบทางอ้อมด้วยแฮปเทนนั้น จะมีขั้นตอนสำหรับการตรวจวิเคราะห์ผลที่มากกว่า เนื่องจากแฮปเทนไม่ใช่โมเลกุลเรืองแสง ดังนั้นจึงต้องอาศัยหลักการของการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี กล่าวคือถ้าติดฉลากโพรบด้วยไบโอทินจะต้องใช้ตัวติดตาม คือ เอวิดิน (avidin) ที่ติดกับโมเลกุลของสารเรืองแสง ข้อดี คือ ไบโอทินหนึ่งโมเลกุลสามารถจับกับเอวิดินได้หลายโมเลกุล ดังนั้นเมื่อตรวจสอบผลสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ก็จะมีความเข้มมากกว่า

แบบที่ติดฉลากโดยทางตรง ทำให้การวิเคราะห์ผลทำได้ง่ายและชัดเจน (อลงกลด แทนออมทอง, 2554 ; Liehr, 2009)

การเตรียมตัวอย่างโครโมโซม

เทคนิคฟิชเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง และความผิดปกติภายในจีโนม ดังนั้นการเตรียมโครโมโซมในระยะเมทาเฟสจึงมีความสำคัญมาก เนื่องจากภายในเซลล์มีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ซึ่งอยู่ในไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) จึงต้องมีการกำจัดสิ่งเหล่านี้ออกไปก่อน เรียกว่าการทำพรีทรีเมนต์ (pretreatment) โดยการใช้เอนไซม์โพรทีเนส (proteinase) หรือเปปซิน (pepsin) ซึ่งนับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากเอนไซม์จะไปย่อยกำจัดโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันต่าง ๆ ที่อยู่ภายในไซโทพลาสซึม หรือติดอยู่กับนิวเคลียส ทำให้สามารถลดสัญญาณรบกวนที่จะเกิดขึ้นจากการตรวจสอบได้ นอกจากนี้การใช้เอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase) ย่อยอาร์เอ็นเอภายในเซลล์นั้นยังสามารถช่วยลดสัญญาณรบกวนจากการจับกันระหว่างโพรบกับอาร์เอ็นเอ ทำให้ผลการตรวจสอบชัดเจนและสามารถวิเคราะห์ผลได้ง่ายขึ้น การเตรียมตัวอย่างโครโมโซมที่ไม่ดีจะทำให้เกิดรูปแบบของการจับกันระหว่างดีเอ็นเอโพรบและดีเอ็นเอเป้าหมายผิดพลาด ทั้งนี้สภาวะอื่น ๆ ที่ต้องควบคุมและให้ความสำคัญในกระบวนการ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน (อลงกลด แทนออมทอง, 2554 ; Liehr, 2009)

การไฮบริไดซ์โพรบกับตัวอย่างโครโมโซม หรือดีเอ็นเอเป้าหมาย

เซลล์ในพวกยูแคริโอตจะมีลำดับเบสที่ซ้ำ ๆ กัน (intersperse element หรือ short intersperse element) เป็นจำนวนมากภายในจีโนม และจะมีการรวมตัวกันอย่างมีแบบแผนโดยกระจัดกระจายในตำแหน่งต่าง ๆ บนโครโมโซม หรือที่เรียกว่าเฮเทอโรโครมาทิก บล็อก (heterochromatic blocks) และเนื่องจากโพรบที่ใช้ในการศึกษาวิจัยต้องมีขนาดใหญ่พอที่สามารถตรวจสอบสัญญาณ ฟลูออเรสเซนซ์ ภายหลังกระบวนการไฮบริไดซ์ระหว่างโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ จึงเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้สำหรับลำดับเบสซ้ำ ๆ ที่แทรกตัวอยู่ระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้นสิ่งที่ควรคำนึง คือ ต้องกำจัดส่วนของดีเอ็นเอสายสั้นที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กันภายในจีโนม โดยการใช้คอมเพทิเทอร์ คอทวัน ดีเอ็นเอ (competitor Cot I DNA) ซึ่งจะช่วยให้โพรบไม่ไปจับกับองค์ประกอบเหล่านี้บนดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยการทำงานของคอมเพทิเทอร์ คอทวัน ดีเอ็นเอจะเข้าไปจับกับลำดับเบสซ้ำ ๆ ของโพรบก่อนที่จะนำโพรบไปไฮบริไดส์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย เรียกว่าการทำพรีไฮบริไดเซชัน (pre-hybridization) (อลงกลด แทนออมทอง, 2554 ; Liehr, 2009)

การตรวจสอบ และการวิเคราะห์ผล

เทคนิคฟิชกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์เป็นสิ่งที่จำเป็นในการตรวจหาโพรบที่จับอยู่กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่จำเพาะ โดยอาศัยโมเลกุลติดตามและรายงานผล โมเลกุลติดตามส่วนใหญ่จะเป็นไบโอทิน หรือไดโกซิเจนิน ซึ่งจะต้องอาศัยแอนติไบโอทิน แอนติบอดี (antibiotin antibody) หรือ เอวิดิน และแอนติไดโกซิเจนิน แอนติบอดี (antidigoxigenin antibody) ที่ถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ก่อนจึงจะนำไปตรวจวัดได้ ซึ่งการอ่านสัญญาณสามารถทำได้โดยการนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยอาศัยคุณสมบัติพิเศษของสารเรืองแสงซึ่งเมื่อดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นระดับหนึ่ง และจะปลดปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นที่มากกว่าออกมา ภายในกล้องจุลทรรศน์จะมีชุดกรองแสงหรือฟิลเตอร์ที่ยอมให้แสงที่มีความยาวคลื่นที่เหมาะสมผ่านไปกระตุ้นสารเรืองแสง สารเรืองแสงก็จะปลดปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นอีกขนาดหนึ่งออกมา และจะมีฟิลเตอร์อีกอันหนึ่งที่จะยอมให้แสงนี้ผ่านเข้าสู่ดวงตาโดยที่ไม่ยอมให้แสงที่มีความยาวคลื่นอื่น ๆ ผ่าน ส่งผลให้สามารถเห็นบริเวณที่มีสารเรืองแสงเป็นจุดที่เรืองแสงบนพื้นหลังสีดำได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (อลงกลด แทนออมทอง, 2554; Liehr, 2009)

การประยุกต์ใช้เทคนิคฟิชกับปลา

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา การหาลำดับดีเอ็นเอที่อยู่บนโครโมโซมโดยใช้เทคนิคฟิช นั้นถูกนำมาประยุกต์ใช้กับปลาหลายชนิด (Cross et al., 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การตรวจหาดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำ ๆ เป็นกลุ่มที่อยู่ในตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม ได้แก่ ยีนฮีสโตน (histone genes) ยีนไรโบโซม อาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA genes) ซึ่งยีนเหล่านี้มีประโยชน์ในการศึกษาลักษณะและรูปแบบของโครโมโซม และเป็นยีนที่พบในปลาทุกชนิด ซึ่งการศึกษายีนดังกล่าวบนโครโมโซมเป็นข้อมูลใหม่ในการสร้างวิวัฒนาการของปลากลุ่ม salmonids พบว่าลำดับเบสที่ซ้ำๆ แยกได้จากปลาหลายชนิด มีการกระจายอยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกันไป โดยอาจอยู่บริเวณตำแหน่งเซนโทเมียร์ ตัวอย่างเช่น ปลาแอนตาร์กติก ไอซ์ (Antarctic Ice, *Chiondraco hamatus*), ปลา *Hoplias malabaricus*, ปลา *Sparus aurata* และ ปลา *Salvelinus alpines* เป็นต้น หรือพบกระจายอยู่บริเวณเทโลเมียร์ ซึ่งจะพบในโครโมโซมสัตว์มีกระดูกสันหลังทุกชนิด ปลาที่เคยตรวจสอบด้วยโพรบเทโลเมียร์ ได้แก่ กลุ่มปลา Cypriniforms และกลุ่มปลา Salmoniforms ส่วนในปลากลุ่ม poecilids, ปลา *Leporinus elongates*, ปลา *Chiondraco hamatus* และปลา *Oncorhynchus tshawytscha* พบกลุ่มลำดับเบสที่ซ้ำจะมีความจำเพาะที่โครโมโซมเพศ การตรวจสอบดังกล่าวจะใช้โพรบที่ตรวจสอบแตกต่างกันไป เช่น โพรบที่จำเพาะต่อชนิด โพรบที่จำเพาะต่อโครโมโซม หรือโพรบที่จำเพาะต่อเพศ ซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงปลา สำหรับโพรบเซนโทเมียร์และ

เทโลเมียร์ถูกใช้ในการตรวจสอบการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมภายในชนิดเดียวกัน (Ruth & Kent, 1996)

ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ ยีน ในปลารวมทั้งยูคาริโอตชั้นสูงอื่น ๆ ประกอบด้วยกลุ่มยีน 2 วงศ์ (multigene families) ที่แตกต่างกัน กลุ่มยีนเหล่านี้ประกอบด้วยยีนที่อยู่กันเป็นชุดซ้ำ ๆ ตั้งแต่ 100 ถึง 1,000 ชุด เรียงต่อกัน กลุ่มยีนวงศ์แรก (ยีนหลักของ อาร์ดีเอ็นเอ) เรียกว่า 45S rDNA เป็นตัวสร้างนิวคลีโอลัส ประกอบด้วยยีน 18S, 5.8S และ 28S rDNAs ส่วนกลุ่มยีนอีกวงศ์ (ยีนรองของอาร์ดีเอ็นเอ) เรียกว่า 5S rDNA เป็นยีนที่ไม่ได้สร้างนิวคลีโอลัส ดังนั้น 45S rDNA จึงเป็นกลุ่มยีนที่สัมพันธ์กับตำแหน่งนอร์ (Mazzei et al., 2004) ยีน 45S rDNA ถูกถอดรหัสโดยเอนไซม์ RNA polymerase I ในขณะที่ 5S rDNA ถูกถอดรหัสโดยเอนไซม์ RNA polymerase III (Long & David, 1980) รูปแบบของการกระจายตัวของยีนไรโบโซมมีความจำเพาะต่อชนิดและการจัดเรียงตัวของโครโมโซมในปลาวงศ์ Channichthyidae (Mazzei et al., 2004) ฟอนทานาและคณะ (Fontana et al., 2003) ยังพบว่ารูปแบบของการกระจายตัวของกลุ่มยีนเหล่านี้มีความคล้ายคลึงและอนุรักษ์สูงภายในวงศ์ของปลาสเตอร์เจียน และยีนเหล่านี้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมอย่างดีในการศึกษาวิวัฒนาการรวมทั้งการระบุชนิดโดยใช้พันธุกรรมในชนิดที่ใกล้เคียงกันของปลาสกุลทอร์ (*Tor*) นอกจากนี้การใช้ยีนไรโบโซมซึ่งเป็นเสมือนโครโมโซมเครื่องหมายมีความสำคัญยิ่งในการศึกษาเปรียบเทียบทางพันธุกรรม (Singh et al., 2009) ยีนไรโบโซม (18S and 5S rDNA) ยังเป็นเครื่องหมายที่ถูกใช้ในปลา *H. malabaricus* เพื่อแยกแต่ละประชากรออกจากกันได้ (Cioffi, Martins, & Bertollo, 2009; Vicari, Artoni, & Bertollo, 2005) ในทำนองเดียวกันรูปแบบของโพรบ rDNA เหล่านี้สามารถถูกใช้เป็นเครื่องหมายจีโนมเพื่อใช้สำหรับตรวจสอบคู่ผสมระหว่างชนิดได้ รวมถึงการทำแผนที่โครโมโซมของยีนสายเดี่ยว ตำแหน่งไมโครแซทเทิลไลท์ ในปัจจุบันมีการใช้เทคนิค FISH เพื่อใช้ประโยชน์ในการแยกลักษณะทางปริมาณ ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Ruth & Kent, 1996)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานการวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ การเก็บตัวอย่าง การศึกษาลักษณะภายนอกตามสัณฐานวิทยาเพื่อระบุชนิดตัวอย่างปลาอมไข่ การศึกษาด้านพันธุศาสตร์เซลล์ และการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปลาอมไข่ที่เป็นปลาธรรมชาติ จากการเพาะเลี้ยง และปลาที่มีการเลี้ยงเป็นปลาสวยงามในประเทศไทย ทั้งหมด 4 ชนิด ชนิดละ 20 ตัว โดยแบ่งเป็นเพศผู้ 10 ตัว และ เพศเมีย 10 ตัว

การศึกษาลักษณะภายนอกตามสัณฐานวิทยาเพื่อระบุชนิดตัวอย่างปลาอมไข่

นำตัวอย่างปลามาตรวจสอบโดยดูลักษณะลาย สีสันที่แสดงออกตามลำตัว นับจำนวนก้านครีบหลัง ครีบท้องและครีบก้น และระบุชนิดโดยใช้เอกสารตามคู่มือของ ชวลิต วิทยานนท์ (2551), แอลเลน (Allen, 1997) และ โยชิดะ และคณะ (Yoshida et al., 2003) ทำการถ่ายภาพตัวอย่างปลาอมไข่แต่ละชนิด และทำการแยกเพศของปลาอมไข่ที่นำมาศึกษา โดยการแยกเพศของปลาอมไข่ เมื่อดูจากลักษณะภายนอกจะไม่สามารถแยกได้ชัดเจน แต่จะดูจากขนาดตัว และสีสันของปลาประกอบ โดยปลาอมไข่เพศเมียจะมีตัวใหญ่กว่าเพศผู้เล็กน้อย และสีสันไม่สวยงามเท่าเพศผู้ แต่การศึกษาครั้งนี้จะดูที่อวัยวะเพศภายใน โดยปลาอมไข่เพศผู้มีอวัยวะเพศเป็นติ่งยาวรีปลายแหลม สีขาวขุ่น ผิวเรียบ อยู่บริเวณตำแหน่งท้องใต้ไตของปลา อวัยวะเพศเมียเป็นติ่งยาวรีปลายป้านสีขาวขุ่นผิวค่อนข้างขรุขระกว่าเพศผู้ อยู่บริเวณตำแหน่งท้องใต้ไตปลา

การศึกษาด้านพันธุศาสตร์เซลล์

การศึกษาด้านพันธุศาสตร์เซลล์ ประกอบด้วย ขั้นตอนการเตรียมโครโมโซม การเตรียมสไลด์ การย้อมสีโครโมโซม การตรวจสอบโครโมโซม การจัดทำคาริโอไทป์ และการสร้างอิดิโอแกรมมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

1. การเตรียมโครโมโซมโดยวิธีทางตรง (direct method)

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

2. การเตรียมสไลด์โครโมโซม

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

3. การย้อมสีโครโมโซม

นำสไลด์ที่เตรียมไว้มาทำการย้อมสีโครโมโซมทั้งแบบธรรมดาและแบบนอร์ ดังนี้

3.1 การย้อมแบบธรรมดานั้นทำการย้อมสไลด์ด้วยสีจิมซ่า ความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% Geimsa stain) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ที่มีค่าพีเอช (pH) 6.8 เป็นเวลา 30-45 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.2 สำหรับการย้อมแถบสีแบบนอร์ (NORs) ดัดแปลงจากวิธีการของโฮเวลล์และแบล็ค (Howell & Black, 1980) ดังนี้ สไลด์ที่จะย้อมต้องมีอายุระหว่าง 1-7 วัน โดยนำสไลด์ที่

เตรียมไว้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 ชั่วโมง หยดเจลลาตินเข้มข้นร้อยละ 2 ลงบนสไลด์ 2 หยด แล้วหยดซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้นร้อยละ 50 (50% $AgNO_3$) ลงบนสไลด์ 4 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำเข้าตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หรือจนกว่าสไลด์จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม (ห้ามทิ้งไว้นานจนสไลด์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลโดยเด็ดขาด) ล้างซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ผึ่งสไลด์ให้เกือบแห้ง นำไปย้อมด้วยสีจิมซ่าเข้มข้นร้อยละ 10 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 6.8 เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ผึ่งให้แห้งนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 40X

4. การตรวจสอบโครโมโซม

เลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมระยะเมทาเฟสกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน นำมาถ่ายภาพโครโมโซมโดยใช้เลนส์วัตถุ (objective lens) กำลังขยาย 100X เลนส์ใกล้ตากำลังขยาย 10x โดยใช้ชุดถ่ายภาพที่ต่อกับกล้องจุลทรรศน์ หรือใช้กล้องดิจิตอลโดยใช้เลนส์ใกล้กล้องถ่ายภาพกำลังขยาย 2.5x เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากภาพถ่ายโครโมโซมจำนวน 100 เซลล์ ความถี่ของจำนวนโครโมโซมที่พบมากที่สุด จะเป็นค่าของจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จากนั้นจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน (homologous chromosome) และศึกษาโครโมโซมโดยการหาค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls) และคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (total length; LT, LT = Ll + Ls) คำนวณค่า relative length (RL) และ centromeric index (CI) เพื่อระบุชนิดของโครโมโซม และนำค่าที่ได้ไปใช้ประกอบในการจัดทำแคริโอไทป์ และสร้างอิดิโอแกรมมาตรฐาน

5. การจัดทำแคริโอไทป์

ดัดแปลงจากวิธีการของกันยารัตน์ ไชยสุต (2532) และ เทอพินและลีเจอเน (Turpin & Lejeune, 1965) ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยการกำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ วัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง จัดเรียงคาริโอไทป์ ให้เรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้ายเสมอ ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่าง วางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง

ขั้นตอนการจัดทำคาริโอไทป์

1) เลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟส ที่มีขนาดของโครโมโซมไม่ยาวหรือสั้นเกินไป มีการกระจายที่ดีไม่ซ้อนทับกัน และนับจำนวนโครโมโซมได้ครบเท่ากับจำนวนโครโมโซมของ

สิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X เลือกมาจัดจำนวนชนิดละ 20 เซลล์

2) ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยกำหนดตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ จากนั้นวัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง การวัดค่าความยาวของโครโมโซมอาจจะใช้วิธีการตัดโครโมโซมออกมาจากรูปถ่ายทีละแท่ง กำหนดหมายเลขให้โครโมโซมทุกแท่งก่อนการวัด เมื่อวัดความยาวเสร็จแล้วจึงจับคู่โครโมโซมที่มีความยาวของแขนแต่ละข้าง และความยาวทั้งแท่งใกล้เคียงกันมากที่สุด

3) การคำนวณหาค่าความยาวสัมพัทธ์ (relative length; RL) คำนวณได้จากสูตรดังนี้

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

การใช้ค่า RL นี้สามารถช่วยในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซม เพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ในทุก ๆ เซลล์ ส่วนค่าความยาวของโครโมโซมจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละเซลล์

4) การคำนวณหาค่าดัชนีเซนโทรเมียร์ (centromeric index; CI) คำนวณได้จากสูตรดังนี้

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

นำค่า CI ที่ได้นำมาระบุชนิดของโครโมโซม โดยใช้เกณฑ์ ดังนี้

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.500–0.599 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.600–0.699 จัดเป็นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.700–0.899 จัดเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.900–1.000 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก

5) การกำหนดขนาดของโครโมโซม แบ่งขนาดของโครโมโซมออกเป็น 3 ขนาด โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุดเป็นโครโมโซมคู่สุดท้าย

โครโมโซมขนาดใหญ่ (large=L) คือ โครโมโซมที่มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

$$\text{ดังนั้น} \quad \frac{\text{LT เฉลี่ยคู่ที่ใหญ่สุด + LT เฉลี่ยคู่ที่เล็กสุด}}{2} \leq L$$

โครโมโซมขนาดกลาง (medium=M) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

$$\text{ดังนั้น} \quad \frac{\text{LT เฉลี่ยคู่ที่ใหญ่สุด + LT เฉลี่ยคู่ที่เล็กสุด}}{2} \geq M$$

โครโมโซมขนาดเล็ก (small=S) ได้แก่ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุด

$$\text{ดังนั้น} \quad \frac{\text{LT เฉลี่ยคู่ที่ใหญ่สุด}}{2} \geq S$$

6) จัดเรียงคาริโอไทป์ ให้เรียงตามชนิดโครโมโซมก่อน แล้วค่อยเรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้าย ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่างวางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง และนิยมวางแท่งโครโมโซมให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ตรงกัน

6. การทำอิดิโอแกรมมาตรฐาน

อิดิโอแกรม คือ ไดอะแกรมแสดงคาริโอไทป์ของโครโมโซม 1 ชุดแฮพลอยด์ ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ โดยใช้ข้อมูลค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซม รูปร่างของโครโมโซม และตำแหน่งเซนโทรเมียร์ อิดิโอแกรมจากเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาใช้เซลล์ระยะเมทาเฟสชนิดละ 20 เซลล์ นำมาจัดคาริโอไทป์ แล้ววัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว และแขนโครโมโซมข้างสั้นของโครโมโซมทุกคู่ด้วยเวอร์เนียร์ (vernier) จัดทำภาพวาดอิดิโอแกรมด้วยคอมพิวเตอร์ โดยการนาค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่มาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ให้แกนตั้ง (Y) เป็นความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ และแกนนอน (X) เป็นลำดับของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่เล็กที่สุด ยกเว้นโครโมโซมเพศจัดเป็นคู่สุดท้าย แล้วนำมาปรับรูปร่างของโครโมโซมโดยใช้โปรแกรม Microsoft Word หรือ Microsoft PowerPoint

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล

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

1. ขั้นตอนการเตรียมสไลด์เหมือนกับการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์

2. การทำพรีทรีทเมนต์มีขั้นตอนดังนี้

2.1 นำสไลด์ไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

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

2.3 เติมสารละลายเปบซิน (pepsin) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในโถย้อมสีในข้อ 2.2

2.4 จุ่มแผ่นสไลด์ในโถย้อมสีที่เตรียมไว้ในอ่างน้ำอุ่น เป็นระยะเวลา 3-5 นาที

2.5 ล้างแผ่นสไลด์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

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

2.7 นำกระจกปิดสไลด์ออก และล้างในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 เท่า เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสไลด์ไปล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5 นาที

2.8 ทำการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยผ่านในลำดับแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 75, 95 และ 100 ตามลำดับ เป็นเวลาลำดับละ 3 นาที แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3. การเตรียมโพรบ

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

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

3.2 ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอยีนโพรบ ชนิด 18S rDNA เตรียมโดยกระบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากดีเอ็นเอของปลาอมไข่ครีบยาว ที่มีขนาดความยาวของเบสประมาณ 1,400 คู่เบสของยีน 18S rRNA ตามวิธีของซิออฟฟีและคณะ (Cioffi et al., 2009) ซึ่งใช้ไพรเมอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

18S rDNA

Forward 5' CCGCTTTGGTGACTCTTGAT 3'

Reverse 5' CCGAGGACCTCACTAAACCA 3'

ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังตารางที่ 3-1 แล้วเข้าสู่ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามขั้นตอนที่กำหนด

ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในการทำโพรบ

ใช้เครื่อง Thermal cycle รุ่น Palm cycler ซึ่งการทำงานประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

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

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ

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

ตารางที่ 3-1 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อสร้างโพรบ

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

หลังจากนั้นนำโพรบ 18S rDNA ไปติดฉลากแบบโดยตรงด้วยสารเรืองแสงสเปกทรัมออร์เรน (spectrum orange-dUTP) (Roche, Mannheim, Germany) ด้วยวิธีนิค ทรานสเลชัน (nick translation) (Morrison, Ramakrishnan, Ruffalo, & Wilber, 2002)

4. การทำไฮบริไดเซชั่น

4.1 เทโลเมียร์โพรบ มีขั้นตอนดังนี้

1. เติมโพรบ ในปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์จากนั้นนำสไลด์ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2. นำสไลด์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นสไลด์ออกจากที่มืด แล้วนำกระจกปิดสไลด์ออกจากแผ่นสไลด์
3. ทำการล้างโพรบส่วนเกินออก โดยแช่ในสารละลายซาลีนโซเดียมซิเตรท (saline-sodium citrate, 1X SSC) ที่ถูกทำให้อุ่นอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น
4. ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยการผ่านในลำดับของแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70, 95 และ 100 ตามลำดับ ลำดับละ 2 นาที แล้วปล่อยในแห้งในที่มืด
5. ย้อมสีสไลด์ด้วยสารละลายแดปี (DAPI; 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ยาว จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ หรือเก็บในกล่องทึบแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2 ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอยีนโพรบ ชนิด 18S rDNA มีขั้นตอนดังนี้

1. นำแผ่นสไลด์ไปบ่มกับสารละลายฟอร์มาดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 70 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
2. นำแผ่นสไลด์มาแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 ที่เย็นจัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
3. ย้ายแผ่นสไลด์ไปแช่ในลำดับแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 และ 100 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้องลำดับละ 2 นาที จากนั้นเป่าให้แห้งอย่างรวดเร็ว
4. นำสารละลายโพรบไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอยีนโพรบ ชนิด 18S rDNA ไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยส่วนผสมของโพรบ มีดังนี้ 2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ดีไอออไนด์ ฟอร์มาไมด์ (deionized formamide) ความเข้มข้นร้อยละ 50 และสารละลายเดกซ์แทรนซัลเฟต (dextran sulphate) ความเข้มข้นร้อยละ 10

(ในระหว่างขั้นตอนที่ 1-3 ต้องทำให้แล้วเสร็จพร้อมกันกับขั้นตอนที่ 4)

5. หยดสารละลายโพรบที่ถูกทำให้เสียสภาพ (denatured) ลงบนสไลด์ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำไปบ่มในที่ชื้นและมืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6. นำสไลด์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นสไลด์ออกจากที่มืด แล้วนำกระจกปิดสไลด์ออกจากแผ่นสไลด์

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

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

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

10. ย้อมสีสไลด์ด้วยสารละลายแดปีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ยาว จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ หรือเก็บในกล่องทึบแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การวิเคราะห์ผล

ตรวจสอบสัญญาณเรืองแสงบนโครโมโซมในตำแหน่งที่จำเพาะต่อชนิดของปลาอมไข่ ศึกษาเปรียบเทียบในแต่ละชนิด สำหรับสัญญาณของโพรบเทโลเมียร์นั้นได้เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีส้มแดงเพื่อให้ตรวจสอบสัญญาณได้ง่ายขึ้น เพราะสีพื้นของโครโมโซมที่ย้อมติดแดปีเป็นสีน้ำเงิน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนต์พร้อมโปรแกรมถ่ายรูป Lucia Cytogenetics version 2.0

บทที่ 4
ผลการวิจัย

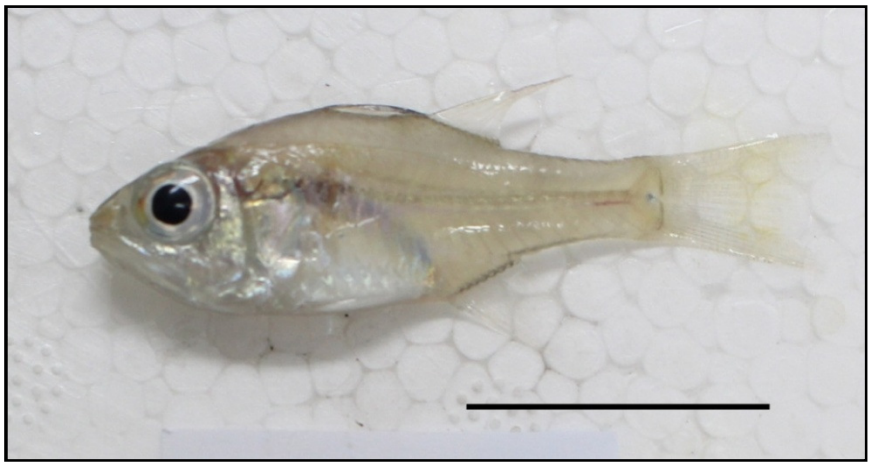
การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ และพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาวงศ์อมไข่ ที่เป็นปลาจากธรรมชาติทั้งฝั่งทะเลอันดามัน ฝั่งอ่าวไทย และปลาที่มีการเลี้ยงเป็นปลาสวยงามในประเทศไทยจำนวน 4 ชนิด พบว่าปลาวงศ์อมไข่ แต่ละชนิดมีมาตรฐานลักษณะแคริโอไทป์ (karyotype) ที่เป็นลักษณะประจำพันธุ์ ดังนี้

ลักษณะของปลาอมไข่ที่ศึกษา

1. ปลาอมไข่ตาดำ (Fibramia lateralis (Valenciennes, 1832))

ลักษณะทั่วไป

เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ย 10 เซนติเมตร ลำตัวมีสีขาวเงิน ลำตัวค่อนข้างยาวและแคบ มีเส้นสีดำพาดผ่านกลางลำตัวตามยาวจากอกถึงหาง มีครีบหลังแยกออกจากกันเป็น 2 ส่วน ครีบหลังส่วนหน้ามีลักษณะเป็นก้านครีบแข็ง VI ก้าน ครีบหลังส่วนหลังมีก้านครีบแข็ง I ก้าน ก้านครีบอ่อน 9 ก้าน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง II ก้าน และก้านครีบอ่อน 8 ก้าน ครีบห้องมีก้านครีบแข็ง I ก้าน ก้านครีบอ่อน 5 ก้าน มีตากลมโตสีดำ (ภาพที่ 4-1)



ภาพที่ 4-1 ลักษณะปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis* (Valenciennes, 1832))
สเกลบาร์ 2 เซนติเมตร

2. ปลาอมไข่ตาฟ้า (Sphaeramia orbicularis **(Cuvier, 1828)***)*

ลักษณะทั่วไป

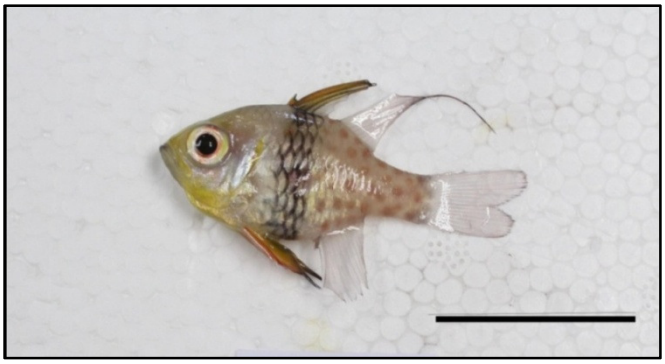
เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ย 8 เซนติเมตร ลำตัวมีสีสันน้อย มีแถบสีน้ำตาลเข้มพาดเฉียงผ่านกลางลำตัวตามแนวขวางแบ่งลำตัวเป็นครึ่งหัวและครึ่งหาง โดยบริเวณครึ่งส่วนหัวและครึ่งหางมีสีเดียวกัน แต่ส่วนบริเวณหางจะมีจุดสีน้ำตาลเข้มกระจายอยู่ทั่ว มีครีบหลังแบ่งเป็น 2 ส่วน ครีบหลังส่วนหน้ามีลักษณะเป็นก้านครีบแข็ง V ก้าน ครีบหลังส่วนหลังเป็นก้านครีบแข็ง I ก้านก้านครีบอ่อน 8 ก้าน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง II ก้าน และก้านครีบอ่อน 9 ก้าน ครีบท้องมีก้านครีบแข็ง I ก้าน ก้านครีบอ่อน 5 ก้าน มีตากลมโตสีออกฟ้า (ภาพที่ 4-2)

ภาพที่ 4-2 ลักษณะปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis* (Cuvier, 1828)) สเกลบาร์ 3 เซนติเมตร

3. ปลาอมไข่ตาแดง (Sphaeramia nematoptera **(Bleeker, 1856)***)*

ลักษณะทั่วไป

เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ย 8 เซนติเมตร ลำตัวมีสีสัน มีแถบสีดำพาดผ่านกลางลำตัวตามแนวขวางแบ่งลำตัวเป็นครึ่งหัวและครึ่งหาง โดยบริเวณครึ่งส่วนหัวมีสีน้ำตาลเหลือง ส่วนบริเวณหางเป็นสีอ่อนมีจุดสีน้ำตาลกระจายอยู่ทั่ว มีครีบหลังแบ่งเป็น 2 ส่วน ครีบหลังส่วนหน้ามีลักษณะเป็นก้านครีบแข็ง VII ก้าน ครีบหลังส่วนหลังเป็นก้านครีบแข็ง I ก้านก้านครีบอ่อน 9 ก้าน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง II ก้าน และก้านครีบอ่อน 8 ก้าน ครีบท้องมีก้านครีบแข็ง I ก้าน ก้านครีบอ่อน 5 ก้าน มีตากลมโตสีออกแดง (ภาพที่ 4-3)

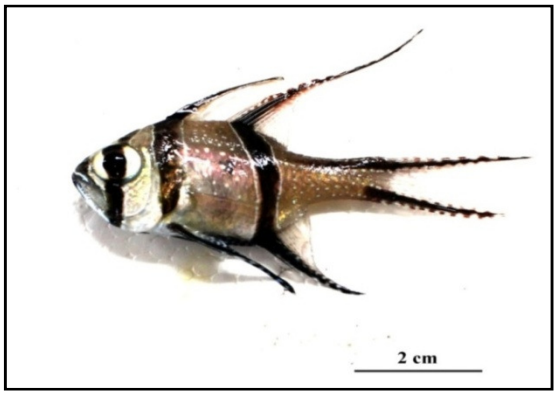


ภาพที่ 4-3 ลักษณะปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera* (Bleeker, 1856)) สเกลบาร์ 3 เซนติเมตร

4. ปลาอมไข่ครีบยาว (Pterapogon kauderni* Kaumans, 1933*)

ลักษณะทั่วไป

เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ย 8 เซนติเมตร ลำตัวมีสีขาวเงิน มีแถบสีดำพาดขวางผ่านลำตัว 3 แถบ คือ ที่ตา ที่ครีบหลังอันที่ 1 และครีบหลังอันที่ 2 มีแถบดำตามความยาวของครีบหลัง ครีบก้น และครีบหางทั้งด้านบนและด้านล่าง มีจุดสีขาวกระจายทั่วลำตัวและครีบต่าง ๆ ยกเว้นครีบอก มีครีบหลังแบ่งออกเป็น 2 ส่วนจากกันชัดเจนและมีครีบที่ยาวมาก มีก้านครีบแข็ง VIII ก้าน ก้านครีบอ่อน 14 ก้าน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง II ก้าน และก้านครีบอ่อน 13 ก้าน ครีบท้องมีก้านครีบแข็ง I ก้านครีบอ่อน 10 ก้าน ครีบหางยาวเป็นรูปส้อมชัดเจน (ภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-4 ลักษณะปลาอมไข่ครีบยาว ***(Pterapogon kauderni* Kaumans, 1933*)*** สเกลบาร์ 2 เซนติเมตร

จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (diploid number, 2*n*) และโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number, NF) ของปลาอมไข่

ปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาแดง ปลาอมไข่ตาฟ้า และปลาอมไข่ครีบยาวใน การศึกษาครั้งนี้ พบว่าเป็นรายงานครั้งแรก (first report) ของการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ใน ปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาว ผลการศึกษาพบว่าปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 46 แท่ง ทั้งหมด แต่มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานแตกต่างกัน ดังนี้ปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาฟ้า ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาว มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 54, 68, 74 และ 92 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-1) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย และปลาทั้ง 4 ชนิดพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างโครโมโซมปลาเพศผู้และเพศเมีย

ชนิดและขนาดของโครโมโซมของปลาอมไข่

1. ปลาอมไข่ตาดำ

โครโมโซมของปลาอมไข่ตาดำประกอบด้วยโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 8 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 12 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 24 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง (ตารางที่ 4-1) โดยโครโมโซมขนาดใหญ่มีความยาวมากกว่า 1.160 ไมโครเมตร โครโมโซมขนาดกลางมีความยาวระหว่าง 0.793 ถึง 1.160 ไมโครเมตร และโครโมโซมขนาดเล็กมีความยาวน้อยกว่า 0.793 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4-2)

2. ปลาอมไข่ตาฟ้า

โครโมโซมของปลาอมไข่ตาฟ้าประกอบด้วยโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 8 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 12 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 12 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 10 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง (ตารางที่ 4-1) โดยโครโมโซมขนาดใหญ่มีความยาวมากกว่า 1.373 ไมโครเมตร โครโมโซมขนาดกลางมีความยาวระหว่าง 0.919 ถึง 1.373 ไมโครเมตร และโครโมโซมขนาดเล็กมีความยาวน้อยกว่า 0.919 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4-3)

3. ปลาอมไข่ตาแดง

โครโมโซมของปลาอมไข่ตาแดงประกอบด้วยโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 10 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 10 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 4 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 12 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง (ตารางที่ 4-1) โดยโครโมโซมขนาดใหญ่มีความยาวมากกว่า 1.062

ไมโครเมตร โครโมโซมขนาดกลางมีความยาวระหว่าง 0.722 ถึง 1.062 ไมโครเมตร และโครโมโซมขนาดเล็กมีความยาวน้อยกว่า 0.722 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4-4)

4. ปลาอมไข่ครีบยาว

โครโมโซมของปลาอมไข่ครีบยาวประกอบด้วยโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 14 แท่ง และอะโครเซนทริกขนาดกลาง 22 แท่ง (ตารางที่ 4-1) โดยโครโมโซมขนาดใหญ่มีความยาวมากกว่า 1.592 ไมโครเมตร โครโมโซมขนาดกลางมีความยาวระหว่าง 1.002 ถึง 1.592 (ตารางที่ 4-5)

ตารางที่ 4-1 ข้อมูลพันธุศาสตร์เซลล์ปลาอมไข่ 4 ชนิด

ชนิดปลา	2*n*	NF	โครโมโซมขนาดใหญ่			โครโมโซมขนาดกลาง				โครโมโซมขนาดเล็ก
			sm	a	t	m	sm	a	t	t
ปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*)	46	54		8	12				24	2
ปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*)	46	68	8	12	12			2	10	2
ปลาอมไข่ตาแดง (*S. nematotera*)	46	74	10	10	4		4	4	12	2
ปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*)	46	92		6		4	14	22		

ตารางที่ 4-2 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (total length; LT), ค่าความยาวสัมพัทธ์ (relative length; RL), ค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (centromeric index; CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (CI±SD), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความยาวสัมพัทธ์ (RL±SD), ชนิด และขนาดของโครโมโซมแต่ละคู่ของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) เพศผู้และเพศเมียจำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL±SD	CI±SD	ชนิด	ขนาด
1	0.333	1.054	1.388	0.0268±0.0017	0.753±0.049	อะโครเซนทริก	ใหญ่
2*	0.305	0.996	1.301	0.0254±0.0020	0.761±0.033	อะโครเซนทริก	ใหญ่
3	0.307	0.951	1.258	0.0243±0.0013	0.753±0.033	อะโครเซนทริก	ใหญ่
4	0.296	0.870	1.166	0.0225±0.0015	0.743±0.035	อะโครเซนทริก	ใหญ่
5	0.000	1.585	1.585	0.0307±0.0025	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	ใหญ่
6	0.000	1.347	1.347	0.0260±0.0011	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	ใหญ่
7	0.000	1.275	1.275	0.0246±0.0009	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	ใหญ่
8	0.000	1.231	1.231	0.0238±0.0007	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	ใหญ่
9	0.000	1.201	1.201	0.0232±0.0008	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	ใหญ่
10	0.000	1.178	1.178	0.0227±0.0007	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	ใหญ่
11	0.000	1.157	1.157	0.0223±0.0006	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
12	0.000	1.134	1.134	0.0219±0.0006	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
13	0.000	1.112	1.112	0.0215±0.0004	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
14	0.000	1.090	1.090	0.0211±0.0004	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
15	0.000	1.072	1.072	0.0207±0.0005	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
16	0.000	1.050	1.050	0.0203±0.0004	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
17	0.000	1.026	1.026	0.0198±0.0005	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
18	0.000	0.981	0.981	0.0190±0.0008	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
19	0.000	0.945	0.945	0.0183±0.0007	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
20	0.000	0.911	0.911	0.0177±0.0008	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
21	0.000	0.875	0.875	0.0170±0.0010	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
22	0.000	0.828	0.828	0.0161±0.0011	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
23	0.000	0.734	0.734	0.0144±0.0021	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	เล็ก

ตารางที่ 4-3 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมต่อคู่ (total length; LT), ค่าความยาวสัมพัทธ์ (relative length; RL), ค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (centromeric index; CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (CI±SD), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความยาวสัมพัทธ์ (RL±SD), ชนิด และขนาดของโครโมโซมแต่ละคู่ของปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL±SD	CI±SD	ชนิด	ขนาด
1	0.563	1.275	1.838	0.0281±0.0028	0.694±0.039	ซับเมทาเซนทริก	ใหญ่
2	0.606	1.114	1.720	0.0263±0.0032	0.646±0.034	ซับเมทาเซนทริก	ใหญ่
3	0.526	0.979	1.505	0.0230±0.0014	0.651±0.031	ซับเมทาเซนทริก	ใหญ่
4	0.480	0.903	1.384	0.0211±0.0012	0.653±0.032	ซับเมทาเซนทริก	ใหญ่
5	0.471	1.178	1.650	0.0251±0.0015	0.714±0.036	อะโครเซนทริก	ใหญ่
6	0.428	1.142	1.571	0.0239±0.0013	0.725±0.033	อะโครเซนทริก	ใหญ่
7*	0.437	1.086	1.523	0.0233±0.0020	0.715±0.044	อะโครเซนทริก	ใหญ่
8	0.445	1.077	1.522	0.0232±0.0011	0.708±0.030	อะโครเซนทริก	ใหญ่
9	0.425	1.043	1.467	0.0224±0.0010	0.710±0.027	อะโครเซนทริก	ใหญ่
10	0.405	1.006	1.411	0.0215±0.0009	0.713±0.041	อะโครเซนทริก	ใหญ่
11	0.370	0.927	1.297	0.0198±0.0011	0.714±0.022	อะโครเซนทริก	กลาง
12	0.000	1.634	1.634	0.0249±0.0011	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	ใหญ่
13	0.000	1.552	1.552	0.0236±0.0010	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	ใหญ่
14	0.000	1.483	1.483	0.0226±0.0005	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	ใหญ่
15	0.000	1.437	1.437	0.0219±0.0007	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	ใหญ่
16	0.000	1.409	1.409	0.0215±0.0008	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	ใหญ่
17	0.000	1.373	1.373	0.0209±0.0008	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
18	0.000	1.312	1.312	0.0200±0.0009	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
19	0.000	1.274	1.274	0.0194±0.0012	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
20	0.000	1.229	1.229	0.0188±0.0014	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
21	0.000	1.158	1.158	0.0177±0.0015	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
22	0.000	1.100	1.100	0.0168±0.0014	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
23	0.000	0.908	0.908	0.0139±0.0019	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	เล็ก

ตารางที่ 4-4 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (total length; LT), ค่าความยาวสัมพัทธ์ (relative length; RL), ค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (centromeric index; CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (CI±SD), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความยาวสัมพัทธ์ (RL±SD), ชนิด และขนาดของโครโมโซมแต่ละคู่ของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL±SD	CI±SD	ชนิด	ขนาด
1	0.504	0.939	1.444	0.0297±0.0025	0.652±0.035	ซับเมทาเซนทริก	ใหญ่
2	0.430	0.816	1.247	0.0256±0.0020	0.655±0.034	ซับเมทาเซนทริก	ใหญ่
3	0.398	0.769	1.167	0.0239±0.0015	0.657±0.029	ซับเมทาเซนทริก	ใหญ่
4	0.363	0.748	1.111	0.0228±0.0010	0.672±0.021	ซับเมทาเซนทริก	ใหญ่
5	0.365	0.712	1.077	0.0221±0.0010	0.661±0.029	ซับเมทาเซนทริก	ใหญ่
6	0.346	0.691	1.037	0.0213±0.0010	0.665±0.029	ซับเมทาเซนทริก	กลาง
7	0.324	0.645	0.970	0.0199±0.0012	0.665±0.022	ซับเมทาเซนทริก	กลาง
8	0.369	0.911	1.280	0.0263±0.0018	0.712±0.021	อะโครเซนทริก	ใหญ่
9	0.340	0.861	1.201	0.0246±0.0014	0.717±0.021	อะโครเซนทริก	ใหญ่
10*	0.358	0.826	1.184	0.0243±0.0022	0.701±0.030	อะโครเซนทริก	ใหญ่
11	0.329	0.815	1.145	0.0235±0.0010	0.712±0.026	อะโครเซนทริก	ใหญ่
12	0.317	0.784	1.101	0.0226±0.0010	0.712±0.025	อะโครเซนทริก	ใหญ่
13	0.297	0.747	1.044	0.0214±0.0012	0.715±0.025	อะโครเซนทริก	กลาง
14	0.285	0.685	0.970	0.0199±0.0017	0.707±0.022	อะโครเซนทริก	กลาง
15	0.000	1.148	1.148	0.0235±0.0014	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	ใหญ่
16	0.000	1.070	1.070	0.0219±0.0013	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	ใหญ่
17	0.000	1.023	1.023	0.0209±0.0009	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
18	0.000	0.972	0.972	0.0199±0.0010	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
19	0.000	0.937	0.937	0.0192±0.0010	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
20	0.000	0.900	0.900	0.0184±0.0011	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
21	0.000	0.864	0.864	0.0177±0.0014	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
22	0.000	0.811	0.811	0.0167±0.0012	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	กลาง
23	0.000	0.681	0.681	0.0140±0.0017	1.000±0.000	เทโลเซนทริก	เล็ก

ตารางที่ 4-5 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls), ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (total length; LT), ค่าความยาวสัมพัทธ์ (relative length; RL), ค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (centromeric index; CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าดัชนีเซนโทเมียร์ (CI±SD), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความยาวสัมพัทธ์ (RL±SD), ชนิด และขนาดของโครโมโซมแต่ละคู่ของปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL±SD	CI±SD	ชนิด	ขนาด
1	0.700	0.801	1.501	0.0230±0.0016	0.535±0.016	เมทาเซนทริก	กลาง
2	0.613	0.705	1.318	0.0201±0.0015	0.535±0.033	เมทาเซนทริก	กลาง
3	0.523	1.022	1.545	0.0235±0.0015	0.660±0.030	ซับเมทาเซนทริก	กลาง
4	0.465	0.974	1.439	0.0219±0.0008	0.674±0.032	ซับเมทาเซนทริก	กลาง
5	0.422	0.982	1.404	0.0214±0.0005	0.696±0.038	ซับเมทาเซนทริก	กลาง
6	0.450	0.939	1.389	0.0212±0.0006	0.675±0.036	ซับเมทาเซนทริก	กลาง
7	0.423	0.891	1.315	0.0200±0.0007	0.675±0.048	ซับเมทาเซนทริก	กลาง
8	0.418	0.842	1.261	0.0192±0.0008	0.667±0.022	ซับเมทาเซนทริก	กลาง
9	0.392	0.787	1.179	0.0180±0.0010	0.667±0.032	ซับเมทาเซนทริก	กลาง
10	0.548	1.456	2.004	0.0306±0.0020	0.724±0.024	อะโครเซนทริก	ใหญ่
11	0.448	1.147	1.596	0.0243±0.0013	0.715±0.020	อะโครเซนทริก	ใหญ่
12	0.402	1.191	1.594	0.0244±0.0010	0.745±0.055	อะโครเซนทริก	ใหญ่
13*	0.442	1.142	1.584	0.0241±0.0026	0.722±0.030	อะโครเซนทริก	กลาง
14	0.414	1.102	1.516	0.0231±0.0007	0.725±0.034	อะโครเซนทริก	กลาง
15	0.442	1.037	1.479	0.0226±0.0007	0.700±0.034	อะโครเซนทริก	กลาง
16	0.371	1.064	1.435	0.0219±0.0007	0.740±0.047	อะโครเซนทริก	กลาง
17	0.400	0.993	1.394	0.0213±0.0009	0.711±0.030	อะโครเซนทริก	กลาง
18	0.315	1.067	1.382	0.0211±0.0008	0.770±0.036	อะโครเซนทริก	กลาง
19	0.363	1.008	1.371	0.0208±0.0006	0.732±0.033	อะโครเซนทริก	กลาง
20	0.350	0.987	1.338	0.0203±0.0005	0.737±0.040	อะโครเซนทริก	กลาง
21	0.372	0.939	1.311	0.0200±0.0005	0.713±0.039	อะโครเซนทริก	กลาง
22	0.348	0.905	1.253	0.0190±0.0011	0.719±0.022	อะโครเซนทริก	กลาง
23	0.331	0.872	1.204	0.0183±0.0009	0.726±0.035	อะโครเซนทริก	กลาง

โครโมโซมเครื่องหมายของปลาอมไข่

โครโมโซมเครื่องหมาย คือ โครโมโซมที่มีเอกลักษณะเฉพาะตัวของแต่ละชนิด และมีลักษณะแตกต่างเด่นชัดที่สุดในแคริโอไทป์ จากการศึกษาโดยย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์สามารถจำแนกโครโมโซมเครื่องหมายของปลาอมไข่ได้ดังนี้ โครโมโซมจากการย้อมแบบธรรมดา จะพบโครโมโซมที่แตกต่างจากแท่งอื่นอย่างชัดเจนคือโครโมโซมคู่ที่ใหญ่และเล็กที่สุด ดังนั้นการย้อมแถบสีแบบนอร์จึงจะสามารถระบุโครโมโซมเครื่องหมายได้ชัดเจนกว่า เนื่องจากโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์คือโครโมโซมที่มีตำแหน่งของยีนสร้างไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ และมีลักษณะจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ผลการย้อมแถบสีแบบนอร์ในปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด มีดังนี้

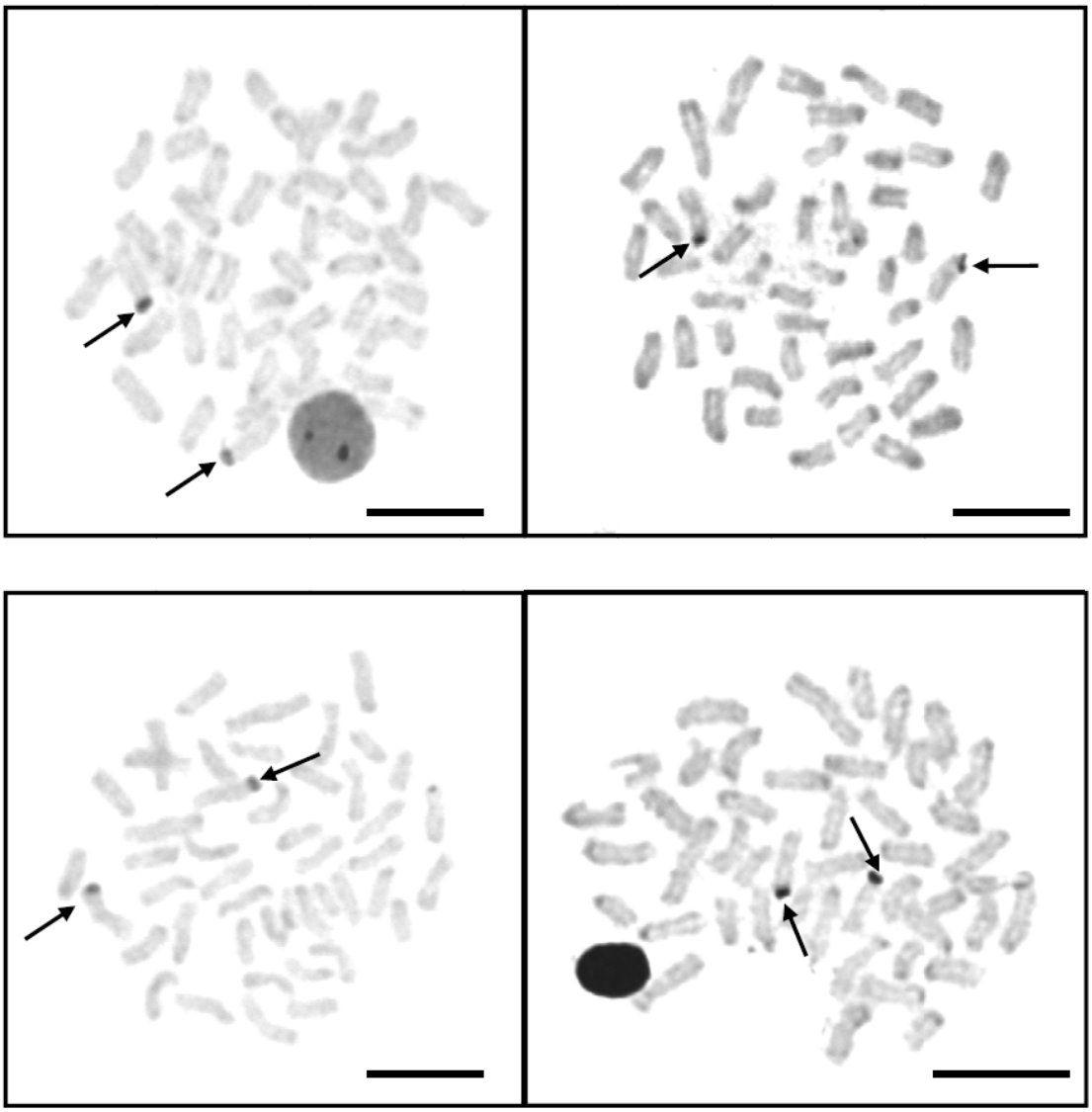
จากการย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบนอร์ พบว่าปลาอมไข่ตาดำมีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย ตำแหน่งนอร์ (NOR) อยู่บนแขนข้างสั้นใกล้กับตำแหน่งเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 2 ซึ่งเป็นชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่และไม่พบว่ามีความแตกต่างผันแปรเกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่าง (NOR polymorphism pattern) (ภาพที่ 4-5)

จากการย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบนอร์ พบว่าปลาอมไข่ตาฟ้ามีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย ตำแหน่งนอร์ (NOR) อยู่บนแขนข้างสั้นใกล้กับตำแหน่งเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 7 ซึ่งเป็นชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่คู่ที่ 3 และพบว่ามีความแตกต่างผันแปรเกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่าง กล่าวคือมีเพศผู้และเพศเมียเพศละ 2 ตัวอย่าง ที่พบตำแหน่งนอร์เพียงแท่งเดียว ดังนั้นปลาอมไข่ตาฟ้าถูกพบว่ามีโครโมโซมคู่นอร์มีการติดสีแตกต่างกัน 2 แบบ คือ มีตำแหน่งนอร์ 2 แท่ง และมีนอร์เพียงแท่งเดียว (ภาพที่ 4-6)

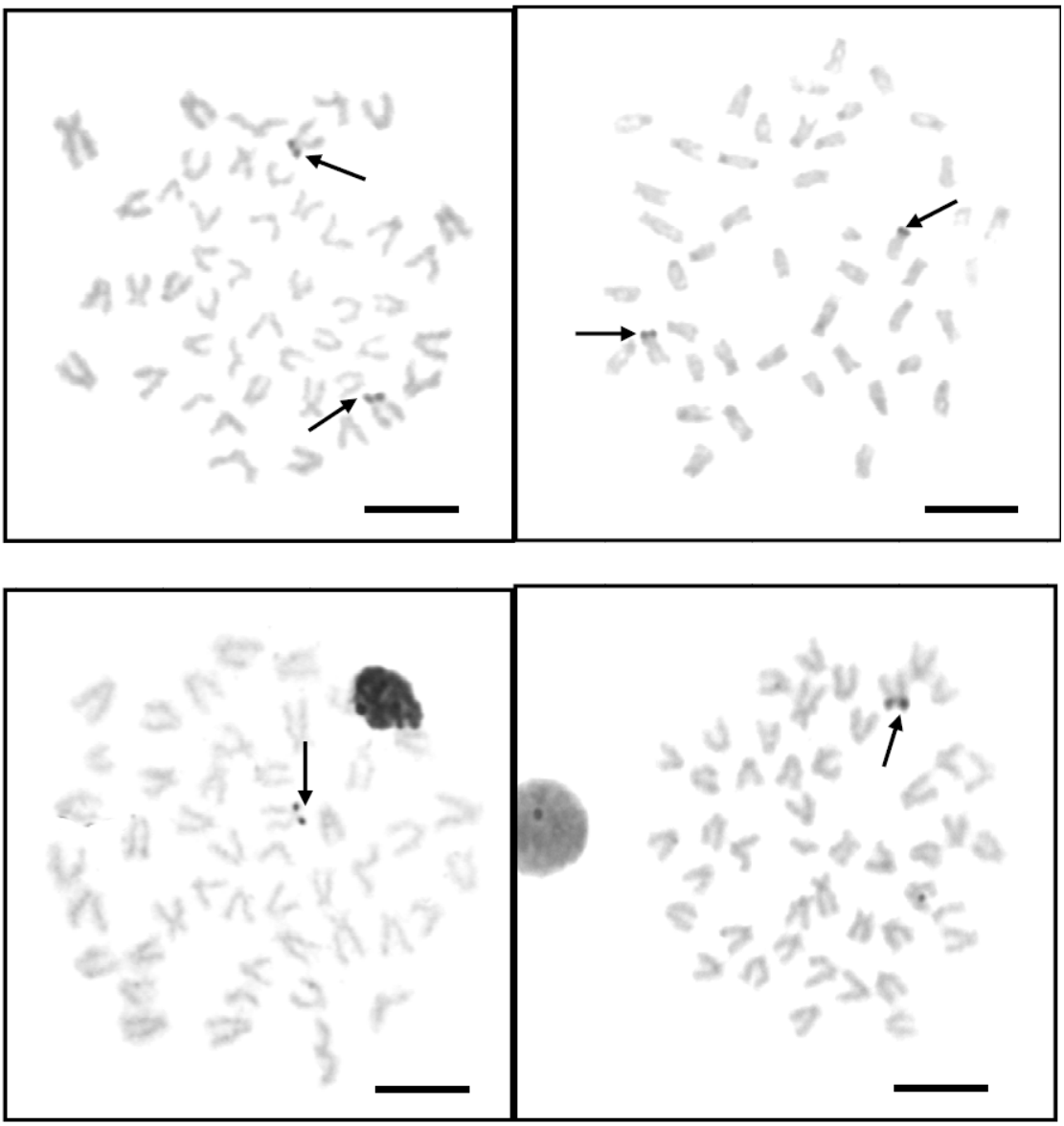
จากการย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบนอร์ พบว่าปลาอมไข่ตาแดงมีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย ตำแหน่งนอร์ (NOR) อยู่บนแขนข้างสั้นใกล้กับตำแหน่งเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 10 ซึ่งเป็นชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่คู่ที่ 3 และพบว่ามีความแตกต่างผันแปรเกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่าง กล่าวคือมีเพศผู้และเพศเมียเพศละ 2 ตัวอย่างที่พบตำแหน่งนอร์เพียงแท่งเดียว ดังนั้นปลาอมไข่ตาแดงถูกพบว่ามีโครโมโซมคู่นอร์มีการติดสีแตกต่างกัน 2 แบบ คือ มีตำแหน่งนอร์ 2 แท่ง และมีนอร์เพียงแท่งเดียว (ภาพที่ 4-7)

จากการย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบนอร์ พบว่าปลาอมไข่ครีบยาวมีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย ตำแหน่งนอร์ (NOR) อยู่บนแขนข้างสั้นใกล้กับตำแหน่งเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 13 ซึ่งเป็นชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่คู่ที่ 4 และพบว่ามีความแตกต่างผันแปรเกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่าง หมายถึงคู่นอร์นั้นมีการแสดงออกของแถบสีย้อมต่างกัน โดยปลาอมไข่ครีบยาวจะมีความแตกต่างกัน 3 แบบ ได้แก่ มีตำแหน่งนอร์สองแท่ง

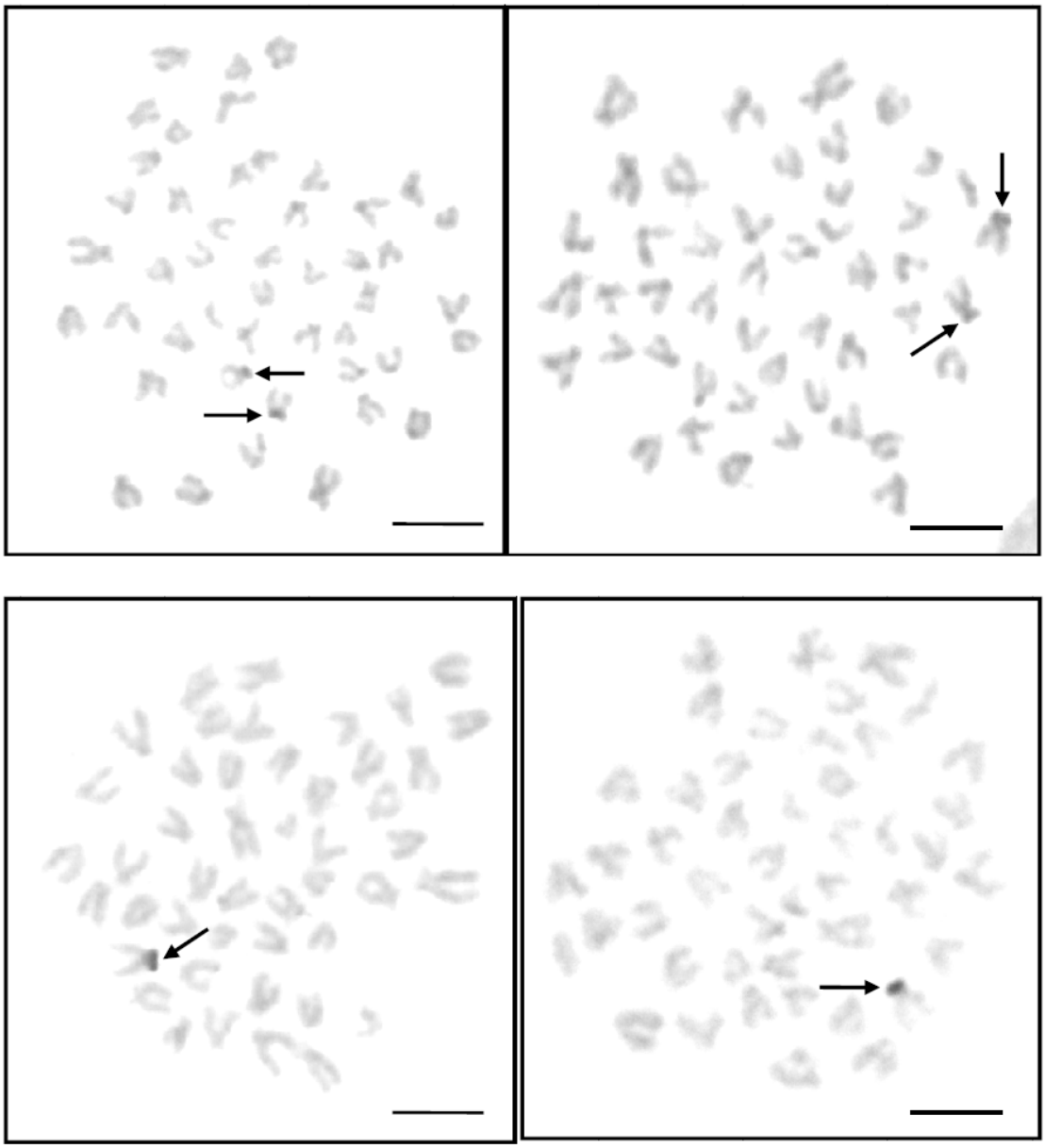
ขนาดเท่ากัน (13a13a) มีตำแหน่งนอร์สองแท่งขนาดแตกต่างกัน (13a13c) และมีตำแหน่งนอร์แท่งเดียวอีกแท่งไม่มี (13a13b) (ภาพที่ 4-8)



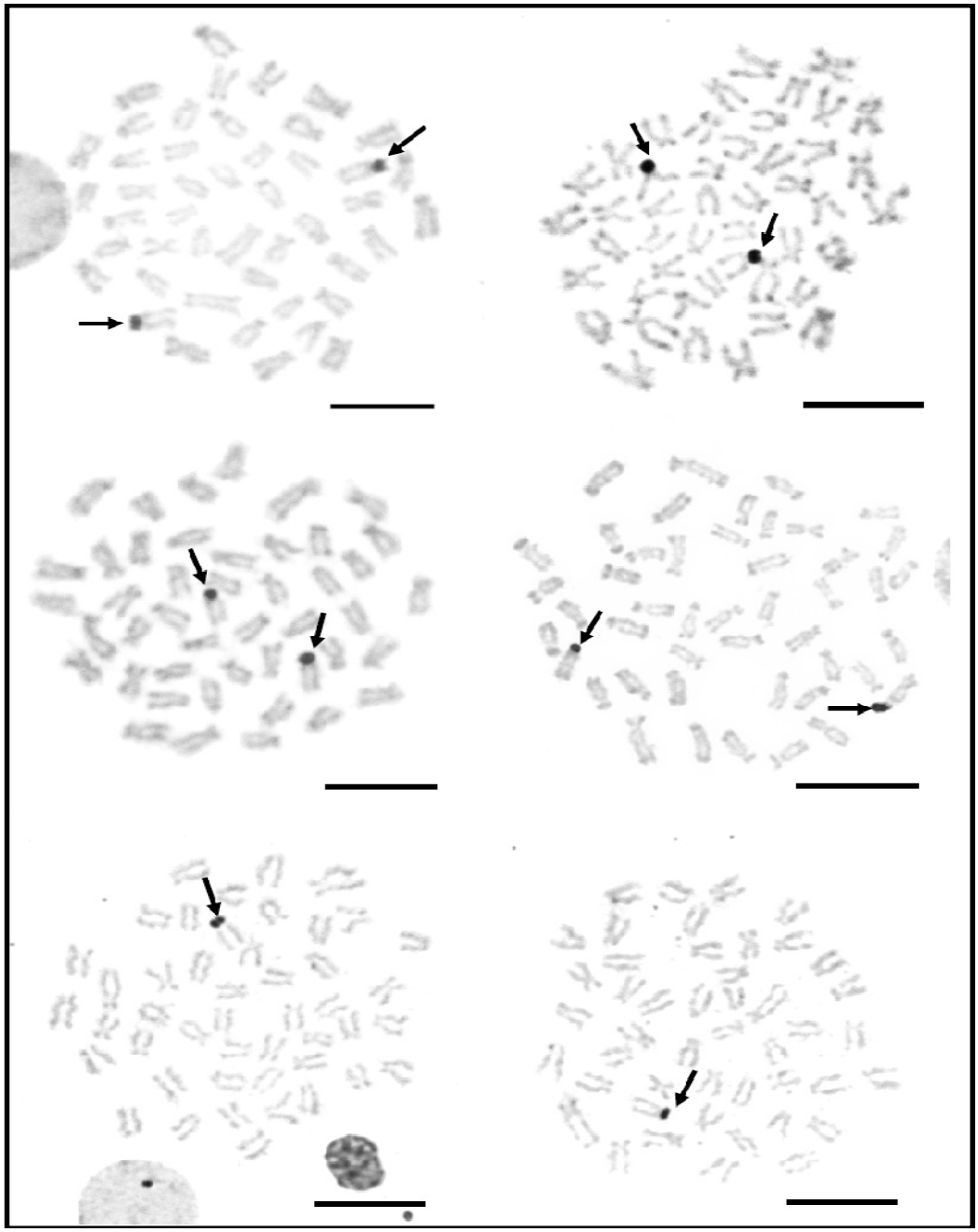
ภาพที่ 4-5 โครโมโซมเครื่องหมายของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) จากการย้อมแถบสีแบบนอร์ แสดงโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ (ลูกศรชี้) จำนวน 2 แท่ง ชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่ เพศผู้ (ภาพซ้าย) และเพศเมีย (ภาพขวา) สเกลบาร์เท่ากับ 2 ไมโครเมตร (กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100x เลนส์ใกล้ตา 10x เลนส์ใกล้กล้องถ่ายรูป 2.5x)



ภาพที่ 4-6 โครโมโซมเครื่องหมายของปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) จากการย้อมแถบสีแบบนอร์ แสดงโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ (ลูกศรชี้) จำนวน 2 แท่ง ชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่ เพศผู้ (ภาพบนซ้าย) และเพศเมีย (ภาพบนขวา) และโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 แท่ง เพศผู้ (ภาพล่างซ้าย) และเพศเมีย (ภาพล่างขวา) สเกลบาร์เท่ากับ 2 ไมโครเมตร (กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100x เลนส์ใกล้ตา 10x เลนส์ใกล้กล้องถ่ายรูป 2.5x)



ภาพที่ 4-7 โครโมโซมเครื่องหมายของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera*) จากการย้อมแถบสีแบบนอร์ แสดงโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ (ลูกศรชี้) จำนวน 2 แท่ง ชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่ เพศผู้ (ภาพบนซ้าย) และเพศเมีย (ภาพบนขวา) และโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 แท่ง เพศผู้ (ภาพล่างซ้าย) และเพศเมีย (ภาพล่างขวา) สเกลบาร์เท่ากับ 2 ไมโครเมตร (กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100x เลนส์ใกล้ตา 10x เลนส์ใกล้กล้องถ่ายรูป 2.5x)



ภาพที่ 4-8 โครโมโซมเครื่องหมายของปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) จากการย้อมแถบสีแบบนอร์ แสดงโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ (ลูกศรชี้) จำนวน 2 แท่ง ชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่ เพศผู้ (ภาพบนซ้าย) และเพศเมีย (ภาพบนขวา) และโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 แท่ง เพศผู้ (ภาพล่างซ้าย) และเพศเมีย (ภาพล่างขวา) สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร (กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100x เลนส์ใกล้ตา 10x เลนส์ใกล้กล้องถ่ายรูป 2.5x)

แคริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานของปลาอมไข่

โครโมโซมของปลาอมไข่ตาดำประกอบด้วยโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 8 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 12 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 24 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง (ภาพที่ 4-9) แสดงให้เห็นว่าปลาอมไข่ตาดำมีแคริโอไทป์แบบไม่สมมาตร (asymmetrical karyotype) มีตำแหน่งนอร์อยู่บนอยู่บนแขนข้างสั้นใกล้กับตำแหน่งเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 2 ซึ่งเป็นชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่คู่ที่ 2 (ภาพที่ 4-10) โดยมีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

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

และเมื่อนำมาเขียนอิดิโอแกรมมาตรฐานของปลาอมไข่ตาดำ จากการย้อมแถบสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์ จะได้ดังภาพที่ 4-11 และ 4-12 ตามลำดับ

โครโมโซมของปลาอมไข่ตาฟ้าประกอบด้วยโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 8 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 12 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 12 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 10 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง (ภาพที่ 4-13) แสดงให้เห็นว่าปลาอมไข่ตาฟ้ามีแคริโอไทป์แบบไม่สมมาตร มีตำแหน่งนอร์อยู่บนอยู่บนแขนข้างสั้นใกล้กับตำแหน่งเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 7 ซึ่งเป็นชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่คู่ที่ 3 (ภาพที่ 4-14) โดยมีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

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

และเมื่อนำมาเขียนอิดิโอแกรมมาตรฐานของปลาอมไข่ตาฟ้า จากการย้อมแถบสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์ จะได้ดังภาพที่ 4-15 และ 4-16 ตามลำดับ

โครโมโซมของปลาอมไข่ตาแดงประกอบด้วยโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 10 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 10 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 4 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 12 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง (ภาพที่ 4-17) แสดงให้เห็นว่าปลาอมไข่ตาแดงมีแคริโอไทป์แบบไม่สมมาตร มีตำแหน่งนอร์อยู่บนอยู่บนแขนข้างสั้นใกล้กับตำแหน่งเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 10 ซึ่งเป็นชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่คู่ที่ 3 (ภาพที่ 4-18) โดยมีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

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

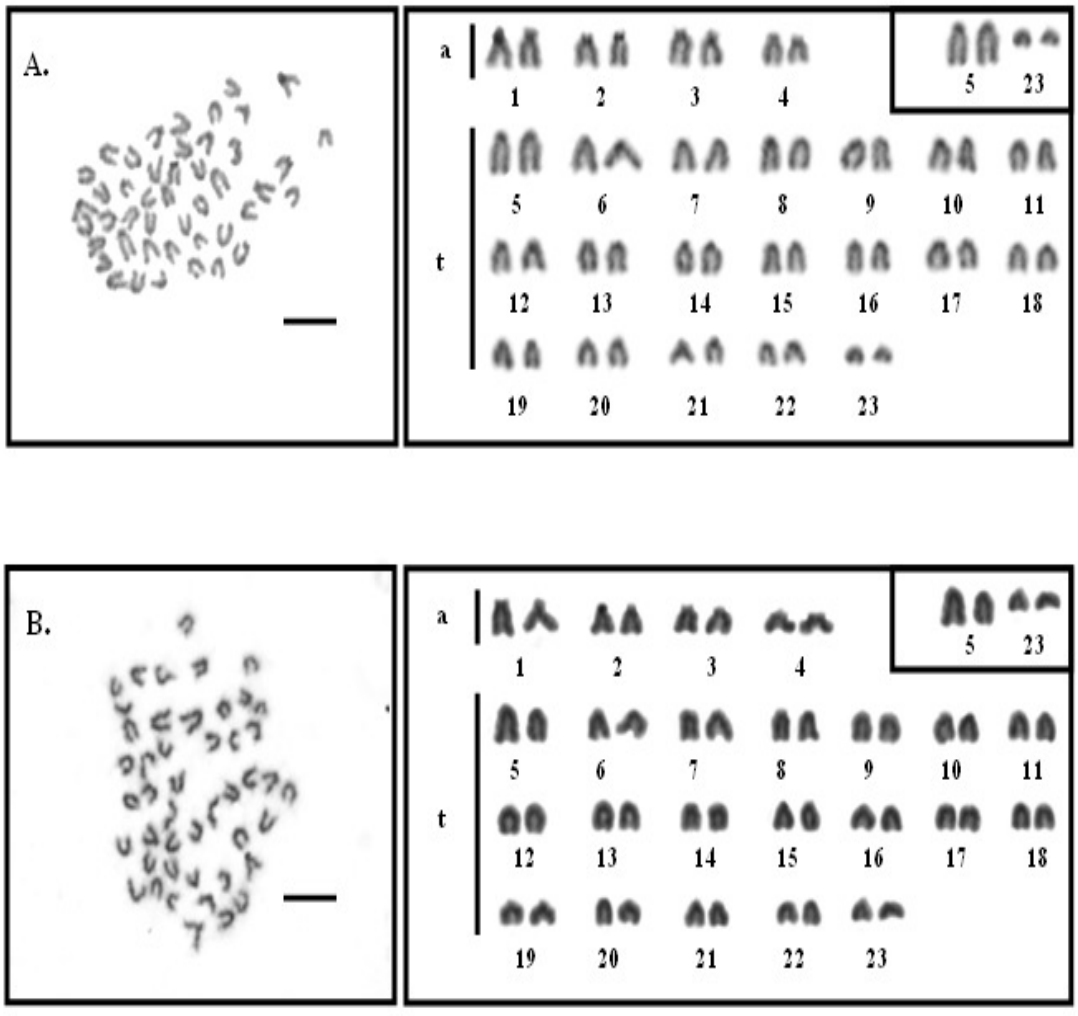
และเมื่อนำมาเขียนอิดิโอแกรมมาตรฐานของปลาอมไข่ตาแดง จากการย้อมแถบสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์ จะได้ดังภาพที่ 4-19 และ 4-20 ตามลำดับ

โครโมโซมดิพลอยด์ของปลาอมไข่ครีบยาวประกอบด้วยโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 14 แท่ง และอะโครเซนทริกขนาดกลาง 22 แท่ง (ภาพที่ 4-21) แสดงให้เห็นว่าปลาอมไข่ครีบยาวมีแคริโอไทป์

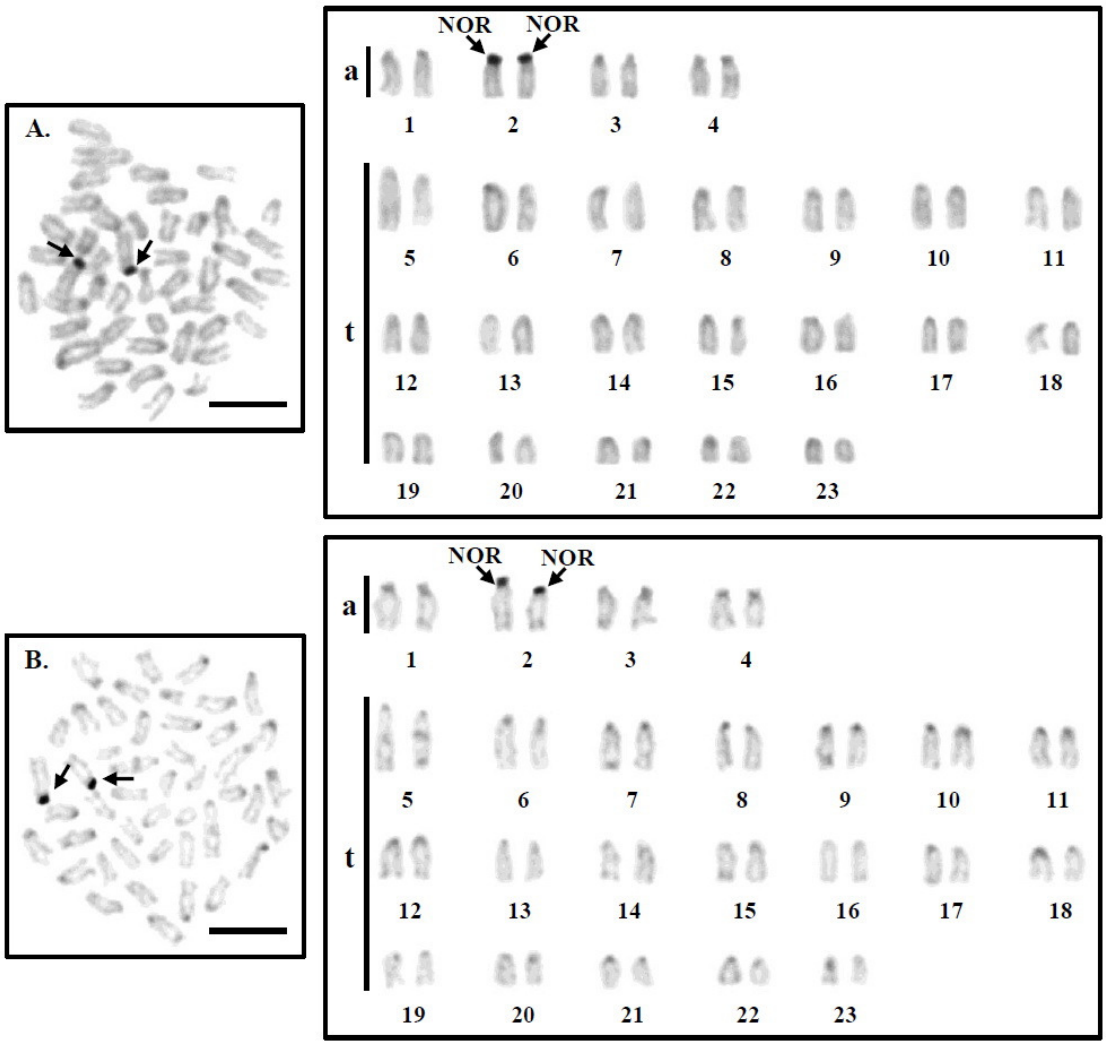
แบบไม่สมมาตร มีตำแหน่งนอร์อยู่บนอยู่บนแขนข้างสั้นใกล้กับตำแหน่งเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 13 ซึ่งเป็นชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่คู่ที่ 4 (ภาพที่ 4-22) โดยมีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

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

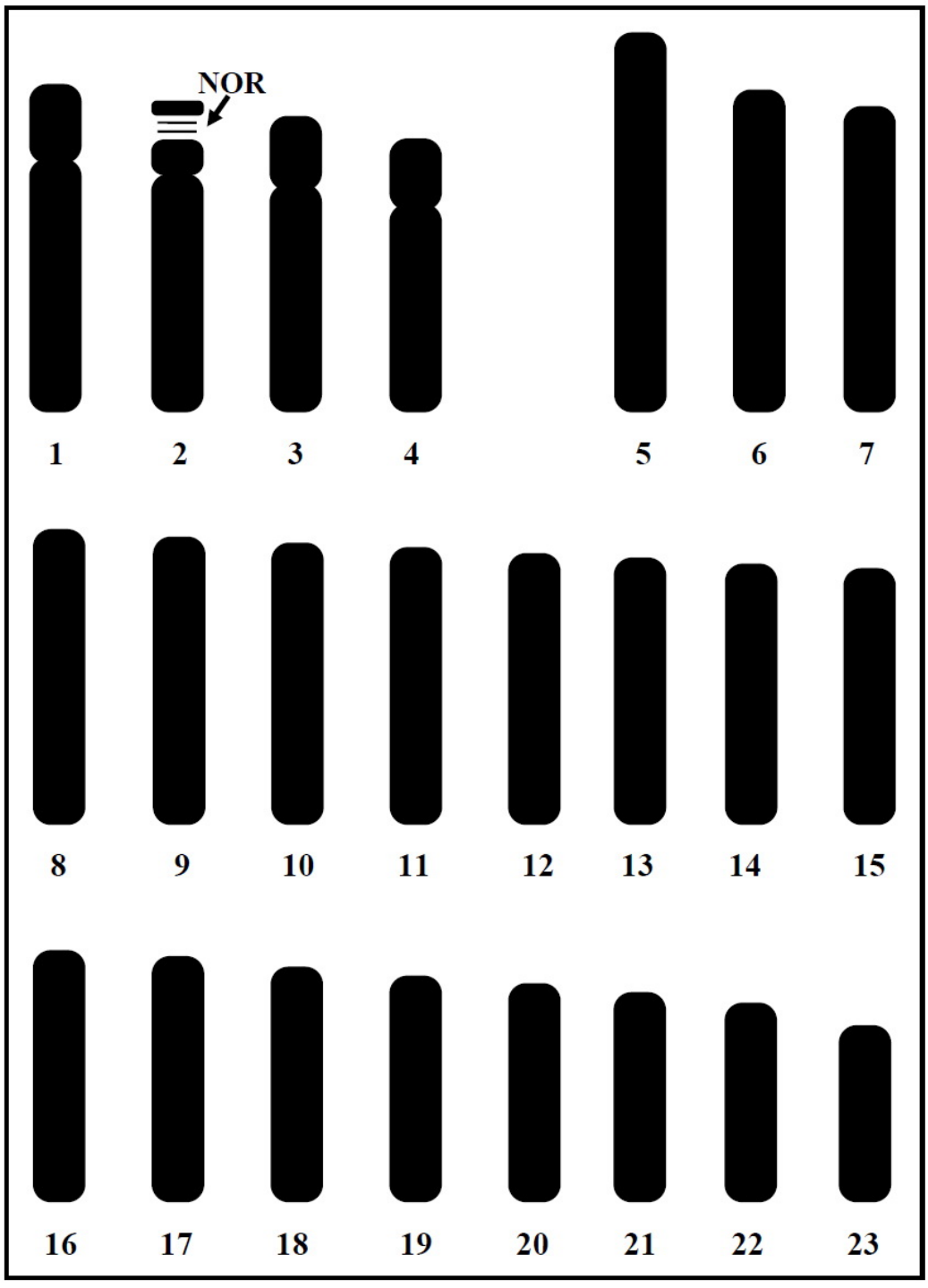
และเมื่อนำมาเขียนอิดิโอแกรมมาตรฐานของปลาอมไข่ครีบยาว จากการย้อมแถบสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์ จะได้ดังภาพที่ 4-23 และ 4-24 ตามลำดับ



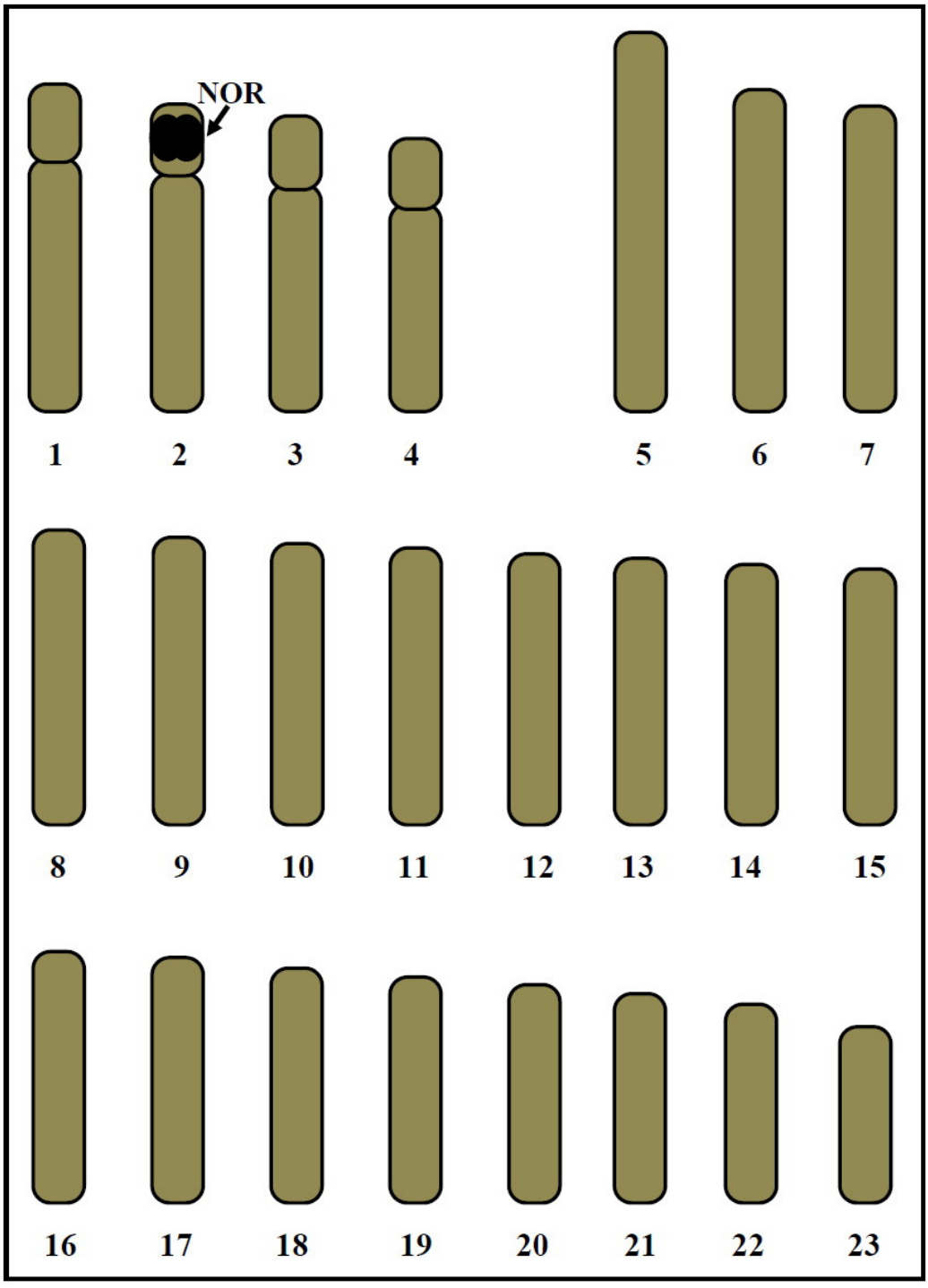
ภาพที่ 4-9 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) เพศผู้ (A.) และเพศเมีย (B.) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ($2n$=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา บริเวณกรอบสี่เหลี่ยมมุมบนขวาแสดงโครโมโซมเครื่องหมาย (สเกลบาร์ 2 ไมโครเมตร)



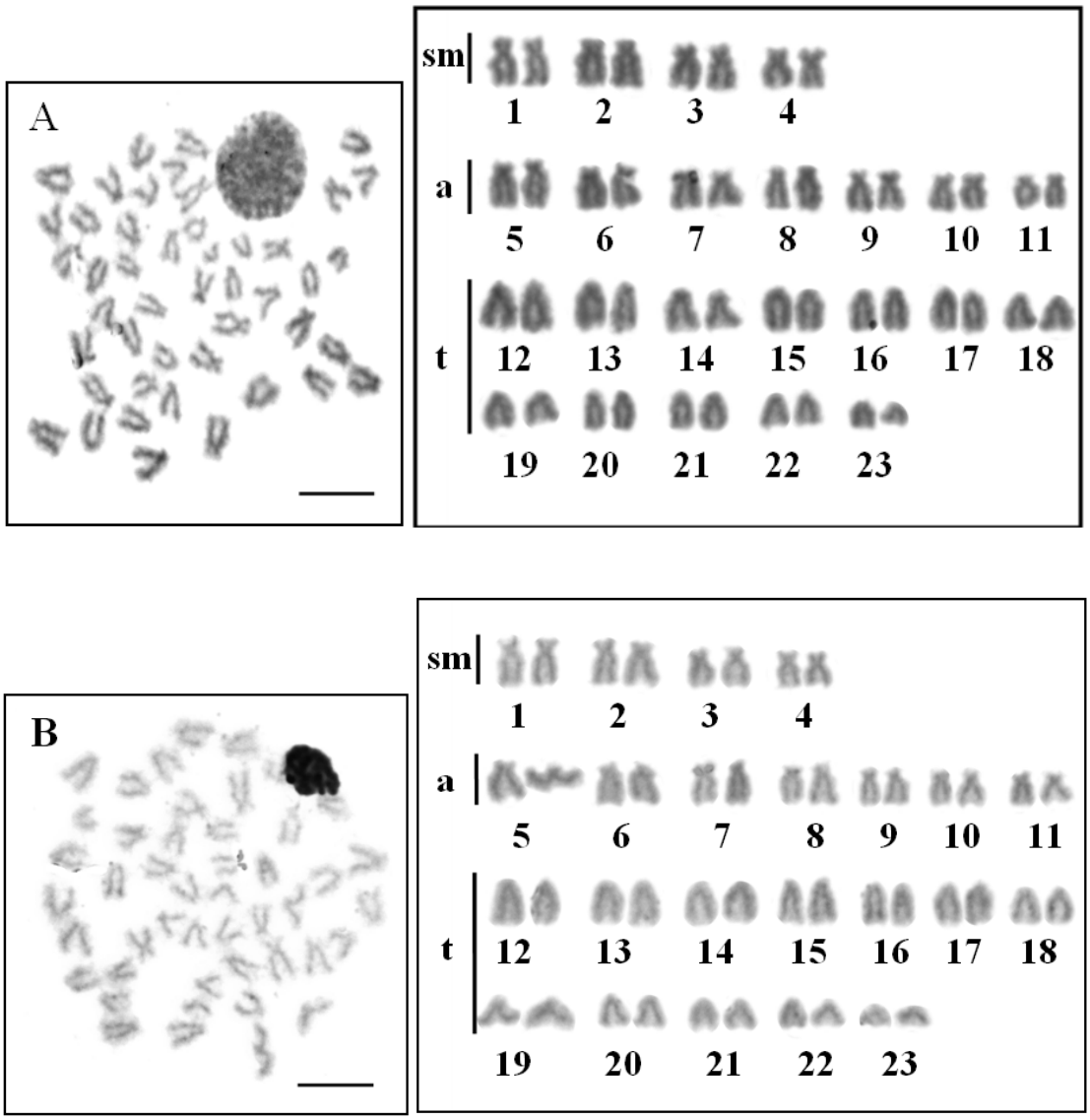
ภาพที่ 4-10 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) เพศผู้ (A.) และเพศเมีย (B.) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique) บริเวณลูกศรชี้แสดงตำแหน่ง nucleolar organizer region/NOR บนโครโมโซมคู่ที่ 2 เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย (สเกลบาร์ 2 ไมโครเมตร)



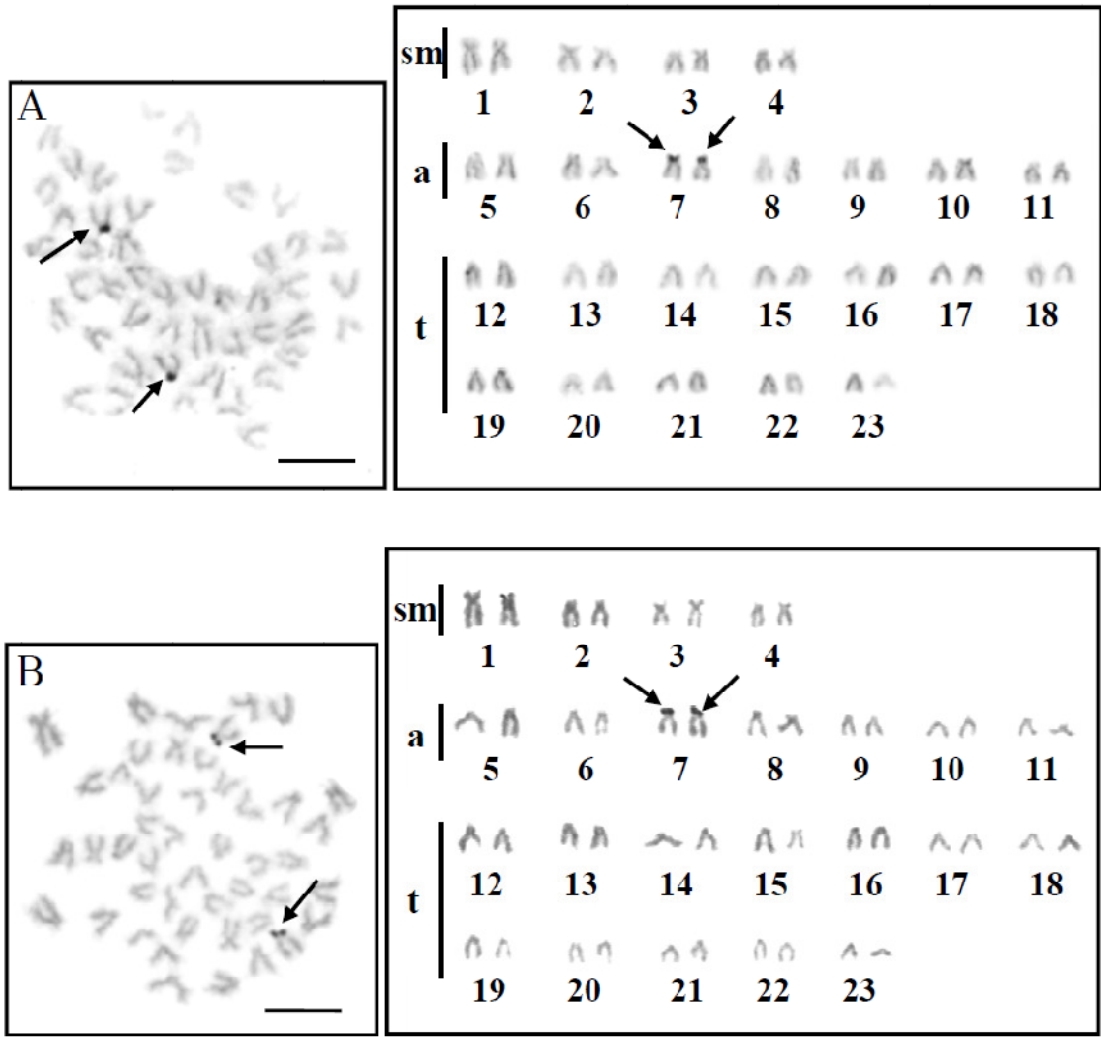
ภาพที่ 4-11 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา บริวณเลูกศรชี้แสดงตำแหน่ง nucleolar organizer region/NOR บนโครโมโซมคู่ที่ 2



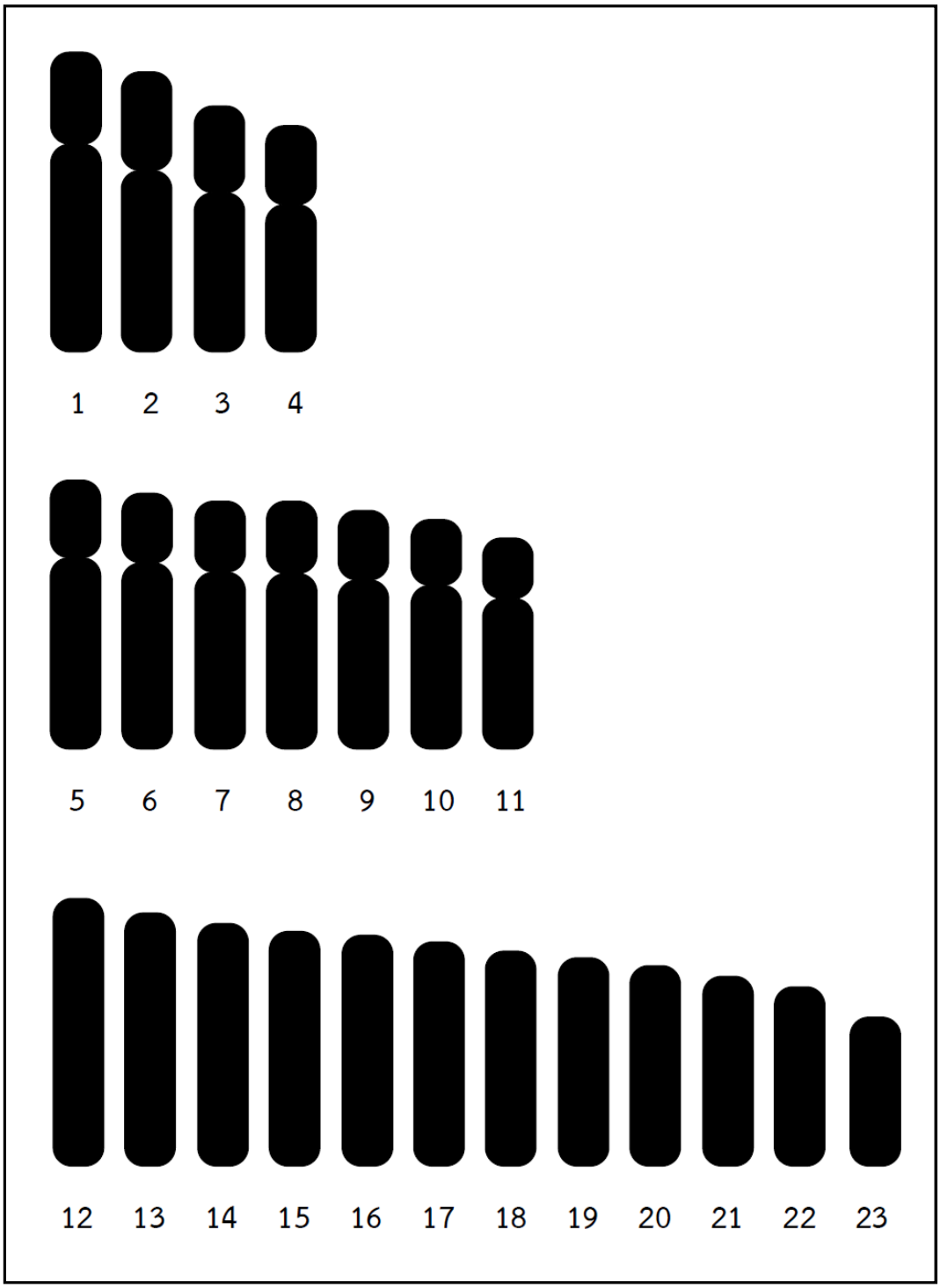
ภาพที่ 4-12 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*)มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique) บริเวณลูกศรชี้แสดงตำแหน่ง nucleolar organizer region/NOR บนโครโมโซมคู่ที่ 2



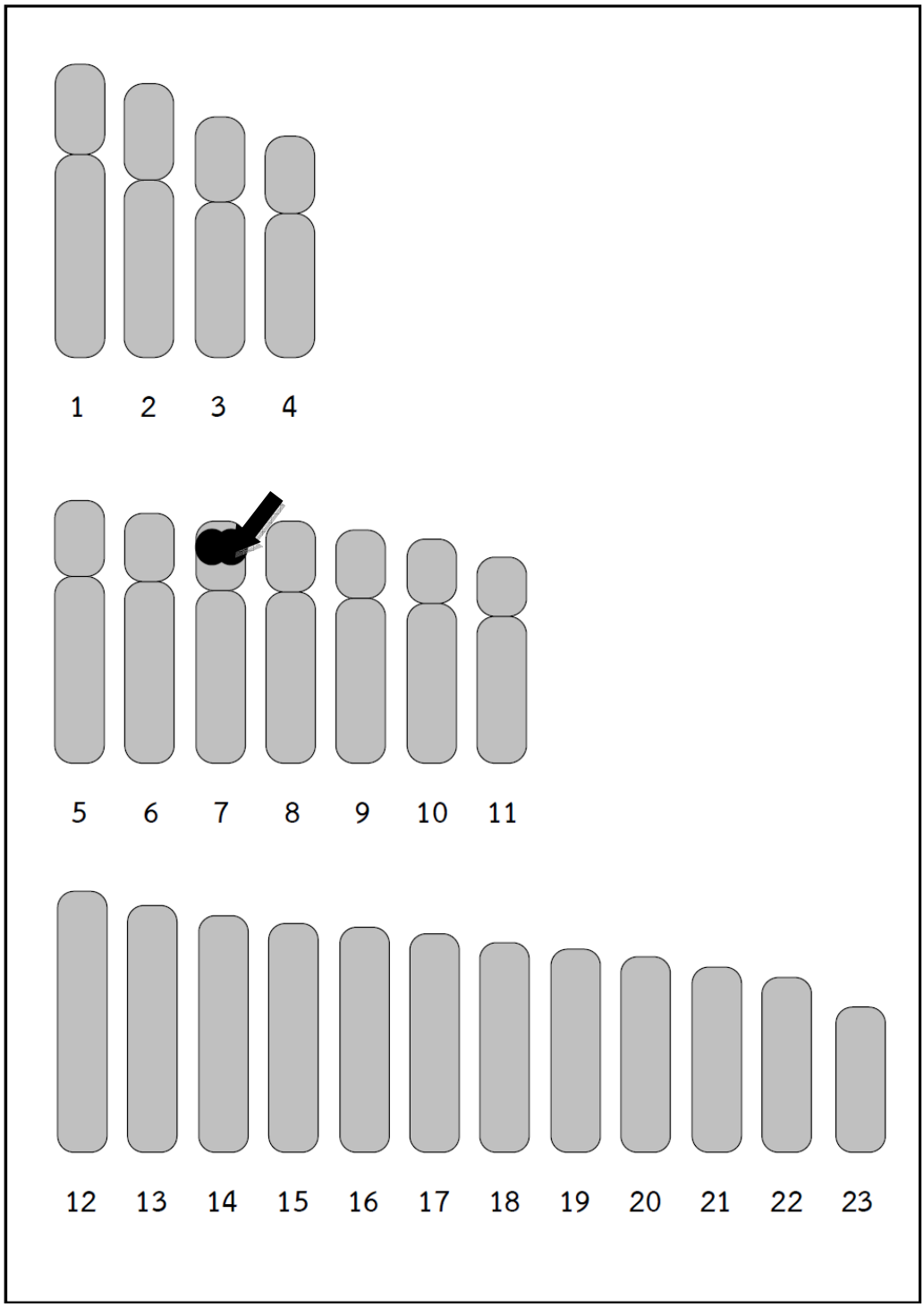
ภาพที่ 4-13 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) เพศผู้ (A) และเพศเมีย (B) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา บริเวณกรอบสี่เหลี่ยมมุมบนขวาแสดงโครโมโซม เครื่องหมาย (สเกลบาร์ 2 ไมโครเมตร)



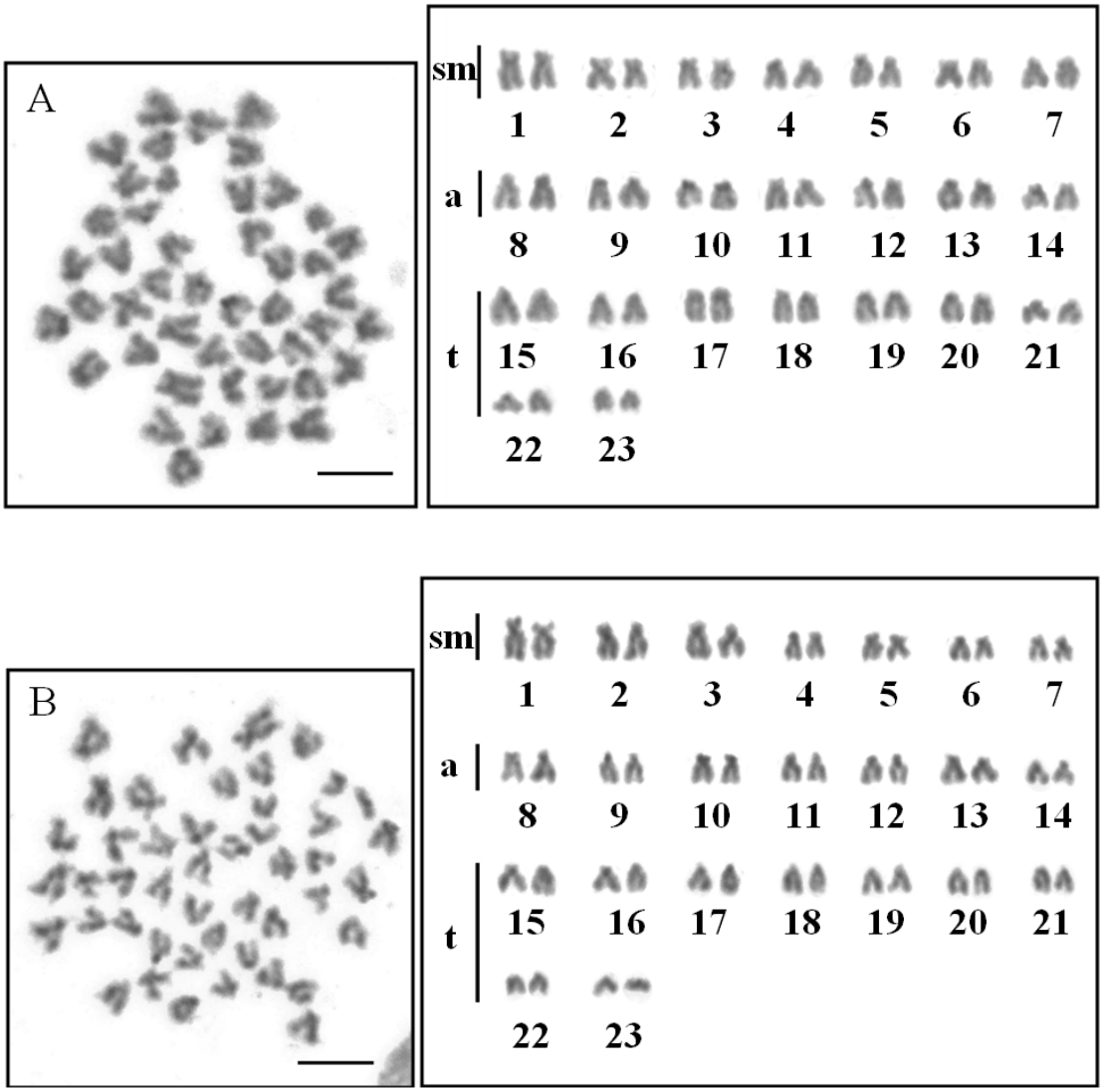
ภาพที่ 4-14 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) เพศผู้ (A) และเพศเมีย (B) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ($2n$=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique) บริเวณลูกศรชี้แสดงตำแหน่ง nucleolar organizer region/NOR บนโครโมโซมคู่ที่ 7 เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย (สเกลบาร์ 2 ไมโครเมตร)



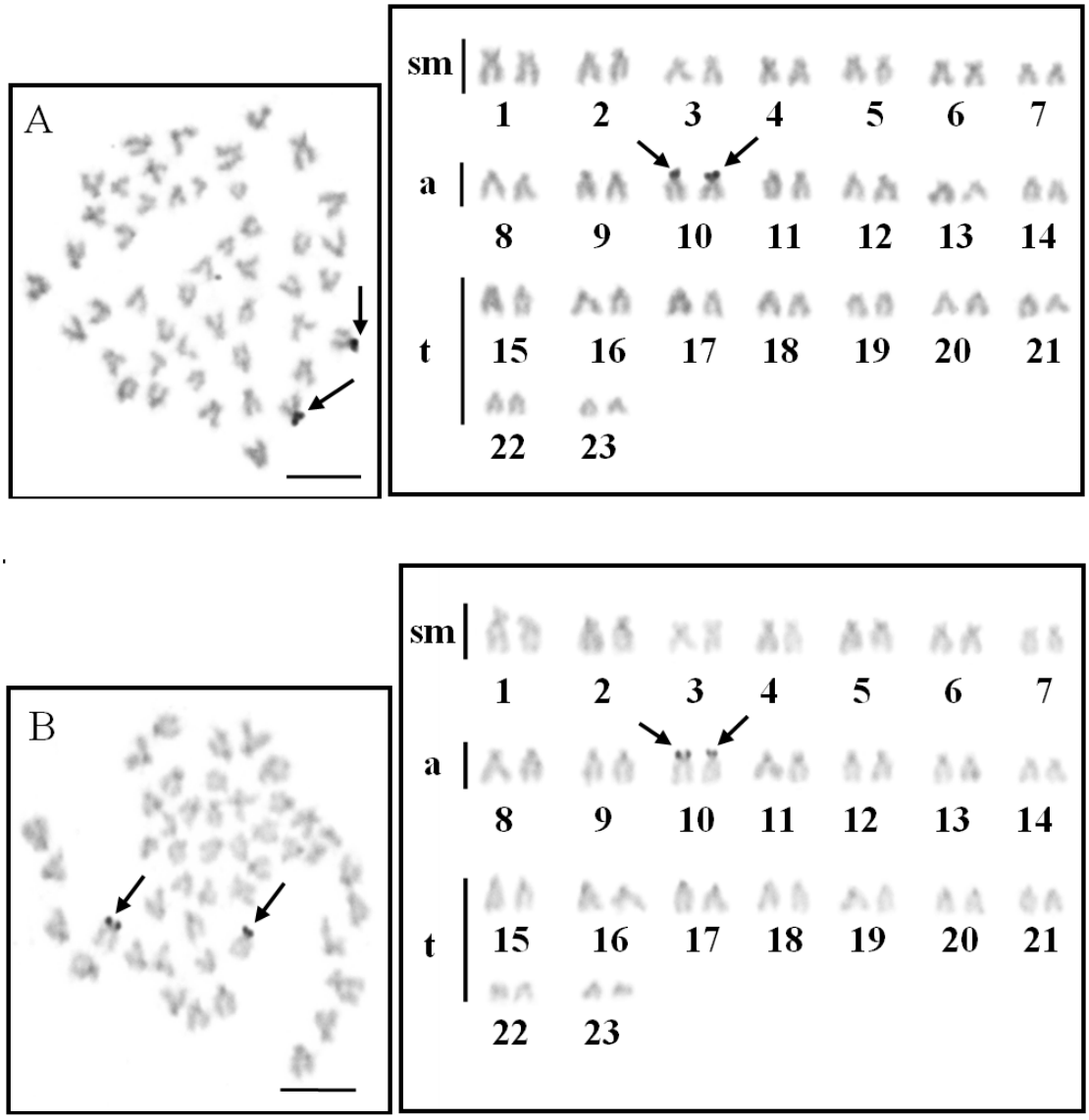
ภาพที่ 4-15 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา



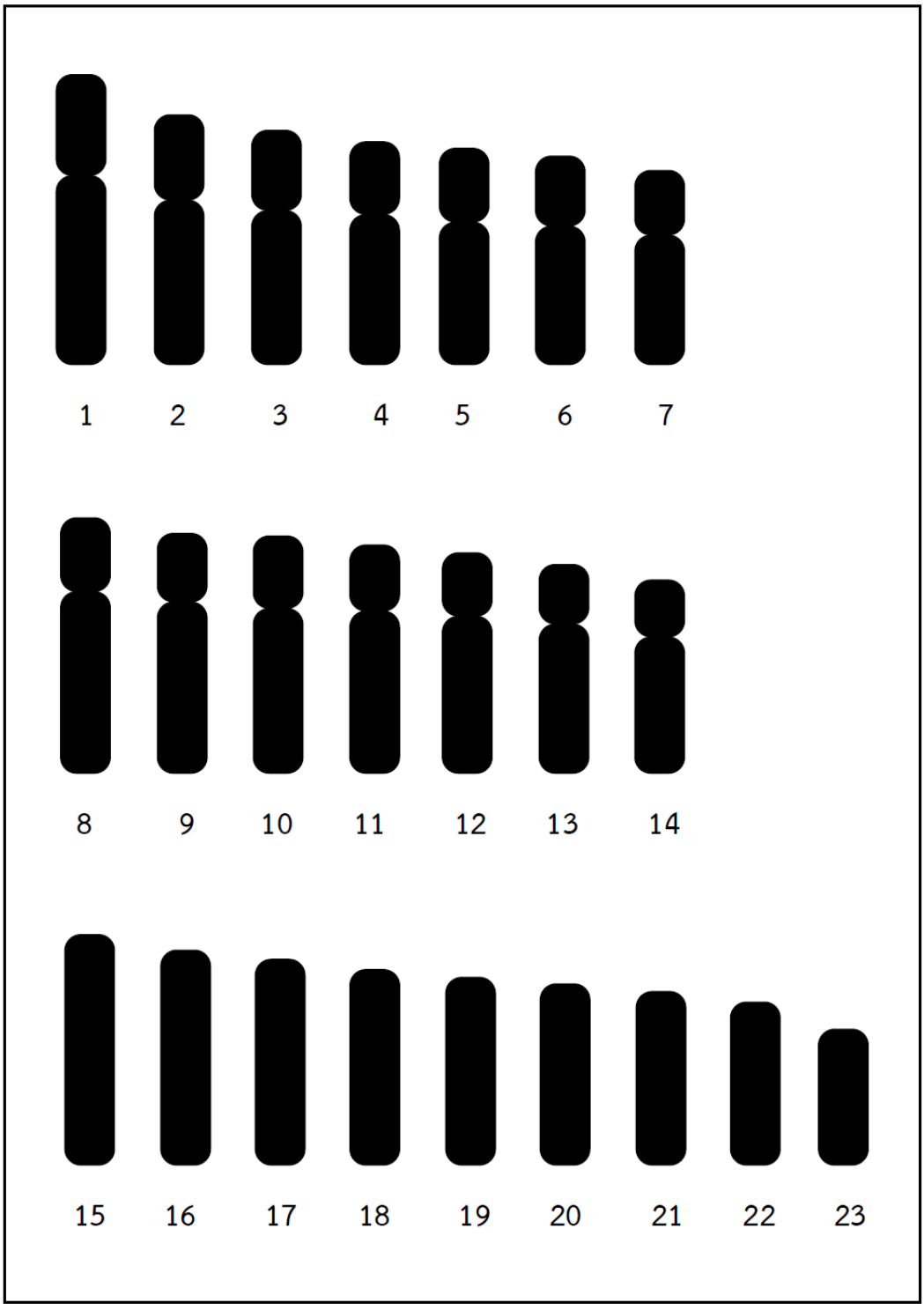
ภาพที่ 4-16 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ($2n$=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique) บริเวณลูกศรชี้แสดงตำแหน่ง nucleolar organizer region/NOR บนโครโมโซมคู่ที่ 7



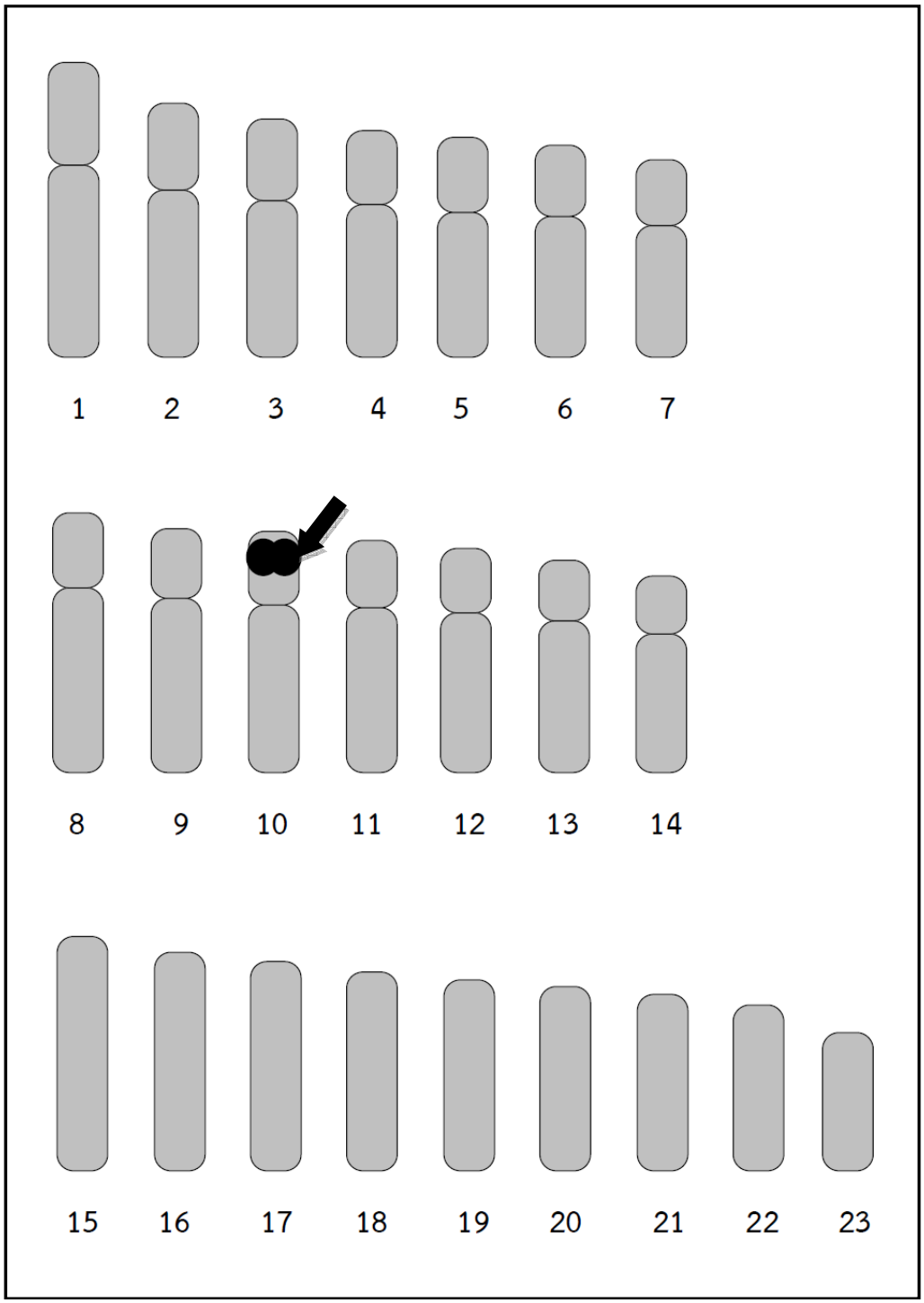
ภาพที่ 4-17 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera*) เพศผู้ (A) และเพศเมีย (B) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ($2n$=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์ 2 ไมโครเมตร)



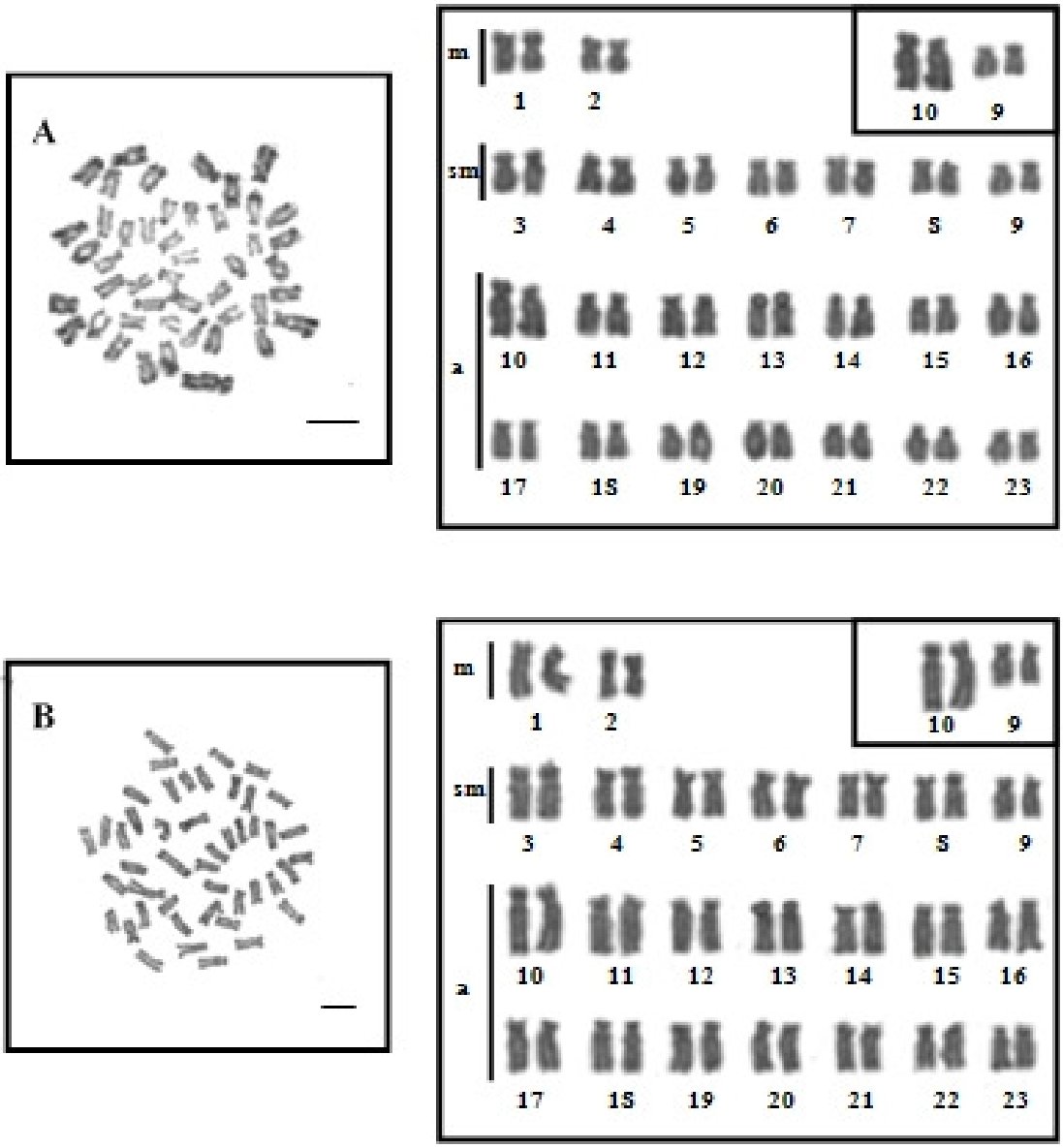
ภาพที่ 4-18 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera*) เพศผู้ (A) และเพศเมีย (B) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique) บริเวณลูกศรชี้แสดงตำแหน่ง nucleolar organizer region/NOR บนโครโมโซมคู่ที่ 10 เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย (สเกลบาร์ 2 ไมโครเมตร)



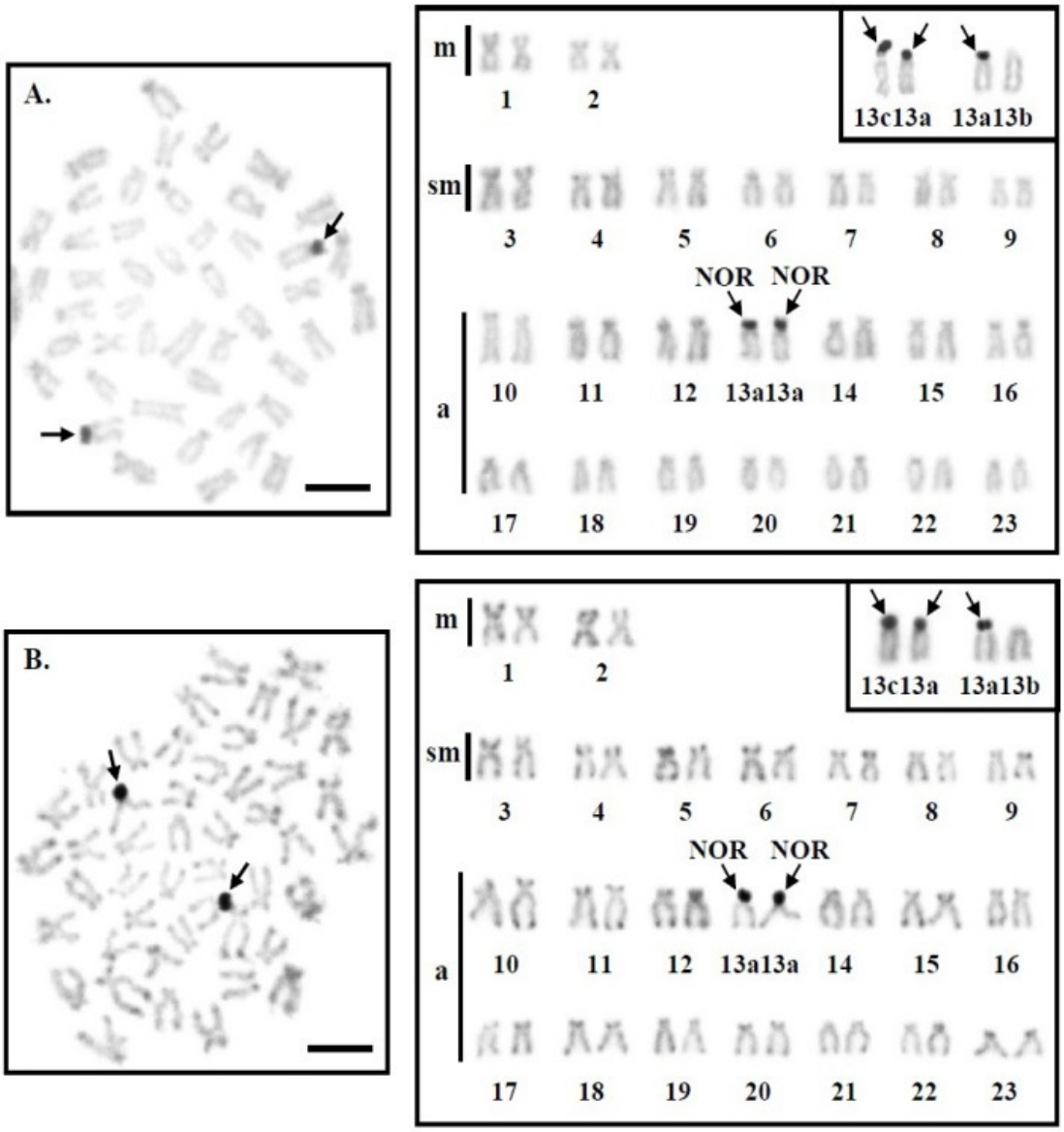
ภาพที่ 4-19 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา



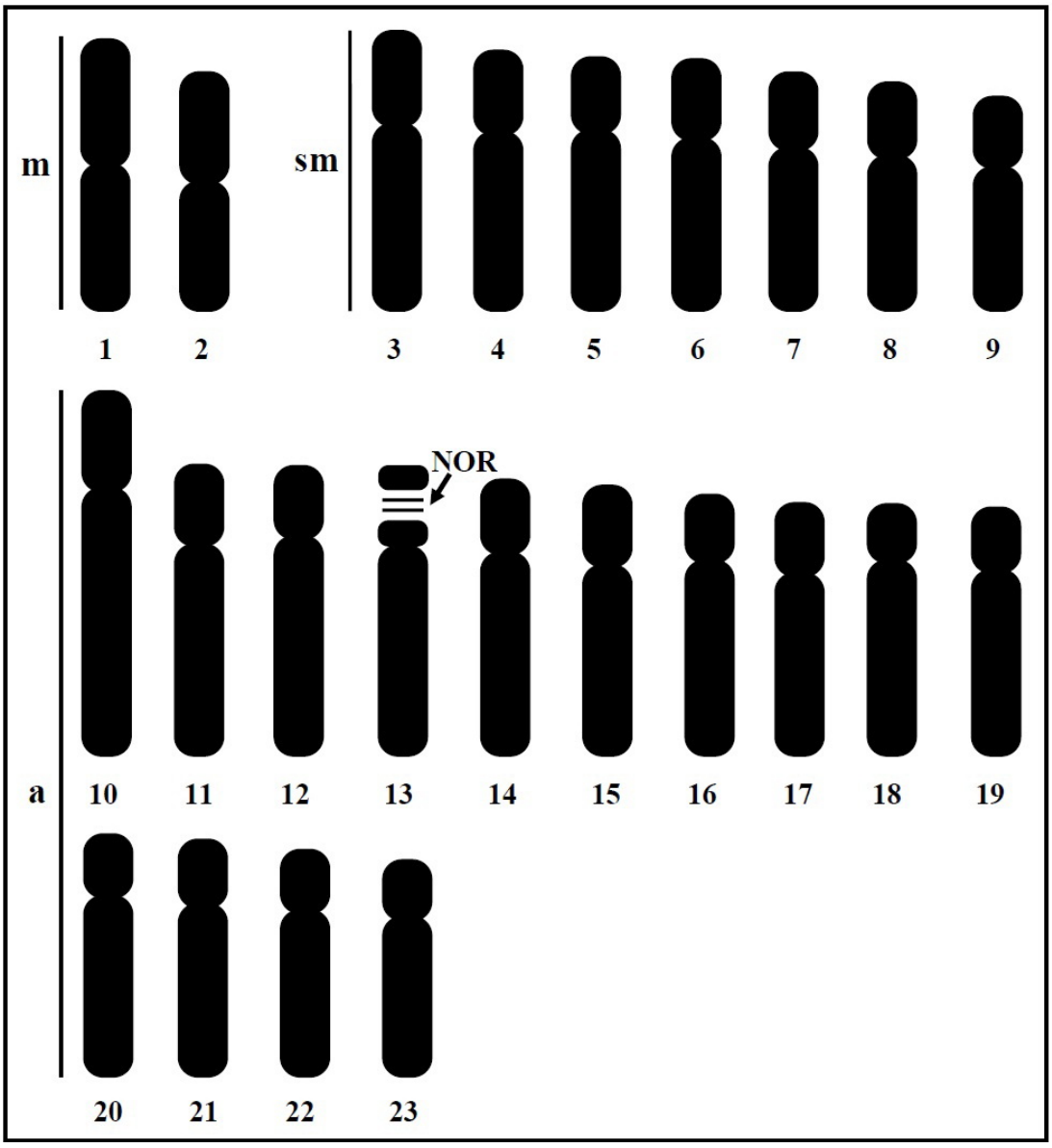
ภาพที่ 4-20 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique) บริเวณลูกศรชี้แสดงตำแหน่ง nucleolar organizer region/NOR บนโครโมโซมคู่ที่ 10



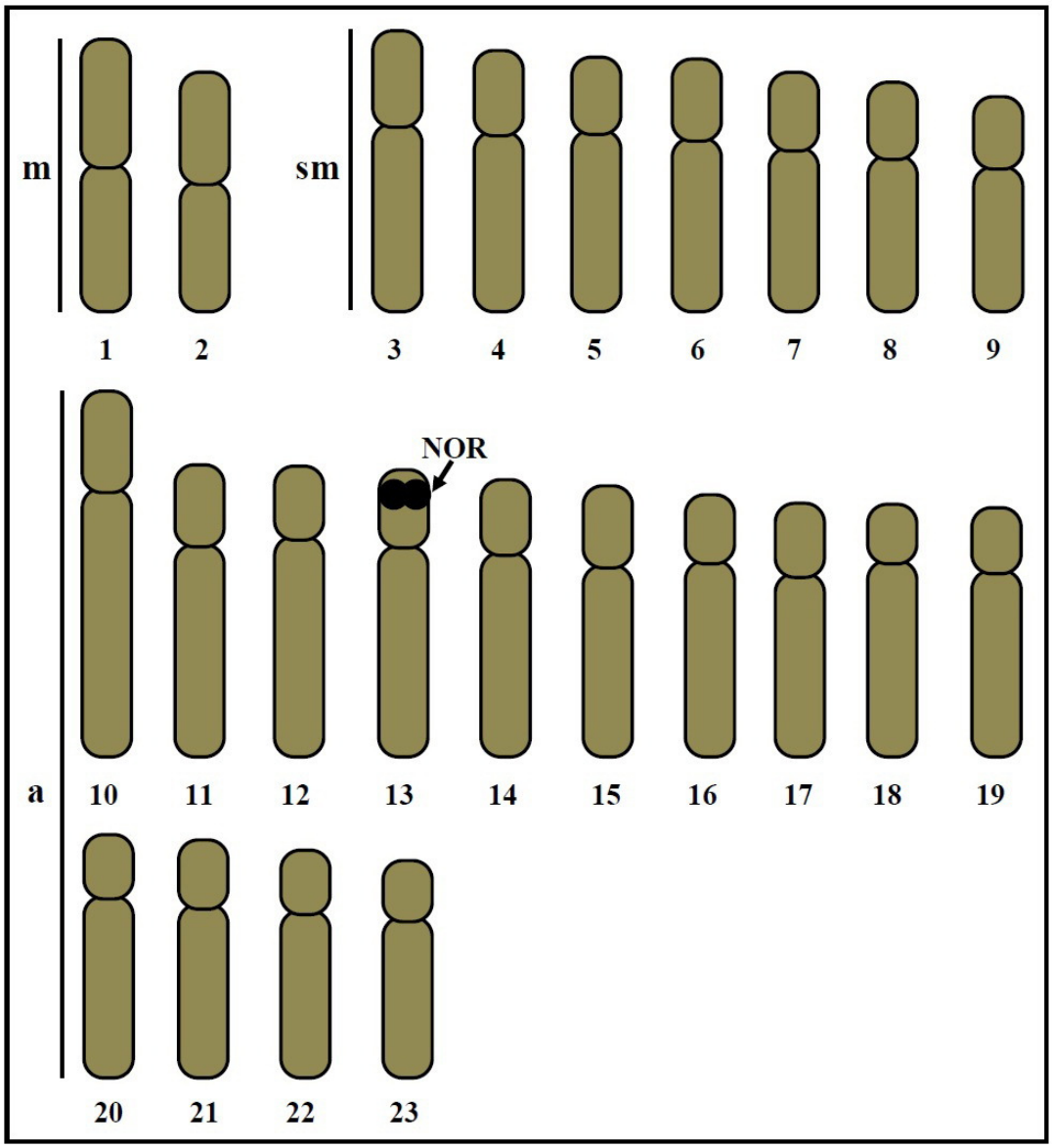
ภาพที่ 4-21 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) เพศผู้ (A) และเพศเมีย (B) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา บริเวณกรอบสี่เหลี่ยมมุมบนขวาแสดงโครโมโซม เครื่องหมาย (สเกลบาร์ 2 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 4-22 เซลล์เมทาเฟสโครโมโซม และแคริโอไทป์ ของปลาปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) เพศผู้ (A) และเพศเมีย (B) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ บริเวณลูกศรชี้แสดงตำแหน่ง Nucleolar organizer regions (NORs) บนโครโมโซมคู่ที่ 13 เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย ซึ่งมีรูปแบบแตกต่างกันไป 3 รูปแบบ คือ มีตำแหน่งนอร์สองแท่งขนาดเท่ากัน (13a13a) มีตำแหน่งนอร์สองแท่งขนาดแตกต่างกัน (13c13a) และมีตำแหน่งนอร์แท่งเดียวอีกแท่งไม่มี (13a13b) (สเกลบาร์ 2 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 4-23 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา บริเวณลูกศรชี้แสดงตำแหน่ง nucleolar organizer region/NOR บนโครโมโซมคู่ที่ 13

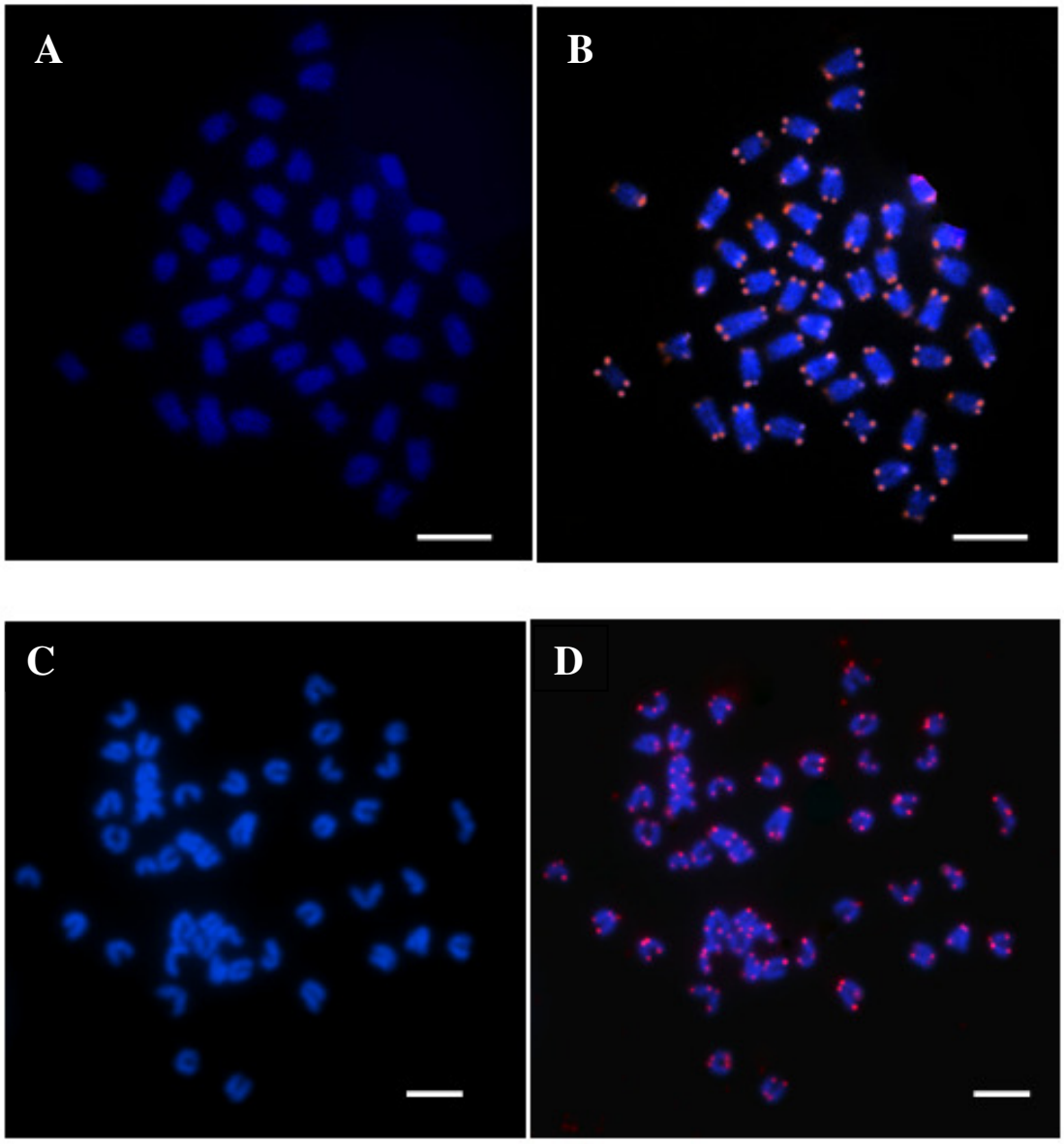


ภาพที่ 4-24 อิดิโอแกรมแสดงความยาวและชนิดของโครโมโซมของปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (2*n*=46) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding technique) ลูกศรชี้แสดงตำแหน่ง nucleolar organizer region/NOR ของโครโมโซมคู่ที่ 13

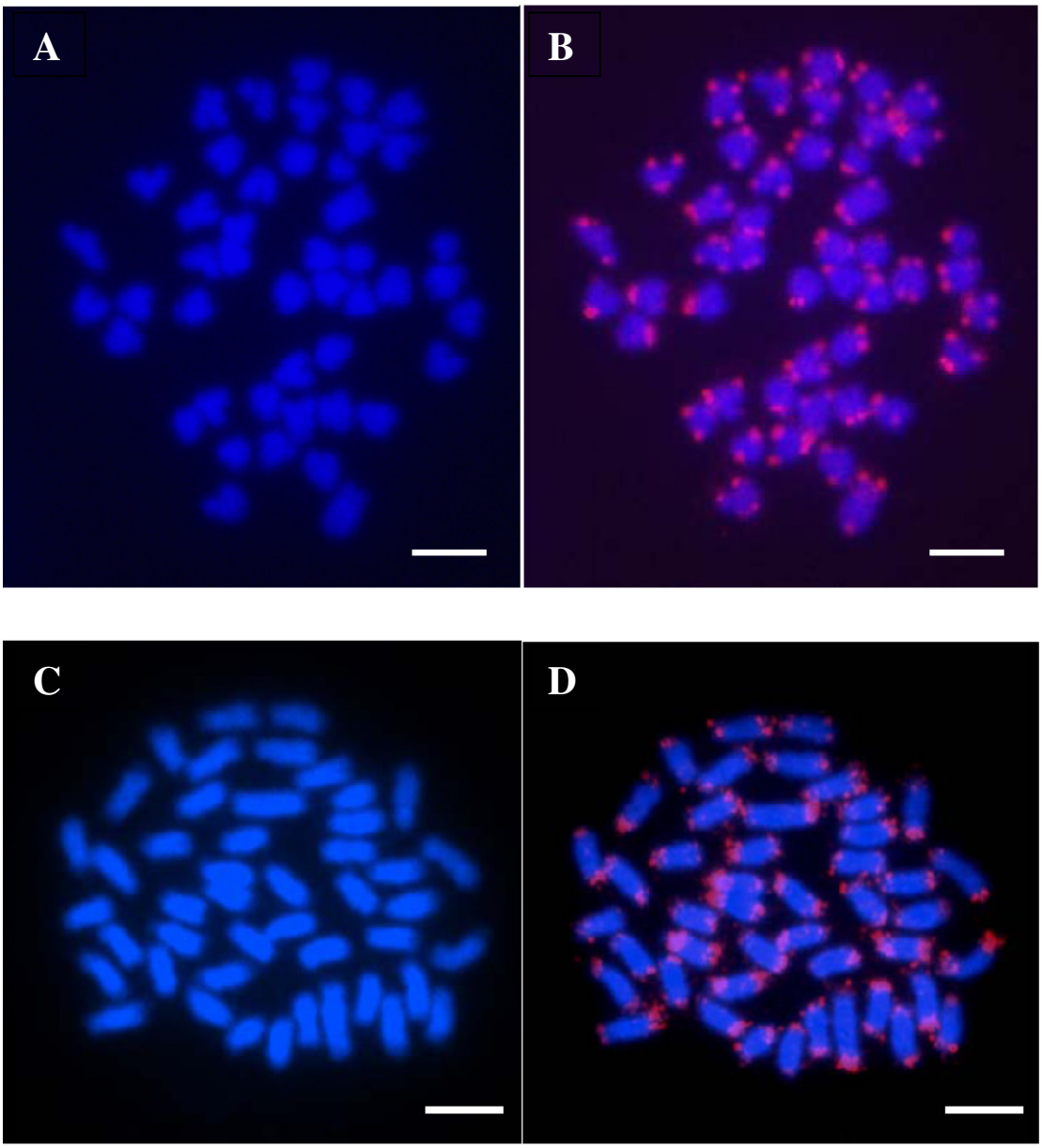
พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาอมไข่

จากการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน (FISH) โดยศึกษาจำนวน 2 โพรบ ได้แก่ โพรบเทโลเมียร์ และโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S ซึ่งย้อมสีพื้นหลังของโครโครโมโซมด้วยสีแดปี ผลการไฮบริไดซ์โพรบเทโลเมียร์กับโครโมโซมปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิดพบว่าสัญญาณของโพรบถูกพบบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกแท่งและไม่พบบริเวณกลางแท่งของโครโมโซม (ภาพที่ 4-25 และ 4-26)

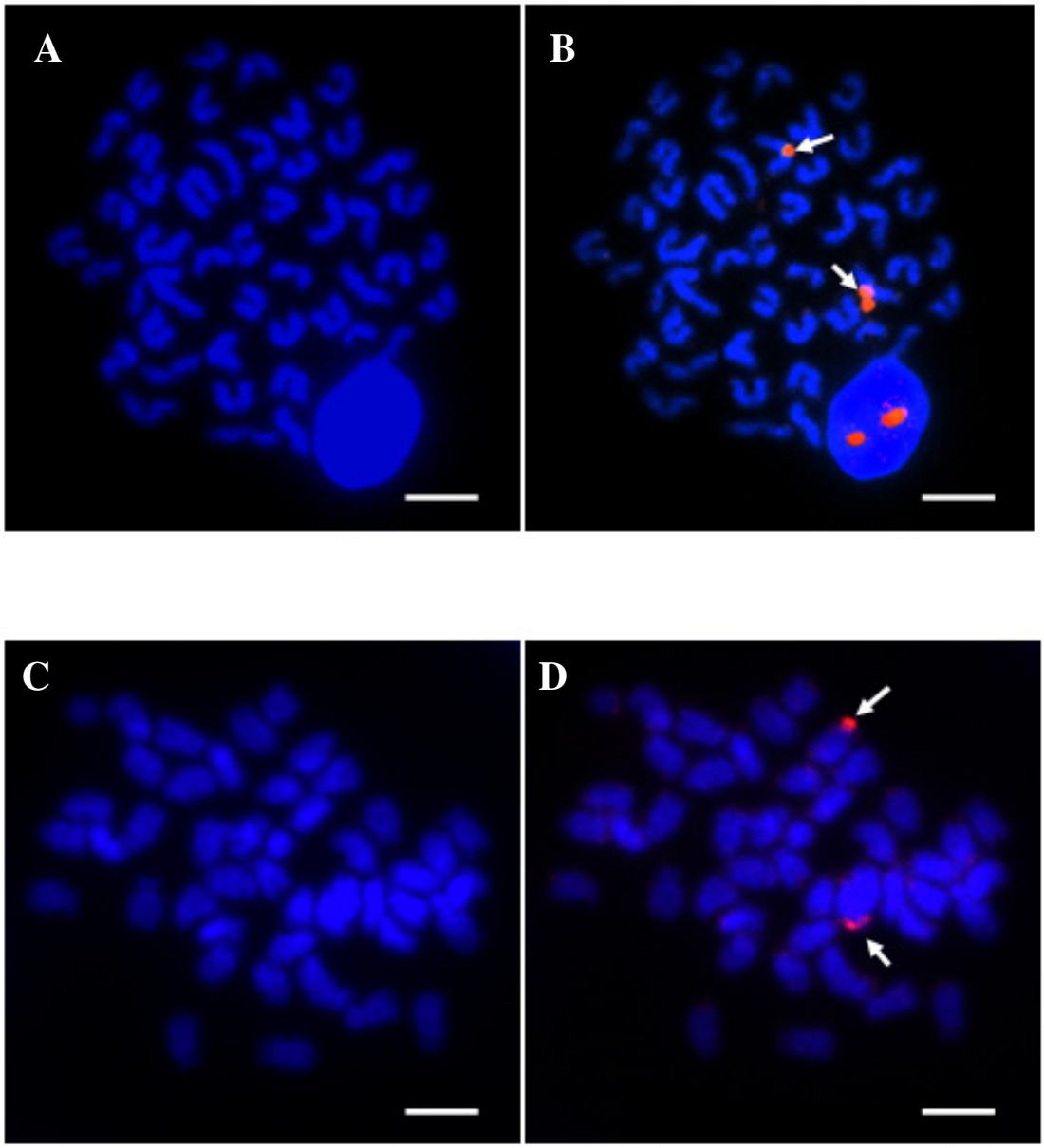
ผลการไฮบริไดซ์โพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอกับโครโมโซมของปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาฟ้า ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาว พบว่าสัญญาณของโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอ ถูกพบจำนวน 2 แท่งซึ่งเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก ตรงตำแหน่งใกล้กับเทโลเมียร์ของแขนข้างสั้น ในปลาทั้ง 4 ชนิด ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ตรงกับโครโมโซมที่มีนอร์ (ภาพที่ 4-27 และ 4-28)



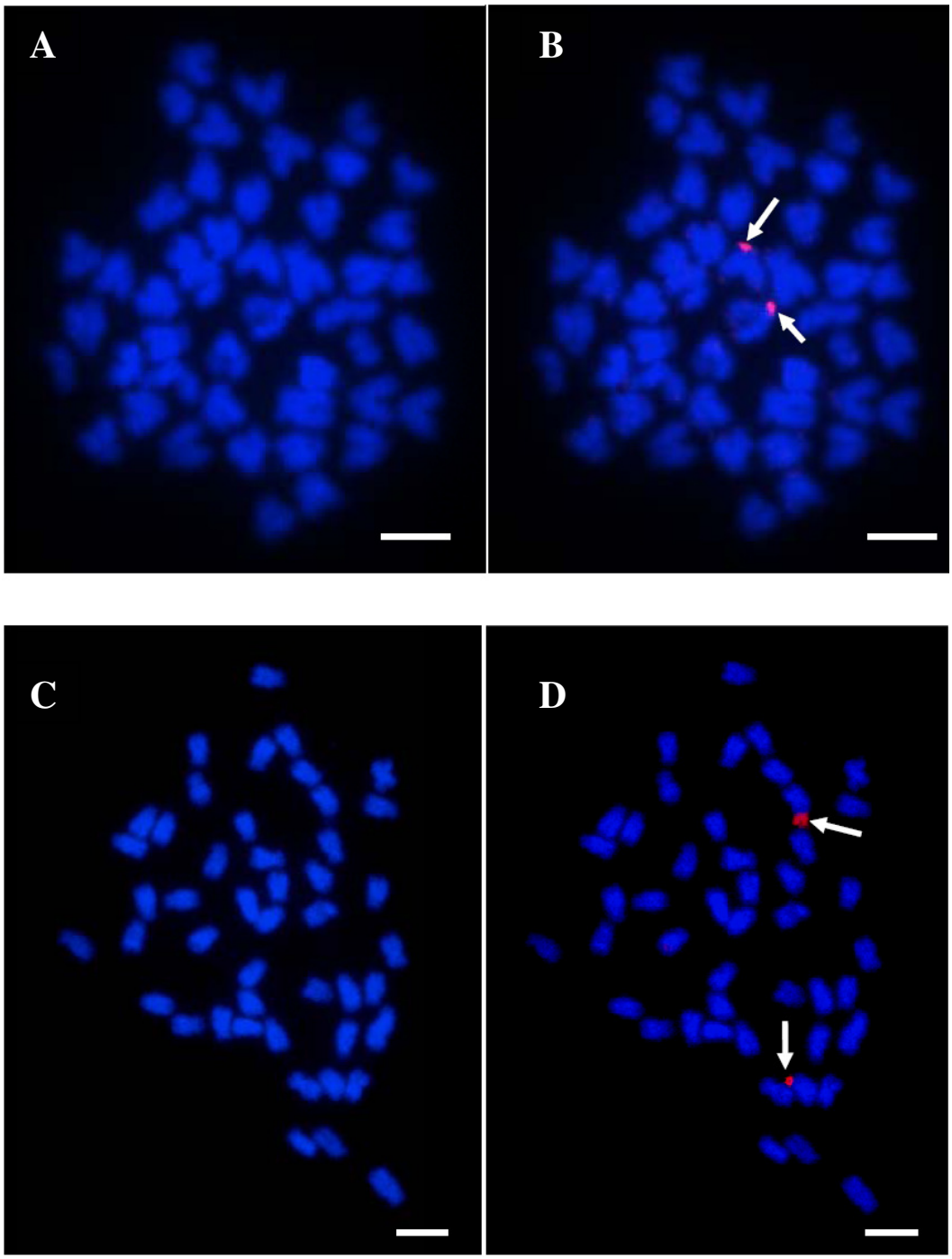
ภาพที่ 4-25 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) สเกลบาร์เท่ากับ *2* ไมโครเมตร (กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100x เลนส์ใกล้ตา 10x เลนส์ใกล้กล้องถ่ายรูป 2.5x)



ภาพที่ 4-26 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบเทโลเมียร์ของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) สเกลบาร์เท่ากับ *2* ไมโครเมตร (กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100x เลนส์ใกล้ตา 10x เลนส์ใกล้กล้องถ่ายรูป 2.5x)



ภาพที่ 4-27 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) ลูกศรชี้แสดงสัญญาณโพรบจำนวน 2 ตำแหน่ง สเกลบาร์ เท่ากับ 2 ไมโครเมตร (กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100x เลนส์ใกล้ตา 10x เลนส์ใกล้กล้องถ่ายรูป 2.5x)



ภาพที่ 4-28 เมทาเฟสโครโมโซมจากการย้อมด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera*) (A ย้อมด้วยแดปี และ B ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) และปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*) (C ย้อมด้วยแดปี และ D ย้อมด้วยแดปีและโพรบ) ลูกศรชี้แสดงสัญญาณโพรบจำนวน 2 ตำแหน่ง สเกลบาร์ เท่ากับ 2 ไมโครเมตร (กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100x เลนส์ใกล้ตา 10x เลนส์ใกล้กล้องถ่ายรูป 2.5x)

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาลักษณะภายนอกของปลาวงศ์อมไข่ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาฟ้า ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาว โดยสรุปได้ดังตารางที่ 5-1

ตารางที่ 5-1 ลักษณะภายนอกที่พบในปลาวงศ์อมไข่ทั้ง 4 ชนิด

ชนิดปลา	ความยาว	ครีบหลัง				ครีบก้น		ครีบท้อง	
		ส่วนหน้า		ส่วนหน้า					
		ก้านครีบแข็ง	ก้านครีบอ่อน	ก้านครีบแข็ง	ก้านครีบอ่อน	ก้านครีบแข็ง	ก้านครีบอ่อน	ก้านครีบแข็ง	ก้านครีบอ่อน
ปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis* Valenciennes, 1832))	8-11	VI	0	I	9	II	8	I	5
ปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis* (Cuvier, 1828))	6-10	V	0	I	8	2	9	I	5
ปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera* (Bleeker, 1856))	6-10	VII	0	I	9	II	8	I	5
ปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni* Kaumans, 1933)	6-10	VIII	0	I	14	II	13	I	10

จากการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาอมไข่ 4 ชนิด พบว่าจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ในปลาทั้ง 4 ชนิด เท่ากัน คือ 46 แท่ง และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 54, 68, 74 และ 92 ตามลำดับ ทั้งเพศผู้และเพศเมีย สามารถจัดสูตรแคริโอไทป์ ได้ดังนี้

สูตรแคริโอไทป์ของปลาอมไข่ตาดำ (*Fibramia lateralis* (Valenciennes, 1832))

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

สูตรแคริโอไทป์ของปลาอมไข่ตาฟ้า (*Sphaeramia orbicularis* (Cuvier, 1828))

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

สูตรแคริโอไทป์ของปลาอมไข่ตาแดง (*Sphaeramia nematoptera* (Bleeker, 1856))

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

สูตรแคริโอไทป์ของปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni* Kaumans, 1933)

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

จากผลการศึกษาไม่สามารถระบุโครโมโซมเพศในปลาทั้ง 4 ชนิดได้ เพราะไม่พบความแตกต่างของโครโมโซมระหว่างเพศผู้และเพศเมีย จากการตรวจสอบโครโมโซมในปลาทั้ง 4 ชนิด ด้วยการย้อมแถบสีแบบนอร์พบโครโมโซมที่มีนอร์ชนิดละ 1 คู่ ตำแหน่งของนอร์อยู่ตอนปลายของโครโมโซมคู่ที่ 2, 7, 10 และ13 ในปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาฟ้า ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาว ตามลำดับ ผลจากการศึกษาด้วยเทคนิคฟิช โดยใช้โพรบเทโลเมียร์พบว่าสัญญาณปรากฏตรงตำแหน่งของเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกแท่ง และไม่พบตรงตำแหน่งอื่นของโครโมโซมในปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด สำหรับโพรบไรโบโซมอล 18S อาร์ดีเอ็นเอพบสัญญาณปรากฏจำนวน 2 แท่ง ตรงกับโครโมโซมที่มีนอร์ในปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาอมไข่ ได้แก่ ปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาฟ้า ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาว ในประเทศไทย ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรกในปลา 3 ชนิด ได้แก่ปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาว ส่วนปลาอมไข่ตาฟ้าเป็นรายงานการศึกษาเพิ่มเติม แต่ทั้ง 4 ชนิดนั้นเป็นรายงานการศึกษาครั้งแรกของการศึกษาแถบสีแบบนอร์ สามารถวิจารณ์ผลการวิจัยได้ ดังนี้

1. จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ และจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน

จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาฟ้า ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาวที่ศึกษาในครั้งนี้เท่ากับ 46 แท่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาของ

Ojima and Kojima (1985) ที่ศึกษาในปลาอมไข่ตาฟ้าจากมหาสมุทรแปซิฟิก และจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ยังเท่ากับปลาชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิดในวงศ์เดียวกัน ได้แก่ ปลา *Jaydia lineata* (Murofushi,1986) ปลา *Nectamia fusca* (Rivlin et al., 1986) ปลา *Ostorhinchus doederleini* (Ojima & Kojima, 1985) ปลา *O. endekataenia* (Rishi, 1973; Murofushi, 1986) ปลา *O. moluccensis* (Rishi, 1973) *O. notatus* (Ojima & Kojima, 1985; Murofushi, 1986) ปลา *O. semilineatus* (Murofushi et al., 1980; Ojima & Kojima, 1985) แต่แตกต่างจากปลา *Apogon maculatus* ที่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 34 แท่ง (Rivlin et al., 1988) ปลา *A. americanus* (Araújo et al., 2010) ปลา *A. binotatus* (Rivlin et al., 1987) ปลา *A. imberbis* (Alvarez et al., 1991) และปลา *A. pseudomaculatus* (Rivlin et al., 1986) ที่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 36 แท่ง และแตกต่างจากปลา *Phaeoptyx pigmentaria* ที่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 38 แท่ง (Rivlin et al., 1986) ดังตารางที่ 5-2

จำนวนโครโมโซมพื้นฐานของปลาอมไข่ตาดำเท่ากับ 54 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งแตกต่างกับปลาชนิดอื่นๆ ในวงศ์ปลาอมไข่ยกเว้นปลา *Ostorhinchus doederleini* (Ojima & Kojima, 1985) และ *O. semilineatus* (Ojima & Kojima, 1985) ปลาอมไข่ตาฟ้ามีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 68 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งแตกต่างกับรายงานก่อนหน้านี้จากมหาสมุทรแปซิฟิก โดย Ojima and Kojima (1985) ที่รายงานว่าปลาอมไข่ตาฟ้ามีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 50 และต่างจากชนิดอื่น ๆ ทุกชนิดที่มีรายงานการศึกษามาแล้ว ความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมพื้นฐานในปลาชนิดเดียวกันแต่ต่างประชากรยังมีรายงานการศึกษาในปลา ปลา *O. endekataenia* (Rishi, 1973; Murofushi, 1986) และปลา *A. binotatus* (Rivlin et al., 1987) ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลมาจากความแตกต่างผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ปลาอมไข่ตาแดงมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 74 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งแตกต่างกับปลาทุกชนิดในวงศ์เดียวกัน ส่วนปลาอมไข่ครีบยาวมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 92 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งแตกต่างกับปลาทุกชนิดในวงศ์เดียวกันยกเว้นปลา *Nectamia fusca* จากประเทศสหรัฐอเมริกา (Rivlin et al., 1986) เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้าจะพบว่าจำนวนโครโมโซมพื้นฐานของปลาวงศ์ปลาอมไข่มีความแตกต่างผันแปรตั้งแต่ 46 ถึง 92 (ตารางที่ 5-2)

ตารางที่ 5-2 ผลเปรียบเทียบการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาอมไข่ 4 ชนิด

ชนิด	2*n*	NF	สูตรแคริโอไทป์	Ag-NORs	ประเทศที่ศึกษา	เอกสารอ้างอิง
Genus Apogon						
Apogon americanus	36	70	12m+6sm+16a+2t	2(TR)	บราซิล	Araújo et al. (2010)
A. binotatus	36	50	14m/sm+22a/t	-	สหรัฐอเมริกา	Rivlin et al. (1987)
	36	62	26m/sm+10a/t	-	สหรัฐอเมริกา	Rivlin et al. (1987)
	35	49	14m/sm+21a/t	-	สหรัฐอเมริกา	Rivlin et al. (1987)
A. imberbis	36	56	-	-	สเปน	Alvarez et al. (1991)
A. maculatus	34	61	27m/sm+7a/t	-	เปอโตริโก	Rivlin et al. (1988)
A. pseudomaculatus	36	66	30m/sm+2a+4t	-	เปอโตริโก	Rivlin et al. (1986)
Genus Fibramia						
ปลาอมไข่ตาดำ *(Fibramia lateralis)*	46	54	8a+38t	2(TR)	ไทย	การศึกษาครั้งนี้
Genus Jaydia						
Jaydia lineata (*A. lineatus*)*	46	52	2m+4sm+2a+38t	-	ญี่ปุ่น	Murofushi (1986)
Genus Nectamia						
Nectamia fusca	46	-	2m+44sm/a/t	-	แปซิฟิก	Rivlin et al.
(*A. nubilus*)*	46	92	2m+36sm+8a	-	สหรัฐอเมริกา	(1986)

ตารางที่ 5-2 (ต่อ)

ชนิด	2n	NF	สูตรแคริโอไทป์	Ag-NORs	ประเทศที่ศึกษา	เอกสารอ้างอิง
Genus Ostorhinchus						
Ostorhinchus doederleini (*A. doederleini*)*	46	54	2m+6sm+38a/t	-	ญี่ปุ่น	Ojima and Kojima (1985)
O. endekataenia	46	46	46a/t	-	อินเดีย	Rishi (1973)
(*A. endekataenia*)*	46	52	2m+4sm+16a+24t	-	ญี่ปุ่น	Murofushi (1986)
O. moluccensis (*A. moluccensis*)*	46	46	46a/t	-	อินเดีย	Rishi (1973)
O. notatus (*A. notatus*)*	46	52	2m+4sm+40a/t	-	ญี่ปุ่น	Ojima and Kojima (1985)
	46	53	2m+5sm+39a/t	-	ญี่ปุ่น	Ojima and Kojima (1985)
	46	52	2m+4sm+40a/t	-	ญี่ปุ่น	Ojima and Kojima (1985)
	46	52	2m+4sm+40a/t	-	ญี่ปุ่น	Murofushi (1986)
O. semilineatus (*A. semilineatus*)*	46	52	2m+4sm+20a+20t	-	ญี่ปุ่น	Murofushi et al. (1980)
	46	54	2m+6sm+38a/t	-	ญี่ปุ่น	Ojima and Kojima (1985)
Genus Phaeoptyx						
Phaeoptyx pigmentaria	38	-	6m+32sm/a/t	-	แอตแลนติก	Rivlin et al. (1986)
Genus Pterapogon						
ปลาอมไข่ครีบยาว (*Pterapogon kauderni*)	46	92	4m+14sm+28a	2(TR)	ไทย	การศึกษาครั้งนี้

ตารางที่ 5-2 (ต่อ)

ชนิด	2n	NF	สูตรแคริโอไทป์	Ag-NORs	ประเทศที่ศึกษา	เอกสารอ้างอิง
Genus *Sphaeramia*						
ปลาอมไข่ตาแดง *(Sphaeramia nematoptera)*	46	74	14sm+14a+18t	2(TR)	ไทย	การศึกษาครั้งนี้
ปลาอมไข่ตาฟ้า *(S. orbicularis)*	46	50	4sm+42a/t	-	แปซิฟิก	Ojima and Kojima (1985)
	46	68	8sm+ 14a+24t	2(TR)	ไทย	การศึกษาครั้งนี้

หมายเหตุ ชื่อวิทยาศาสตร์มีการปรับเปลี่ยนโดยยึดตาม Eschmeyer (2015); -= ไม่มีข้อมูล และ*=ชื่อวิทยาศาสตร์ในบทความวิจัยต้นฉบับ

2. ชนิดและขนาดของโครโมโซม

การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับขนาดของโครโมโซมปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด โดยจำแนกได้ 3 ขนาด คือ โครโมโซมขนาดใหญ่ โครโมโซมขนาดกลาง และโครโมโซมขนาดเล็ก ยกเว้น ปลาอมไข่ครีบยาว มีโครโมโซม 2 ขนาด คือ โครโมโซมขนาดใหญ่ และโครโมโซมขนาดกลาง ส่วนชนิดของโครโมโซมพบว่าปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาฟ้า และปลาอมไข่ตาแดง มีโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก อะโครเซนทริก และเทโลเซนทริก ไม่พบชนิดเมทาเซนทริก แต่ในปลาแต่ละชนิดมีจำนวนแท่งของชนิดโครโมโซมชนิดต่างๆ แตกต่างกัน ส่วนในปลาอมไข่ครีบยาวพบเฉพาะโครโมโซมชนิดเมทาเซนทิก ซับเมทาเซนทริก และอะโครเซนทริก ไม่พบโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก

จากผลการศึกษาพบว่าปลาอมไข่ตาฟ้ามีชนิดโครโมโซมและจำนวนต่างจากรายงานของ Ojima and Kojima (1985) ซึ่งได้รายงานชนิดโครโมโซมของปลาอมไข่ตาฟ้าจากมหาสมุทรแปซิฟิก ประกอบด้วยชนิดซับเมทาเซนทริก 4 แท่ง และโครโมโซมที่มีแขนเดียว 42 แท่ง แต่การศึกษาครั้งนี้พบชนิดโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก 8 แท่ง อะโครเซนทริก 14 แท่ง และเทโลเซนทริก 24 แท่ง ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้อาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างผันแปรของโครโมโซมที่เกิดขึ้นกับปลาอมไข่ตาฟ้าต่างประชากรกัน ความแตกต่างของรูปร่างหรือชนิดของโครโมโซมจากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานที่ผ่านมามีความแตกต่างกัน อาจมีสาเหตุ

อีกประการหนึ่งจากหลักเกณฑ์ในการจำแนกรูปร่างโครโมโซมต่างกัน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ดัดแปลงวิธีการจาก กันยารัตน์ ไชยสุต (2532) โดยจำแนกโครโมโซม แบ่งตามสัดส่วนแขนข้างยาวต่อความยาวแขนโครโมโซมทั้งหมด (centromeric index, CI; q/p+q) หากค่า CI อยู่ระหว่าง 0.500–0.599, 0.600–0.699, 0.700–0.899 และ 0.900–1.000 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก อะโครเซนทริก และเทโลเซนทริก ตามลำดับ ในขณะที่รายงานที่ผ่านมายึดหลักตาม Levan et al. (1964) ซึ่งการกำหนดชนิดของโครโมโซมแบ่งตามสัดส่วนแขนข้างยาวต่อแขนข้างสั้น (q/p) ได้ดังนี้ ค่าระหว่าง 1.0-1.7, 1.7-3.0, 3.0-7.0 และมากกว่า 7.0 จัดเป็นเมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก ซับเทโลเซนทริก และเทโลเซนทริก ตามลำดับ

การศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของโครโมโซมระหว่างเพศผู้และเพศเมียจึงทำให้ไม่สามารถระบุโครโมโซมเพศของปลาทั้ง 4 ชนิดได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาของวงศ์ปลาอมไข่ของ Rishi (1973) Murofushi et al. (1980) Ojima and Kojima (1985) Murofushi (1986) Rivlin et al. (1986, 1987, 1988) Alvarez et al. (1991) และ Araújo et al. (2010) มีความเป็นไปได้ว่าโครโมโซมเพศของปลายังอยู่ในขั้นต้นของ differentiation การกำหนดเพศอาจถูกกำหนดโดยยีนซึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งใดแท่งหนึ่งซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้ในระดับพันธุศาสตร์เซลล์ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2543) ปลาเป็นสัตว์ที่มีระบบการควบคุมลักษณะความเป็นเพศที่หลากหลาย นอกจากนี้ยังพบว่าในปลาบางชนิดแสดงลักษณะการเป็นกระเทย (hermaphrodite) บางชนิดสามารถเปลี่ยนแปลงเพศได้ (sex-reversed) และมีปลาหลายชนิดที่กำหนดเพศด้วยยีน จากการศึกษาพบว่าในปลาทะเลจะมีรูปแบบการกำหนดเพศด้วยโครโมโซมเพศเพียงไม่กี่ชนิด ซึ่งแตกต่างจากปลาน้ำจืดที่มีการรายงานโครโมโซมเพศเอาไว้เป็นจำนวนมากในปลาทะเลจะพบรูปแบบการกำหนดเพศด้วยโครโมโซมเพศ 5 ระบบ ได้แก่ XX/XY (เพศผู้ XY เพศเมีย XX), XX/XO (เพศผู้ XO เพศเมีย XX), ZZ/ZW (เพศผู้ ZZ เพศเมีย ZW),ZZ/ZW1W2 (เพศผู้ ZZ เพศเมีย ZW1W2) และ X1X1X2X2/X1X2Y (เพศผู้ X1X2Y เพศเมีย X1X1X2X2)) (Galetti et al., 2000)

ปลาวงศ์อมไข่อยู่ในอันดับปลาเพอร์ซิฟอร์มส์ (Perciformes) จากการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ามีรายงานรูปแบบการกำหนดเพศ ดังนี้ วงศ์ปลากะพงข้างปานมี 1 ชนิด คือ ปลากะพงเหลืองห้าเส้น (*Lutjanus quinquelineatus*) เพศเมียมีโครโมโซมดิพลอยด์ 48 แท่ง (NF = 48) เพศผู้มีโครโมโซมดิพลอยด์ 47 แท่ง (NF = 48) มีระบบโครโมโซมเพศแบบ X1X1X2X2/X1X2Y วงศ์ปลาเฉี่ยว (Monodactylidae) มี 1 ชนิด คือปลาเฉี่ยวชนิด *Monodactylus sebae* เพศเมียมีโครโมโซมดิพลอยด์ 48 แท่ง (NF = 48) เพศผู้มีโครโมโซมดิพลอยด์ 47 แท่ง (NF = 48) มีระบบโครโมโซมเพศแบบ XX/XO ปลาที่มีระบบโครโมโซมเพศแบบ XX/XY ได้แก่ ปลา *Dicentrarchus labrax* (วงศ์ Moronidae) มีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 48 แท่ง (NF = 48)ปลา *Parapercis*

sexfasciata วงศ์ปลาตาแหงน (Pinguipedidae) มีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 แท่ง (NF =50) ปลา *Parablennius tentacularis* วงศ์ปลาตั๊กแตนหิน (Blennidae) มีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 48 แท่ง (NF = 48)และปลาตะกรับชนิด *Scatophagus argus* วงศ์ปลาตะกรับ (Scatophagidae) มีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 48 แท่ง(NF = 48 ในเพศเมีย และ 49 ในเพศผู้) วงศ์ปลาบู่มีรายงานโครโมโซมเพศ 3 ชนิด คือ ปลาบู่ชนิด *Gobius paganellus* มีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (NF = 47 ในเพศเมีย และ 48 ในเพศผู้) ปลาบู่ชนิด *Proterorhinus marmoratus* มีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (NF = 46) ซึ่งทั้งสองชนิดมีระบบโครโมโซมเพศแบบ XX/XY และปลาบู่ชนิด *Ctenogobius shufeldti* มีระบบโครโมโซมเพศแบบ X1X1X2X2/X1X2Y (Galetti et al., 2000)

3. โครโมโซมเครื่องหมาย

การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานการศึกษาครั้งแรกของการย้อมแถบสีแบบนอร์ ในปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด พบโครโมโซมเครื่องหมายที่มีนอร์ชนิดละ 1 คู่ ตำแหน่งของนอร์อยู่ใกล้กับตำแหน่งเทโลเมียร์ของแขนข้างสั้นของโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก โดยปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาฟ้า ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาว มีโครโมโซมเครื่องหมายที่มีตำแหน่งนอร์อยู่ที่โครโมโซมคู่ที่ 2, 7, 10 และ 13 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาในวงศ์เดียวกันพบว่ามีรายงานเพียง 1 ชนิดเท่านั้น คือในปลาอมไข่ *A. americanus* โดย Araújo et al. (2010) ที่รายงานตำแหน่งนอร์ ในโครโมโซม 1 คู่อยู่ตอนปลายใกล้ตำแหน่งเทโลเมียร์ของแขนสั้นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 จากข้อมูลการเปรียบเทียบจะพบว่าจำนวนและตำแหน่งของนอร์ในปลาวงศ์นี้ได้ถูกอนุรักษ์ไว้และมีความเหมือนกันในทุกชนิดที่ได้มีการศึกษามา ถึงแม้ว่าจะเป็นโครโมโซมต่างคู่กันเพราะโครโมโซมที่มีนอร์นี้เป็นโครโมโซมเครื่องหมายที่จำเพาะกับชนิด

จากผลการศึกษาพบว่าในปลาอมไข่ตาฟ้า ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาวมีความแตกต่างผันแปรของลักษณะการติดสีของตำแหน่งนอร์หรือที่เรียกว่าพอลีมอร์ฟิซึม โดยปลาอมไข่ตาฟ้า และปลาอมไข่ตาแดงมีรูปแบบแตกต่างกัน 2 แบบ คือมีจำนวนนอร์ 2 แท่ง (เพศละ 8 ตัวอย่าง) และ 1 แท่ง (เพศละ 2 ตัวอย่าง) ส่วนปลาอมไข่ครีบยาวมีรูปแบบแตกต่างกัน 3 แบบ ดังนี้ 1) มีนอร์ 2 แท่งขนาดเท่ากัน (เพศละ 7 ตัวอย่าง) 2) มีนอร์ 2 แท่งขนาดต่างกัน (พบเพศละ 3 ตัวอย่าง) และ 3) มีนอร์ 1 แท่ง (เพศละ 1 ตัวอย่าง) บริเวณนอร์นั้นประกอบด้วยอาร์ดีเอ็นเอ โปรตีน และอาร์เอ็นเอจำนวนมาก rDNA นี้ จะสังเคราะห์ rRNA ชนิด 28S และ 18S ยีนบริเวณนี้เป็นยีนที่ซ้ำกันหลายร้อยชุด (repetitive DNA) โพลีมอร์ฟิซึมของนอร์อาจเกิดจากการเพิ่มปริมาณการทำงานของยีน (gene amplification) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์โปรตีน เพราะ rRNA เมื่อรวมกับ ribosomal protein จะทำให้กลายเป็นไรโบโซม (ribosome) มีหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน ยิ่งนอร์ยืดยาวมากเท่าใด จำนวนยีนที่สังเคราะห์ rRNA ก็จะมากตามไปด้วย (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

ลักษณะพอลีมอร์ฟิซึมนี้สามารถพบได้ในปลาหลายชนิด ได้แก่ ปลา *Moenkhausias anctaefilomenae* (Foresti et al., 1989), *Aphanius fasciatus* (Vitturi et al., 1995), *Leporinus friderici* (Galetti et al., 1995), *Salmo trutta* (Castro et al., 1996), *Salvelinus alpines* (Reed & Phillips, 1997), *Chondrostoma lusitanicum* (Collares-Pereira & Ráb, 1999), *Hoplias malabaricus* (Born & Bertollo, 2000), *Oedalechilus labeo* (Rossi et al., 2000), *Astyanax scabripinnis* (Soza et al., 2001), *A. altiparanae* (Mantovani et al., 2005), *Brycon Americus* aff. *exodon* (Paintner-Marques et al., 2002), *Apareiodon affinis* (Jorge & Filho, 2004), *Aphanius fasciatus* (Vitturi et al., 2005), *Prochilodus lineatus* (Gras et al., 2007), *B.* aff. *iheringii* (Capistano et al., 2008), *Puntioplites proctozysron* (Supiwong et al., 2012), and *Lutjanus johnii* (Phimphan et al., 2013)

นอร์มีบทบาทที่สำคัญที่ใช้เป็นเครื่องหมายโครโมโซมที่เหมาะสมมากภายในชนิดหรือต่างชนิดในปลาหลาย ๆ กลุ่ม ความแตกต่างผันแปรนี้อาจจะมีผลทำให้มีจำนวน ตำแหน่งบนโครโมโซม ขนาด และจำนวนที่ยีนทำงานในแต่ละจีโนม รายงานที่ผ่านมาพบความแตกต่างผันแปรของนอร์เกิดขึ้นระหว่างชนิด ภายในชนิดเดียวกัน หรือแตกต่างในแต่ละตัวอย่างที่ศึกษา (Castro et al., 1996) นอร์ที่อยู่บนโครโมโซมคู่เหมือนอาจจะมีขนาดที่แตกต่างกัน ปลาบางชนิดอาจมีขนาดที่แตกต่างกันถึงสองเท่าระหว่างโครโมโซมคู่เหมือนด้วยกัน ซึ่งเป็นไปตามกับรายงานก่อนหน้านี้ ซึ่งขอบเขตของความหลากหลายระหว่างนอร์นี้อาจจะประกอบกับการมีจำนวนชุดของยีน หรือซิสทรอน (cistrons) และความแตกต่างของกิจกรรมการถอดรหัสของยีน (Galetti et al., 1984)

ในมุมมองของทั้งจุดวิวัฒนาการระดับมหภาคและจุลภาค นอร์เป็นบริเวณที่มีศักยภาพมากในแง่ของวิวัฒนาการ บริเวณดังกล่าวนี้ได้ถูกใช้เป็นเสมือนเครื่องหมายทางสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Amemiya & Gold, 1988) และต่อมาได้ขับเคลื่อนทำให้เกิดความแตกต่างในตำแหน่งโครโมโซมที่ถูกตรวจสอบในชนิดที่ใกล้เคียงกันมาก (Volleth, 1987) การเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งนอร์ระหว่างการวิวัฒนาการเหล่านี้ได้เกิดขึ้นร่วมกับการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมค่อนข้างบ่อย (Hall & Parker, 1995) ในแนวทางอื่น ๆ จากการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ดั้งเดิมและเทคนิคทางพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลที่เพิ่งพัฒนาขึ้นมาได้แสดงให้เห็นถึงตำแหน่งนอร์มีรูปแบบที่หลากหลายแตกต่างกันของทั้งจำนวนและตำแหน่งภายในชนิดเดียวกัน (Schmid et al., 1995) แม้ว่าการมีจำนวนโครโมโซมที่มีนอร์เพียง 1 คู่จะถูกพิจารณาว่าเป็นลักษณะที่ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงจากบรรพบุรุษหรือเพลซิโอมอร์ฟิค (plesiomorphic) ในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่ แต่สัตว์มีกระดูกสันหลังบางกลุ่มมีตำแหน่งของนอร์มากกว่าโครโมโซม 1 คู่ (Suzuki et al., 1990)

4. แคริโอไทป์และอิดิโอแกรมของปลาวงศ์ปลาอมไข่

การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานแรกการศึกษาแคริโอไทป์และจัดทำอิดิโอแกรมของปลาอมไข่ตาดำ ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาว ส่วนปลาอมไข่ตาฟ้าเป็นการศึกษาเพิ่มเติมในประชากรจากประเทศไทยและยังเป็นรายงานแรกของการสร้างอิดิโอแกรมอีกด้วย ปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิดนั้น มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากัน คือ 46 แท่ง แต่จำนวนโครโมโซมพื้นฐานหรือจำนวนแขนรวมของโครโมโซมในแคริโอไทป์แตกต่างกันเนื่องจากมีจำนวนชนิดของโครโมโซมชนิดที่มีแขนเดียว (เทโลเซนทริก) แตกต่างกัน กล่าวคือปลาอมไข่ตาดำ มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานน้อยที่สุดคือ 54 เนื่องจากมีโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกมากที่สุดคือ 38 แท่ง รองลงมาคือปลาอมไข่ตาฟ้า ปลาอมไข่ตาแดง และปลาอมไข่ครีบยาวมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 68, 74 และ 92 ตามลำดับ ซึ่งมีโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกเท่ากับ 24, 18 และ 0 แท่ง ตามลำดับ

ปลาอมไข่ตาฟ้ามีแคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก 8 แท่ง อะโครเซนทริก 14 แท่ง และเทโลเซนทริก 24 แท่ง ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Ojima and Kojima (1985) ซึ่งได้รายงานชนิดโครโมโซมของปลาอมไข่ตาฟ้าจากมหาสมุทรแปซิฟิก ประกอบด้วยชนิดซับเมทาเซนทริก 4 แท่ง และโครโมโซมที่มีแขนเดียว 42 แท่ง และ Ojima and Kojima (1985) ไม่ได้รายงานขนาดของโครโมโซมไว้ ทำให้สูตรแคริโอไทป์ของปลาอมไข่ตาฟ้า คือ

$2n$ (diploid) 46 = $L^{sm}_{8} + L^{a}_{12} + L^{t}_{12} + M^{a}_{2} + M^{t}_{10} + S^{t}_{2}$ หรือ 8sm + 14a + 24t

ปลาอมไข่ตาดำมีแคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกจำนวน 8 แท่ง และเทโลเซนทริก 38 แท่ง สามารถเขียนสูตรแคริโอไทป์ได้ดังนี้

$2n$ (diploid) 46 = $L^{a}_{8} + L^{t}_{12} + M^{t}_{24} + S^{t}_{2}$ หรือ 8a + 38t

ปลาอมไข่ตาแดงมีแคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก 14 แท่ง อะโครเซนทริกจำนวน 14 แท่ง และเทโลเซนทริก 18 แท่ง สามารถเขียนสูตรแคริโอไทป์ได้ดังนี้

$2n$ (diploid) 46 = $L^{sm}_{10} + L^{a}_{10} + L^{t}_{4} + M^{sm}_{4} + M^{a}_{4} + M^{t}_{12} + S^{t}_{2}$ หรือ 14sm + 14a + 18t

ปลาอมไข่ครีบยาวมีแคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก 4 แท่ง ซับเมทาเซนทริก 14 แท่ง และอะโครเซนทริกจำนวน 28 แท่งสามารถเขียนสูตรแคริโอไทป์ได้ดังนี้

$2n$ (diploid) 46 = $L^{a}_{6} + M^{m}_{4} + M^{sm}_{14} + M^{a}_{22}$ หรือ 4m +14sm + 28a

จากแคริโอไทป์ของปลาทั้ง 4 ชนิด จะพบว่ามีรูปแบบคาริโอไทป์ที่ไม่สมมาตร เนื่องจากมีชนิดโครโมโซมประกอบด้วยชนิดเมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก อะโครเซนทริก และเทโลเซนทริก (อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

5. พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของวงศ์ปลาอมไข่

การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานการศึกษาครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล ในปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด โดยใช้โพรบเทโลเมียร์ และโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S ผลของการไฮบริไดซ์โพรบเทโลเมียร์กับโครโมโซมปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด พบว่าผลเป็นไปในแนวเดียวกัน กล่าวคือพบสัญญาณตรงตำแหน่งเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกแท่ง และไม่พบตรงตำแหน่งกลางแท่งหรือตำแหน่งอื่นของโครโมโซม ข้อมูลนี้บ่งชี้ให้ทราบว่าในระหว่างวิวัฒนาการทางโครโมโซมในปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิดนั้นไม่เกิดผ่านเซนทริกฟิวชันหรือแทนเด็มฟิวชัน สำหรับโพรบไรโบโซมอล อาร์ ดีเอ็นเอ 18S พบสัญญาณตรงบริเวณใกล้เทโลเมียร์ของแขนข้างสั้นของโครโมโซมอะโครเซนทริกขนาดใหญ่จำนวน 1 คู่ ในปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาในวงศ์เดียวกันพบว่ามีรายงานเพียง 1 ชนิดเท่านั้น คือในปลาอมไข่ *A. americanus* โดย Araújo et al. (2010) ที่ศึกษาด้วยโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S และ 5S ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสัญญาณของโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 18S พบตรงตำแหน่งเดียวกับตำแหน่งนอร์ที่ย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบนอร์ จำนวน 1 คู่ ตำแหน่งใกล้เทโลเมียร์แขนข้างสั้นของโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก คู่ที่ 8 ส่วนสัญญาณของโพรบไรโบโซมอล อาร์ดีเอ็นเอ 5S พบตรงตำแหน่งระหว่างเซนโทรเมียร์และเทโลเมียร์ หรือที่เรียกว่าอินเทอร์สติเชียล ของโครโมโซมชนิดซับเทโลเซนทริก 2 คู่

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

6. สมมติฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการทางโครโมโซมของปลาวงศ์ปลาไข่

จากรายงานก่อนหน้านี้และการศึกษาครั้งนี้ ปลาวงศ์อมไข่มีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์แล้ว 17 ชนิด พบว่าส่วนใหญ่ (64.71%) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (ตารางที่ 5-1) ข้อมูลดังกล่าวนี้บ่งชี้ว่าบรรพบุรุษของวงศ์ปลาอมไข่นี้ควรจะมีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (Araújo et al., 2010) ในจำนวนนี้มีบางชนิด เช่น *Ostorhinchus*

endekataenia และ *O. moluccensis* มีจำนวนโครโมโซมที่เป็นชนิดแขนเดียวทั้งหมด (Rishi, 1973) ซึ่งเป็นลักษณะที่โบราณที่พบได้แพร่หลายในปลาอันดับ Perciformes (Brum & Galetti, 1997; Molina, 2006) อย่างไรก็ตามยังพบว่าปลาในวงศ์นี้มีความหลากหลายทางโครโมโซมสูง ทั้งในเรื่องจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์และรูปร่างโครโมโซมซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการวิวัฒนาการทางโครโมโซมผ่านการจัดเรียงตัวใหม่ทำให้มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานมีค่ามาก (46<NF<92) กระบวนการหลักๆ ที่เป็นกลไกทำให้เกิดความหลากหลายของแคริโอไทป์ของวงศ์ปลาอมไข่ คือ การจัดเรียงตัวใหม่แบบโรเบิร์ตโซเนียน หรือการเชื่อมรวมตรงเซนโทรเมียร์ และการหักและต่อสลับใหม่แบบรวมเซนโทรเมียร์ (Araújo et al., 2010)

จากข้อมูลโครโมโซมปลาวงศ์อมไข่ สามารถจำแนกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 46 แท่ง (NF=48-92) ซึ่งเป็นส่วนใหญ่ในวงศ์นี้ ได้แก่ สกุล *Jaydia*, *Nectamia*, *Ostorhinchus* ซึ่งทั้ง3 สกุลนี้เดิมถูกจัดรวมอยู่ในสกุล *Apogon* นอกจากนี้ในกลุ่มที่ 1 ยังมีสกุล *Fibramia*, *Pterapogon* และ *Sphaeramia* กลุ่มที่ 1 นี้มีวิวัฒนาการทางโครโมโซมเกิดผ่านกลไกการหักและต่อสลับใหม่แบบรวมเซนโทรเมียร์ ทำให้เพิ่มจำนวนแขนโครโมโซมหรือโครโมโซมพื้นฐานขึ้นแต่จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับบรรพบุรุษ ส่วนกลุ่มที่ 2 มีโครโมโซมดิพลอย์ระหว่าง $2n$=34-38 (NF=49-70) ได้แก่ สกุล *Apogon* (*A. americanus*, *A. binotatus*, *A. imberbis*, *A. maculates*, *A. pseudomaculatus*) และ *Phaeoptyx pigmentaria* กลุ่มนี้มีวิวัฒนาการทางโครโมโซมเกิดผ่านกลไกการเชื่อมรวมตรงเซนโทรเมียร์ ทำให้ลดจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ลง และการหักและต่อสลับใหม่แบบรวมเซนโทรเมียร์ ทำให้เพิ่มจำนวนแขนโครโมโซมหรือโครโมโซมพื้นฐานขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อที่จะทำให้เข้าใจแบบแผนและวิวัฒนาการของโครโมโซมมากขึ้นมีความจำเป็นต้องศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชั่น ในปลาชนิดอื่น ๆ ในปลาวงศ์ อมไข่ให้มากขึ้น

2. การศึกษาขั้นตอนไปควรศึกษายีนฮีสโตน (histone genes) ยีนไรโบโซม (ribosomal RNA genes) ซึ่งยีนเหล่านี้มีประโยชน์ในการศึกษาลักษณะ และรูปแบบของโครโมโซม และเป็นยีนที่พบในปลาทุกชนิดบนโครโมโซมเป็นข้อมูลใหม่ในการสร้างวิวัฒนาการของปลา การตรวจสอบดังกล่าวจะใช้โพรบที่ตรวจสอบแตกต่างกันไป เช่น โพรบที่จำเพาะต่อชนิด โพรบที่จำเพาะต่อโครโมโซม หรือโพรบที่จำเพาะต่อเพศ ซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงปลา

บรรณานุกรม

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

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

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

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

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

อุทัยรัตน์ ณ นคร. (2543). *พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

Amemiya, C. T., & Gold, J. R. (1988). Chromosomal NORs as taxonomic and systematic characters in North American cyprinid fishes.*Genetica,76*, 81-90.

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

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

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

Brum, M. J. I. (1996). Cytogenetic studies of Brazilian marine fish. *Brazilian Journal of Genetics, 19* (3), 421-427.

Brum, M. J. I., & Galetti Jr. P. M. (1997). Teleostei ground plan karyotype. *Jornal of Computational Biology*, *2*, 91-102.

Capistano, T. G., Portela Castro, A. L. B., & Julio–Junior, H. F. (2008). Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Brycon Americus* aff. *iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema andlvaí river, Paraná, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, *31*, 203-207.

Castro, J., Viñas, A., Sánchez, L., & Martínez, P. (1996). Characterization of an atypical NOR site polymorphism in browntrout (*Salmotrutta*) with Ag- and CMA3-staining, and fluorescent *in situ* hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics*, *75*, 234-239.

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

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

Cipriano, R. R., Fenocchio, A. S., Artoni, R. F., Molina, W., Noleto, R. B., Kantek, D. L. Z., & Cestari, M. M. (2008). Chromosomal studies of five species of the marine fishes from the Paranaguá Bay and the karyotypic diversity in the marine teleostei of the Brazilian coast. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *51*(2), 303-314.

Collares-Pereira, M. J., & Ráb, P. (1999). NOR polymorphism in the Iberian species *Chondrostoma lusitanicum* (Pisces:Cyprinidae) re-examination by FISH. *Genetica*, *105*, 301-303.

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

Eschmeyer, W. N. (ed). (2015). *Catalog of Fishes: Genera, Species, References*. Retrieved from http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp.

Fan, Y. S. (2002). *Molecular Cytogenetics Protocols and Applications*. New Jersey: Humana Press.

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

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

Fontana, F., Rossi, R., Lanfredi, M., Arlati, G., & Bronzi, P. (1997). Cytogenetic characterization of cell lines from three sturgeon species. *Caryologia, 50*, 91-95.

Foresti, F., Almeida-Toledo, L. F., & Toledo, S. A. (1989). Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterizationand multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica*, *79*, 107-114.

Froese, R., & Pauly, D. (eds). (2016). *"Apogonidae" in Fishbase*. Retrieved from http://www.fishbase.org,version(06/2016).

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

Galetti Jr., P. M., Foresti, F., Bertollo, L. A. C., & Moreira-Filho, O. (1984). Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. *Caryologia*, *4*, 401-406.

Galetti Jr., P. M., Mestriner, C. A., Monaco, P. J., & Rasch, E. M. (1995). Post–zygotic modifications and intra– and interindividualnucleolar organizing region variation in fish: Report of a case involving *Leporinusfriderici*. *Chromosome Research*, *3*, 285-290.

Gras, D. E., Brassesco, M. S., Markariani, R., Roncati, H. A., Sakamoto–Hojo, E. T., Fenocchio, A. S.,& Pastori, N. C. (2007). Cytogenetic polymorphism in *Prochilodus lineatus* (Pisces: Characiformes) from the middle Paraná RiverSanta Fe City, Argentina. *Comparative Cytogenetics*, *1*, 113-119.

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

Hall, K. J., & Parker, J. S. (1995). Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. *Chromosome Research*, *3*, 417-422.

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

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

Jorge, L. C., & Filho, O. M. (2004). Nucleolar organizer region as markers of chromosomal polymorphism in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*, *57*, 195-199.

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

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

Mantovani, M., Able, L. D. S., & Moreira-Filho, O. (2005). Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localizationrevealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, *123*, 211-216.

Marnane, M. J., & Bellwood, D. R. (2002). Diet and nocturnal foraging in cardinalfishes (Apogonidae) at one tree reef, great barrier reef, Australia. *Marine Ecology Progress Series*, *231*, 261-268.

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

Molina, W. F. (2006). Chromosomal changes and stasis in marine fish groups. In E. Pisano, C. Ozouf-Costaz, F. Foresti, & B.G. Kapoor (Eds.), *Fish cytogenetics* (pp. 69-110). Enfield: Science Publishers.

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

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

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

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

Ozouf-Costaz, C., Pisano, E. Thaeron, C., & Hureau, J-C. (1997). Antarctic fish chromosome banding: significance for evolutionary studies. *Cybium*, *21*, 399-409.

Paintner-Marques, T. R., Giuliano-Caetano, L., & Dias, A. L. (2002).Multiple NORs in *Brycon americus* aff. *Exodon* (Osteichthyes, Characidae, Teuagonopterinae). *Hereditas*, *137*, 107-112.

Phimphan, S., Tanomtong, A., Jumrusthanasan, S., Supiwong, W., Siripiyasing, P., & Sanoamuang, L. (2013). First report of NORs polymorphism and chromosome analysis of John's napper, *Lutjanus johnii* (Perciformes, Lutjanidae) in Thailand. *Cytologia***,** *78*(4), 335-344.

Reed, M. K., & Phillips, R. B. (1997). Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the putative sex chromosomes of Arctic char (*Salvelinus alpines*) is not sex related. *Chromosome Research*, *5*, 221-227.

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

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

Rivlin, K. A., Rachlin, J. W., & Dale, G. (1987). Intraspecific chromosomal variation in *Apogon binotatus* (Perciformes: Apogonidae) from the Florida Keys and St. Croix. *Annals of New York Academy of Sciences*, *494*, 263-265.

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

Rossi, A. R., Gornung, E., Crosetti, D., Innocentti, S., & Sola, L. (2000). Cytogenetic analysis of *Oedalechilus labeo* (Pisces: Muglidae), with a report of NOR variability. *Marine Biology*, *136*, 159-162.

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

Saravanan, R., Vijayanand, P., Vagelli, A. A., Murugan, A., Shanker, S., Rajagopal, S., & Balasubramanian, T. (2013). Breeding and rearing of the two striped cardinalfish, *Apogon uadrifasciatus* (Cuvier, 1828) in captive condition. *Animal Reproduction Science*, *137*, 237- 244.

Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños, F., & Feón, P. (1995).Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). *Cytogenetics and Cell Genetics*, *69*, 18-26.

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

Soza, I. L., Galian, J., De La Rua, P., Bertollo, L. A. C., & Moreira-Filho, O. (2001). Non-random distribution and nucleolarrDNA sites on *Astyanaxs cabripinnis* chromosomes. *Cytologia*, *66*, 85-91.

Supiwong, W., Tanomtong, A., Supanuam, P., Jantarat, S., Khakhong, S., & Sanoamuang, S. (2012). A discovery of nucleolarorganizer regions (NORs) polymorphism and karyological analysis of Smith's barb, *Puntioplites proctozysron* (Cypriniformes, Cyprinidae) in Thailand. *Cytologia*, *77*, 35-42.

Suzuki, H., Kurihara, Y., Kanemisha, Y., & Moriwaki, K. (1990). Variation in the distribution of silver–staining nucleolar organizer regions on the chromosomes of the wild mouse *Mus musculus*. *Molecular Biology and Evolution*, *7*, 271-282.

Turpin, R., & Lejeune, J. (1965). *Les Chromosomes Humains*. Paris: Gauthier-pillars.

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

Vitturi, R., Catalano, E., Colomba, M. S., Montagnino, L., & Pellerito, L. (1995). Karyotype analysis of *Aphanius fasciatus* (Pisces: Cyprinodontiformes): Ag-NORs and C-band polymorphism in four populations from Sicily. *Biologisches Zentralblatt*, *114*, 392-402.

Vitturi, R., Colomba, M., Vizzini, S., Libertini, A., Barbieri, R., & Mazzola, A. (2005). Chromosomal location polymorphism of major rDNA sites in two Mediterranean populations of the killifish *Aphanius fasciatus* (Pisces:Cyprinodontidae). *Micron*, *36*, 243-246.

Volleth, M. (1987). Differences in the location of nucleolus organizer regions in European vespertilionid bats. *Cytogenetics and Cell Genetics*, *44*, 186-197.

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

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารต่าง ๆ

การเตรียมสารต่าง ๆ

1. การเตรียม Hypotonic solution 0.075 M HCl

ชั่งผลึก KCl 0.5588 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าจนผลึกละลายหมด เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง (น้ำยานี้มีอายุการใช้งาน 1-2 สัปดาห์)

2. การเตรียม Colchicine ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง colchicine 0.005 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

3. ***การเตรียม Fixative***

ใช้ glacial acetic acid 1 ส่วน ผสมกับ absolute methanol 3 ส่วน เก็บใส่ขวดแช่ในตู้เย็น

4. การเตรียมสีย้อม Giemsa 10%

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

5. การเตรียม Sorensen buffer

Stock solution A : ใช้ KH_2PO_4 9.1 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

Stock solution B : ใช้ $NaHPO_4$ 9.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

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

6. การเตรียมสารละลาย 1 N HCl

ใช้ Conc. HCl จำนวน 41.46 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 458.54 มิลลิลิตร โดยค่อยๆรินกรด HCl ใส่ลงในน้ำกลั่น

7. การเตรียมสารละลาย 1 N NaOH

ชั่งผลึก NaOH 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. การเตรียมสารละลาย 1M $MgCl_2$

ชั่งผลึก $MgCl_2$ 47.6 กรัมละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. การเตรียมสารละลายซาลีนโซเดียมซิเตรท 20 เท่า (20xSSC)

ชั่ง NaCl 175.32 กรัม และ Trisodium 88.23 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 ด้วย HCl หรือ NaOH

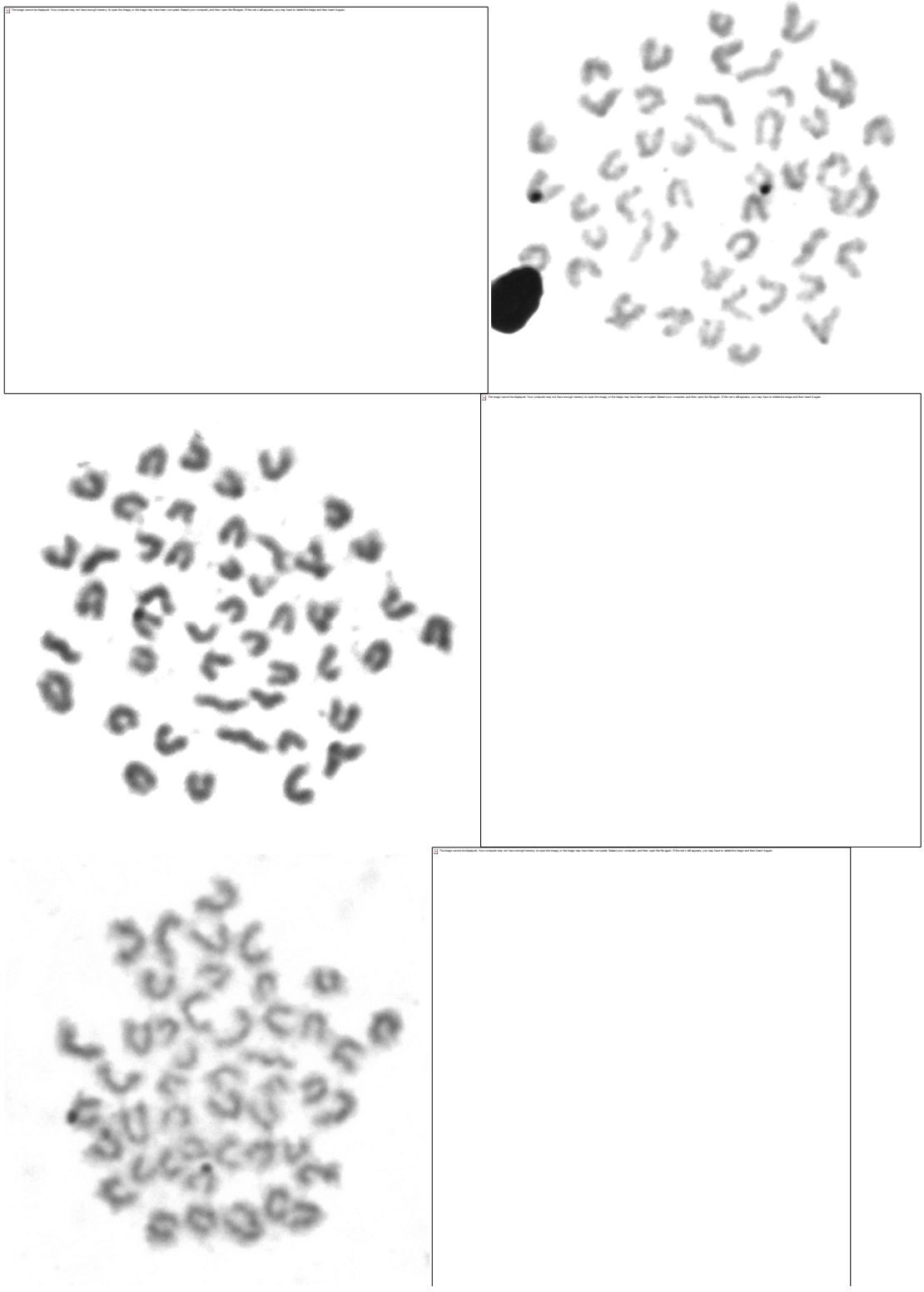
10. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (PBS)

ชั่ง NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g , Na_2HPO_4 1.25 g และ KH_2PO_4 0.2 g นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ pH 7.4

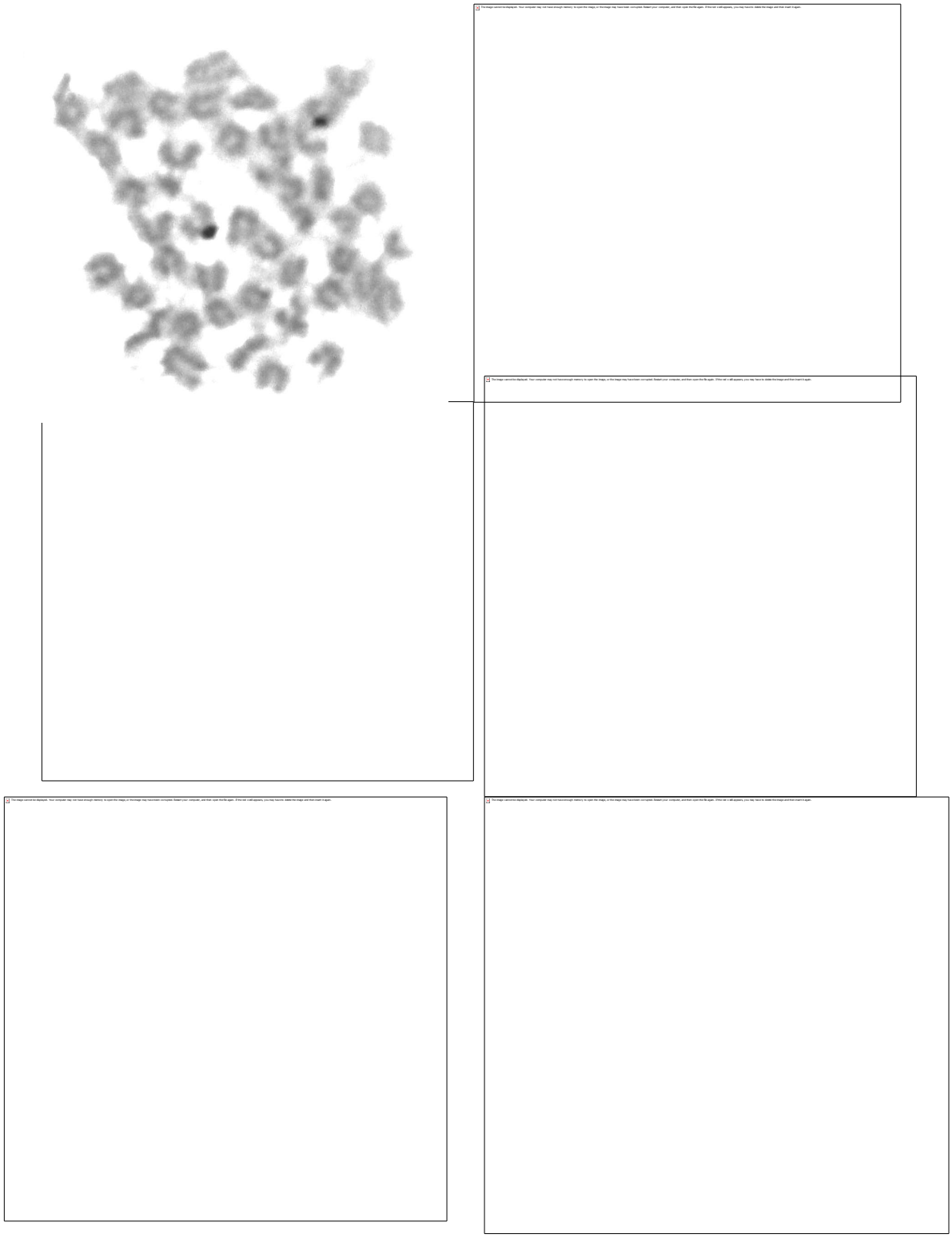
ภาคผนวก ข

ภาพโครโมโซมระยะเมทาเฟส และตารางการวัดค่าความยาวของโครโมโซม
ปลาอมไข่ทั้ง 4 ชนิด

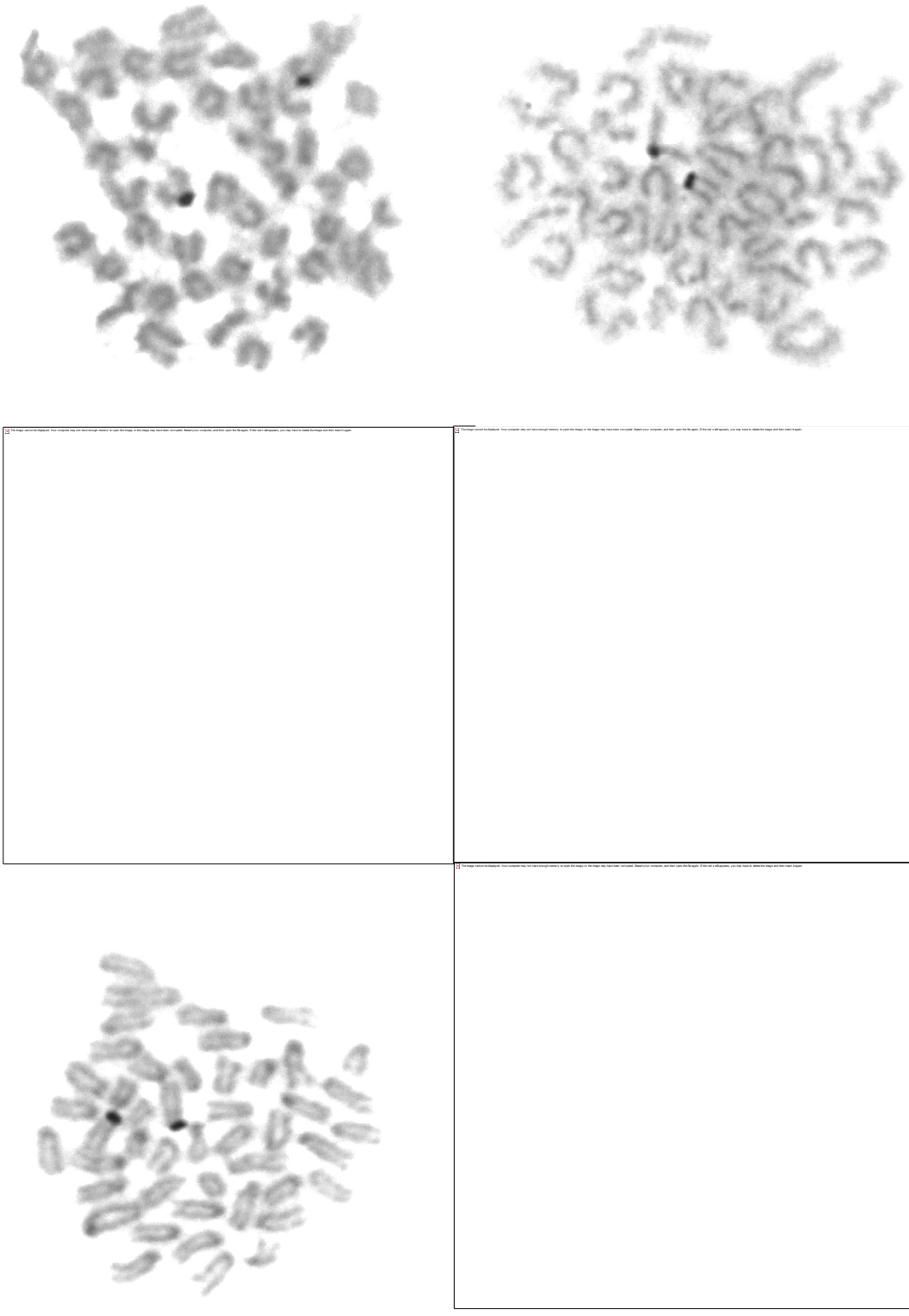
ภาพภาคผนวก ข -1 เซลล์เมทาเฟส ปลาอมไข่ตาดำเพศผู้



ภาพภาคผนวก ข -2 เซลล์เมทาเฟส ปลาอมไข่ตาดำเพศผู้



ภาพภาคผนวก ข-3 เซลล์เมทาเฟส ปลาอมไข่ตาดำเพศเมีย



ภาพภาคผนวก ข-4 เซลล์เมทาเฟส ปลาอมไข่ตาดำเพศเมีย

ตารางภาคผนวก ข-1 ความยาวของโครโมโซมปลาอมไข่ตาดำ เพศผู้ เซลล์ที่ 1-11

เซลล์ที่ 1

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.304	0.797	1.101	0.026	0.724	a	ใหญ่
2	0.275	0.865	1.141	0.027	0.759	a	ใหญ่
3	0.277	0.666	0.942	0.022	0.706	a	ใหญ่
4	0.215	0.668	0.883	0.021	0.757	a	ใหญ่
5	0.000	1.208	1.208	0.029	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.024	1.024	0.024	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	0.994	0.994	0.024	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	0.979	0.979	0.023	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	0.927	0.927	0.022	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	0.921	0.921	0.022	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	0.915	0.915	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	0.911	0.911	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	0.910	0.910	0.022	1.000	t	กลาง
14	0.000	0.901	0.901	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	0.898	0.898	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	0.878	0.878	0.021	1.000	t	กลาง
17	0.000	0.811	0.811	0.019	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.800	0.800	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.760	0.760	0.018	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.752	0.752	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.745	0.745	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.713	0.713	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.660	0.660	0.016	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

เซลล์ที่ 2

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.347	0.787	1.134	0.027	0.694	a	ใหญ่
2	0.300	0.792	1.091	0.026	0.725	a	ใหญ่
3	0.257	0.746	1.003	0.024	0.744	a	ใหญ่
4	0.240	0.633	0.874	0.021	0.725	a	ใหญ่
5	0.000	1.254	1.254	0.030	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.138	1.138	0.027	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.125	1.125	0.027	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	0.968	0.968	0.023	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	0.948	0.948	0.022	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	0.936	0.936	0.022	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	0.922	0.922	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	0.899	0.899	0.021	1.000	t	กลาง
13	0.000	0.896	0.896	0.021	1.000	t	กลาง
14	0.000	0.894	0.894	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	0.864	0.864	0.020	1.000	t	กลาง
16	0.000	0.835	0.835	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	0.823	0.823	0.019	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.804	0.804	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.773	0.773	0.018	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.750	0.750	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.738	0.738	0.017	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.700	0.700	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.626	0.626	0.015	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

เซลล์ที่ 3

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.358	0.792	1.150	0.027	0.688	a	ใหญ่
2	0.341	0.899	1.240	0.029	0.725	a	ใหญ่
3	0.251	0.791	1.042	0.025	0.759	a	ใหญ่
4	0.242	0.635	0.877	0.021	0.724	a	ใหญ่
5	0.000	1.273	1.273	0.030	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.176	1.176	0.028	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.134	1.134	0.027	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	0.972	0.972	0.023	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	0.949	0.949	0.022	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	0.940	0.940	0.022	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	0.930	0.930	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	0.901	0.901	0.021	1.000	t	กลาง
13	0.000	0.896	0.896	0.021	1.000	t	กลาง
14	0.000	0.895	0.895	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	0.890	0.890	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	0.850	0.850	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	0.830	0.830	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.815	0.815	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.784	0.784	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.756	0.756	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.747	0.747	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.722	0.722	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.633	0.633	0.015	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

เซลล์ที่ 4

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.215	0.492	0.708	0.025	0.696	a	ใหญ่
2	0.202	0.581	0.784	0.028	0.742	a	ใหญ่
3	0.170	0.525	0.695	0.025	0.755	a	ใหญ่
4	0.177	0.457	0.634	0.023	0.720	a	ใหญ่
5	0.000	0.972	0.972	0.035	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	0.685	0.685	0.024	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	0.671	0.671	0.024	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	0.662	0.662	0.024	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	0.652	0.652	0.023	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	0.636	0.636	0.023	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	0.626	0.626	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	0.615	0.615	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	0.602	0.602	0.021	1.000	t	กลาง
14	0.000	0.595	0.595	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	0.563	0.563	0.020	1.000	t	กลาง
16	0.000	0.556	0.556	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	0.552	0.552	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.535	0.535	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.532	0.532	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.516	0.516	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.498	0.498	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.488	0.488	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.474	0.474	0.017	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

เซลล์ที่ 5

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.375	1.012	1.387	0.028	0.730	a	ใหญ่
2	0.325	0.867	1.191	0.024	0.728	a	ใหญ่
3	0.332	0.880	1.212	0.025	0.726	a	ใหญ่
4	0.309	0.752	1.061	0.022	0.709	a	ใหญ่
5	0.000	1.455	1.455	0.030	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.283	1.283	0.026	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.196	1.196	0.024	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.128	1.128	0.023	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.096	1.096	0.022	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.092	1.092	0.022	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.089	1.089	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.074	1.074	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.068	1.068	0.022	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.059	1.059	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	1.049	1.049	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	1.030	1.030	0.021	1.000	t	กลาง
17	0.000	0.991	0.991	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.940	0.940	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.913	0.913	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.884	0.884	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.849	0.849	0.017	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.750	0.750	0.015	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.605	0.605	0.012	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

เซลล์ที่ 6

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.361	1.033	1.394	0.028	0.741	a	ใหญ่
2	0.345	0.893	1.238	0.025	0.721	a	ใหญ่
3	0.360	0.901	1.262	0.026	0.714	a	ใหญ่
4	0.300	0.787	1.087	0.022	0.724	a	ใหญ่
5	0.000	1.483	1.483	0.030	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.329	1.329	0.027	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.230	1.230	0.025	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.150	1.150	0.023	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.101	1.101	0.022	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.095	1.095	0.022	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.091	1.091	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.078	1.078	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.070	1.070	0.022	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.066	1.066	0.022	1.000	t	กลาง
15	0.000	1.059	1.059	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	1.038	1.038	0.021	1.000	t	กลาง
17	0.000	1.011	1.011	0.021	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.959	0.959	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.919	0.919	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.900	0.900	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.864	0.864	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.787	0.787	0.016	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.641	0.641	0.013	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

เซลล์ที่ 7

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.297	1.174	1.472	0.025	0.798	a	ใหญ่
2	0.278	1.160	1.437	0.024	0.807	a	ใหญ่
3	0.279	1.070	1.349	0.023	0.793	a	ใหญ่
4	0.300	0.941	1.241	0.021	0.758	a	ใหญ่
5	0.000	1.862	1.862	0.032	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.629	1.629	0.028	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.473	1.473	0.025	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.434	1.434	0.024	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.409	1.409	0.024	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.327	1.327	0.023	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.297	1.297	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.282	1.282	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.250	1.250	0.021	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.241	1.241	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	1.233	1.233	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	1.212	1.212	0.021	1.000	t	กลาง
17	0.000	1.192	1.192	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.118	1.118	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.000	1.000	0.017	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.990	0.990	0.017	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.960	0.960	0.016	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.883	0.883	0.015	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.835	0.835	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

เซลล์ที่ 8

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.275	0.832	1.107	0.025	0.751	a	ใหญ่
2	0.242	0.758	1.000	0.023	0.758	a	ใหญ่
3	0.298	0.736	1.033	0.023	0.712	a	ใหญ่
4	0.235	0.651	0.886	0.020	0.735	a	ใหญ่
5	0.000	1.280	1.280	0.029	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.145	1.145	0.026	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.078	1.078	0.024	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.066	1.066	0.024	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.034	1.034	0.023	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	0.977	0.977	0.022	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	0.973	0.973	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	0.940	0.940	0.021	1.000	t	กลาง
13	0.000	0.934	0.934	0.021	1.000	t	กลาง
14	0.000	0.899	0.899	0.020	1.000	t	กลาง
15	0.000	0.888	0.888	0.020	1.000	t	กลาง
16	0.000	0.880	0.880	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	0.872	0.872	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.861	0.861	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.853	0.853	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.828	0.828	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.825	0.825	0.019	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.780	0.780	0.018	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.743	0.743	0.017	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

เซลล์ที่ 9

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.255	1.070	1.326	0.025	0.807	a	ใหญ่
2	0.295	0.982	1.277	0.024	0.769	a	ใหญ่
3	0.301	0.931	1.233	0.023	0.755	a	ใหญ่
4	0.242	0.915	1.157	0.022	0.791	a	ใหญ่
5	0.000	1.847	1.847	0.035	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.339	1.339	0.025	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.324	1.324	0.025	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.271	1.271	0.024	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.260	1.260	0.024	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.233	1.233	0.023	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.203	1.203	0.023	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.187	1.187	0.023	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.172	1.172	0.022	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.167	1.167	0.022	1.000	t	กลาง
15	0.000	1.130	1.130	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	1.080	1.080	0.021	1.000	t	กลาง
17	0.000	1.020	1.020	0.019	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.978	0.978	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.930	0.930	0.018	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.903	0.903	0.017	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.883	0.883	0.017	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.796	0.796	0.015	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.766	0.766	0.015	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

เซลล์ที่ 10

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.223	1.072	1.295	0.025	0.828	a	ใหญ่
2	0.209	1.031	1.240	0.024	0.831	a	ใหญ่
3	0.289	0.967	1.256	0.024	0.770	a	ใหญ่
4	0.287	0.966	1.252	0.024	0.771	a	ใหญ่
5	0.000	1.596	1.596	0.031	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.357	1.357	0.026	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.321	1.321	0.025	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.306	1.306	0.025	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.274	1.274	0.024	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.253	1.253	0.024	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.222	1.222	0.023	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.173	1.173	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.111	1.111	0.021	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.092	1.092	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	1.070	1.070	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	1.041	1.041	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	1.023	1.023	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.983	0.983	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.918	0.918	0.018	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.842	0.842	0.016	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.830	0.830	0.016	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.789	0.789	0.015	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.513	0.513	0.010	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

เซลล์ที่ 11

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.364	1.867	2.231	0.026	0.837	a	ใหญ่
2	0.377	1.697	2.074	0.024	0.818	a	ใหญ่
3	0.455	1.474	1.930	0.022	0.764	a	ใหญ่
4	0.484	1.400	1.884	0.022	0.743	a	ใหญ่
5	0.000	2.471	2.471	0.029	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	2.142	2.142	0.025	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	2.077	2.077	0.024	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	2.002	2.002	0.023	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.948	1.948	0.023	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.926	1.926	0.022	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.908	1.908	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.871	1.871	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.829	1.829	0.021	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.810	1.810	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	1.797	1.797	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	1.771	1.771	0.021	1.000	t	กลาง
17	0.000	1.757	1.757	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.725	1.725	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.639	1.639	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	1.598	1.598	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	1.580	1.580	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	1.495	1.495	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	1.282	1.282	0.015	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-2 ความยาวของโครโมโซมปลาอมไข่ตาดำ เพศเมียเซลล์ที่ 1-11

เซลล์ที่ 1

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.269	0.915	1.185	0.026	0.773	a	ใหญ่
2	0.335	1.009	1.344	0.029	0.751	a	ใหญ่
3	0.215	0.942	1.158	0.025	0.814	a	ใหญ่
4	0.285	0.765	1.050	0.023	0.729	a	ใหญ่
5	0.000	1.467	1.467	0.032	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.187	1.187	0.026	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.115	1.115	0.024	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.070	1.070	0.023	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.050	1.050	0.023	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.031	1.031	0.022	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.009	1.009	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	0.963	0.963	0.021	1.000	t	กลาง
13	0.000	0.958	0.958	0.021	1.000	t	กลาง
14	0.000	0.943	0.943	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	0.926	0.926	0.020	1.000	t	กลาง
16	0.000	0.919	0.919	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	0.908	0.908	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.901	0.901	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.866	0.866	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.832	0.832	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.814	0.814	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.783	0.783	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.720	0.720	0.016	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

เซลล์ที่ 2

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.264	0.632	0.896	0.027	0.705	a	ใหญ่
2	0.242	0.602	0.843	0.025	0.714	a	ใหญ่
3	0.221	0.532	0.753	0.022	0.707	a	ใหญ่
4	0.228	0.484	0.712	0.021	0.680	a	ใหญ่
5	0.000	1.123	1.123	0.033	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	0.851	0.851	0.025	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	0.824	0.824	0.024	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	0.783	0.783	0.023	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	0.774	0.774	0.023	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	0.748	0.748	0.022	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	0.738	0.738	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	0.733	0.733	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	0.728	0.728	0.022	1.000	t	กลาง
14	0.000	0.722	0.722	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	0.696	0.696	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	0.672	0.672	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	0.658	0.658	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.652	0.652	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.648	0.648	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.624	0.624	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.622	0.622	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.600	0.600	0.018	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.560	0.560	0.017	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

เซลล์ที่ 3

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.297	0.978	1.275	0.026	0.767	a	ใหญ่
2	0.329	0.895	1.224	0.025	0.731	a	ใหญ่
3	0.278	0.967	1.245	0.025	0.777	a	ใหญ่
4	0.290	0.829	1.119	0.023	0.741	a	ใหญ่
5	0.000	1.446	1.446	0.029	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.366	1.366	0.028	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.219	1.219	0.025	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.176	1.176	0.024	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.127	1.127	0.023	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.124	1.124	0.023	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.085	1.085	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.079	1.079	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.060	1.060	0.022	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.010	1.010	0.020	1.000	t	กลาง
15	0.000	0.988	0.988	0.020	1.000	t	กลาง
16	0.000	0.973	0.973	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	0.918	0.918	0.019	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.885	0.885	0.018	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.842	0.842	0.017	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.834	0.834	0.017	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.785	0.785	0.016	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.741	0.741	0.015	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.712	0.712	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

เซลล์ที่ 4

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.466	1.297	1.763	0.030	0.736	a	ใหญ่
2	0.318	1.177	1.495	0.025	0.788	a	ใหญ่
3	0.464	1.101	1.565	0.026	0.704	a	ใหญ่
4	0.380	1.165	1.545	0.026	0.754	a	ใหญ่
5	0.000	1.620	1.620	0.027	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.474	1.474	0.025	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.438	1.438	0.024	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.409	1.409	0.024	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.384	1.384	0.023	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.371	1.371	0.023	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.359	1.359	0.023	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.317	1.317	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.289	1.289	0.022	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.245	1.245	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	1.226	1.226	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	1.212	1.212	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	1.160	1.160	0.019	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.036	1.036	0.017	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.029	1.029	0.017	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.985	0.985	0.016	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.942	0.942	0.016	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.899	0.899	0.015	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.829	0.829	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

เซลล์ที่ 5

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.323	0.865	1.188	0.026	0.728	a	ใหญ่
2	0.318	0.961	1.279	0.028	0.752	a	ใหญ่
3	0.296	0.863	1.159	0.026	0.745	a	ใหญ่
4	0.277	0.876	1.153	0.026	0.760	a	ใหญ่
5	0.000	1.396	1.396	0.031	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.193	1.193	0.027	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.060	1.060	0.024	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.055	1.055	0.023	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.002	1.002	0.022	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	0.984	0.984	0.022	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	0.981	0.981	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	0.968	0.968	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	0.944	0.944	0.021	1.000	t	กลาง
14	0.000	0.930	0.930	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	0.901	0.901	0.020	1.000	t	กลาง
16	0.000	0.899	0.899	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	0.877	0.877	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.873	0.873	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.866	0.866	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.857	0.857	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.748	0.748	0.017	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.729	0.729	0.016	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.717	0.717	0.016	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

เซลล์ที่ 6

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.300	1.256	1.556	0.026	0.807	a	ใหญ่
2	0.342	1.085	1.427	0.024	0.760	a	ใหญ่
3	0.286	1.140	1.426	0.024	0.799	a	ใหญ่
4	0.276	1.122	1.397	0.024	0.803	a	ใหญ่
5	0.000	1.980	1.980	0.033	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.587	1.587	0.027	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.532	1.532	0.026	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.456	1.456	0.025	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.438	1.438	0.024	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.424	1.424	0.024	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.403	1.403	0.024	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.301	1.301	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.290	1.290	0.022	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.279	1.279	0.022	1.000	t	กลาง
15	0.000	1.253	1.253	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	1.235	1.235	0.021	1.000	t	กลาง
17	0.000	1.154	1.154	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.077	1.077	0.018	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.054	1.054	0.018	1.000	t	กลาง
20	0.000	1.016	1.016	0.017	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.896	0.896	0.015	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.858	0.858	0.015	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.835	0.835	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

เซลล์ที่ 7

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.292	1.246	1.537	0.026	0.810	a	ใหญ่
2	0.328	1.030	1.357	0.023	0.759	a	ใหญ่
3	0.289	1.134	1.423	0.024	0.797	a	ใหญ่
4	0.294	1.054	1.348	0.023	0.782	a	ใหญ่
5	0.000	1.825	1.825	0.031	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.572	1.572	0.027	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.529	1.529	0.026	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.445	1.445	0.024	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.437	1.437	0.024	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.414	1.414	0.024	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.326	1.326	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.293	1.293	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.280	1.280	0.022	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.271	1.271	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	1.252	1.252	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	1.191	1.191	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	1.138	1.138	0.019	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.062	1.062	0.018	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.038	1.038	0.018	1.000	t	กลาง
20	0.000	1.014	1.014	0.017	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.888	0.888	0.015	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.846	0.846	0.014	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.810	0.810	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

เซลล์ที่ 8

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.333	1.087	1.420	0.029	0.766	a	ใหญ่
2	0.251	0.863	1.114	0.023	0.775	a	ใหญ่
3	0.227	0.893	1.119	0.023	0.797	a	ใหญ่
4	0.262	0.852	1.114	0.023	0.765	a	ใหญ่
5	0.000	1.218	1.218	0.025	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.203	1.203	0.025	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.125	1.125	0.023	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.120	1.120	0.023	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.109	1.109	0.023	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.098	1.098	0.022	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.091	1.091	0.022	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.087	1.087	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.058	1.058	0.022	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.044	1.044	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	1.041	1.041	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	1.027	1.027	0.021	1.000	t	กลาง
17	0.000	1.006	1.006	0.021	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.973	0.973	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.908	0.908	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.901	0.901	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.854	0.854	0.017	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.834	0.834	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.763	0.763	0.016	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

เซลล์ที่ 9

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.403	1.187	1.590	0.030	0.746	a	ใหญ่
2	0.282	0.935	1.217	0.023	0.768	a	ใหญ่
3	0.378	0.986	1.364	0.025	0.723	a	ใหญ่
4	0.361	0.946	1.306	0.024	0.724	a	ใหญ่
5	0.000	1.882	1.882	0.035	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.371	1.371	0.026	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.345	1.345	0.025	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.319	1.319	0.025	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.259	1.259	0.023	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.242	1.242	0.023	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.223	1.223	0.023	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.204	1.204	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.157	1.157	0.022	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.128	1.128	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	1.118	1.118	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	1.075	1.075	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	1.032	1.032	0.019	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.019	1.019	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.012	1.012	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.946	0.946	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.889	0.889	0.017	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.775	0.775	0.014	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.734	0.734	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

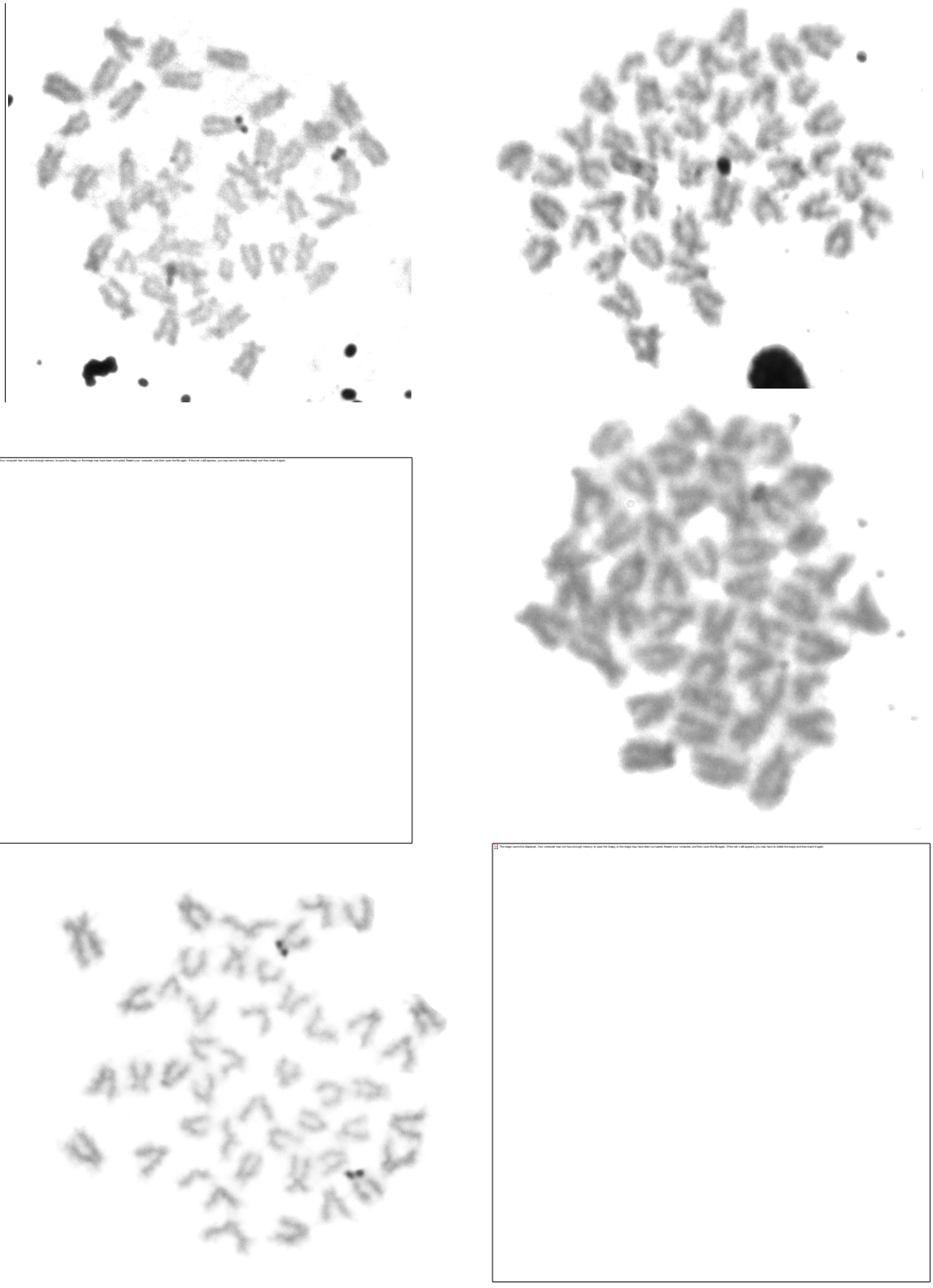
เซลล์ที่ 10

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.408	1.129	1.537	0.029	0.734	a	ใหญ่
2	0.270	0.901	1.171	0.022	0.769	a	ใหญ่
3	0.307	1.055	1.362	0.025	0.775	a	ใหญ่
4	0.318	0.920	1.237	0.023	0.743	a	ใหญ่
5	0.000	1.541	1.541	0.029	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.358	1.358	0.025	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.333	1.333	0.025	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.302	1.302	0.024	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.254	1.254	0.023	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.226	1.226	0.023	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.213	1.213	0.023	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.201	1.201	0.022	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.140	1.140	0.021	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.124	1.124	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	1.111	1.111	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	1.057	1.057	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	1.020	1.020	0.019	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.016	1.016	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.011	1.011	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.901	0.901	0.017	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.878	0.878	0.016	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.753	0.753	0.014	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.703	0.703	0.013	1.000	t	เล็ก

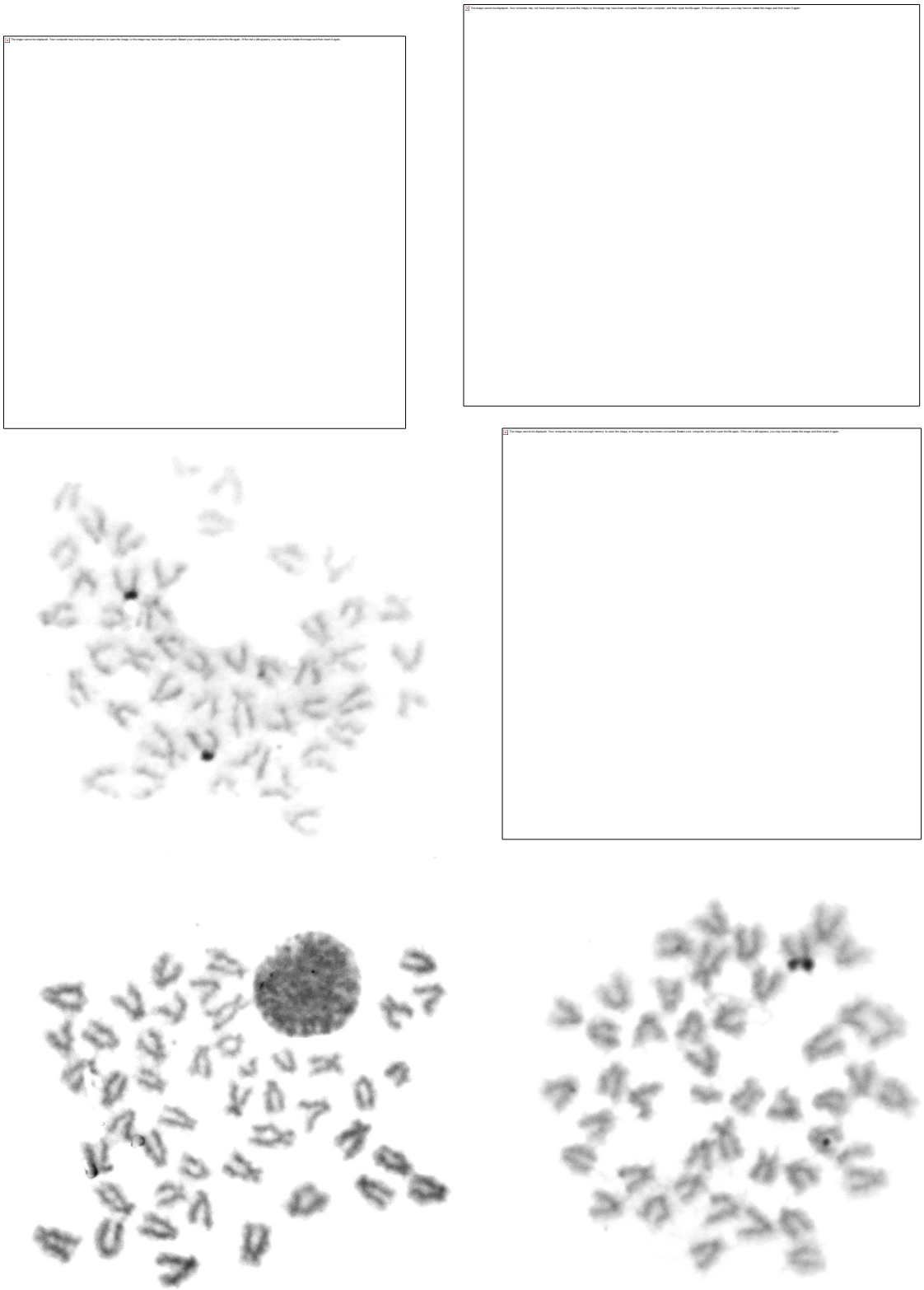
ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

เซลล์ที่ 11

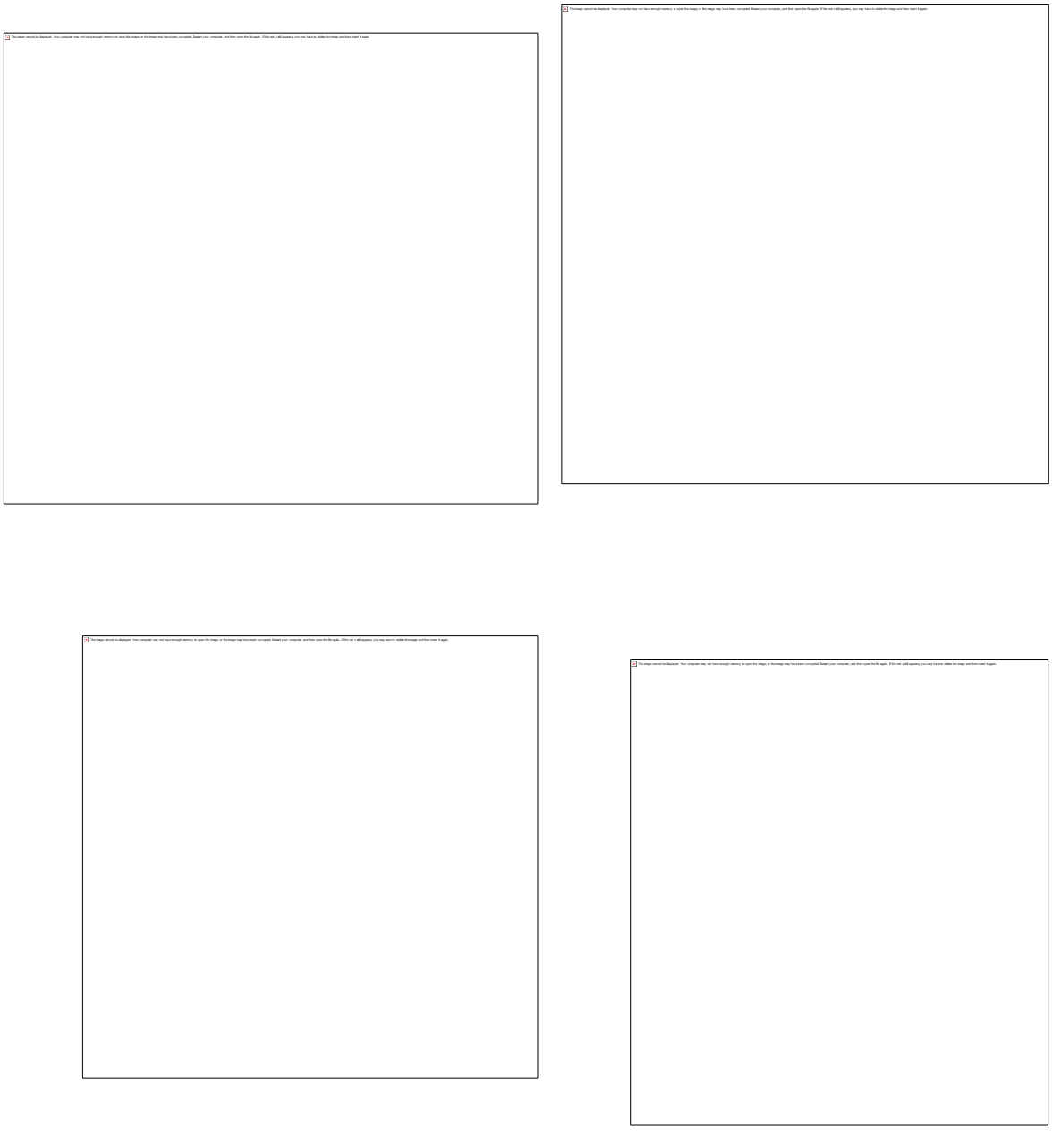
โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.307	1.201	1.508	0.025	0.797	a	ใหญ่
2	0.297	1.287	1.585	0.026	0.812	a	ใหญ่
3	0.329	1.150	1.479	0.025	0.778	a	ใหญ่
4	0.263	1.011	1.274	0.021	0.794	a	ใหญ่
5	0.000	1.644	1.644	0.027	1.000	t	ใหญ่
6	0.000	1.545	1.545	0.026	1.000	t	ใหญ่
7	0.000	1.518	1.518	0.025	1.000	t	ใหญ่
8	0.000	1.475	1.475	0.025	1.000	t	ใหญ่
9	0.000	1.449	1.449	0.024	1.000	t	ใหญ่
10	0.000	1.440	1.440	0.024	1.000	t	ใหญ่
11	0.000	1.404	1.404	0.023	1.000	t	กลาง
12	0.000	1.384	1.384	0.023	1.000	t	กลาง
13	0.000	1.282	1.282	0.021	1.000	t	กลาง
14	0.000	1.243	1.243	0.021	1.000	t	กลาง
15	0.000	1.239	1.239	0.021	1.000	t	กลาง
16	0.000	1.223	1.223	0.020	1.000	t	กลาง
17	0.000	1.219	1.219	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.184	1.184	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.101	1.101	0.018	1.000	t	กลาง
20	0.000	1.061	1.061	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	1.022	1.022	0.017	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.931	0.931	0.016	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.509	0.509	0.009	1.000	t	เล็ก



ภาพภาคผนวก ข-5 โครโมโซมระยะเมทาเฟสปลาอมไข่ตาฟ้า



ภาพภาคผนวก ข-6 โครโมโซมระยะเมทาเฟสปลาอมไข่ตาฟ้า



ภาพภาคผนวก ข-7 โครโมโซมระยะเมทาเฟสปลาอมไข่ตาฟ้า

ตารางภาคผนวก ข-3 ความยาวโครโมโซมปลาอมไข่ตาฟ้า เซลล์ที่ 1-16

เซลล์ที่ 1

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.440	1.173	1.614	0.029	0.727	sm	ใหญ่
2	0.527	0.709	1.237	0.022	0.574	sm	ใหญ่
3	0.428	0.808	1.236	0.022	0.655	sm	ใหญ่
4	0.410	0.675	1.085	0.019	0.622	sm	ใหญ่
5	0.384	0.910	1.294	0.023	0.703	a	ใหญ่
6	0.408	0.855	1.263	0.023	0.678	a	ใหญ่
7	0.336	0.901	1.237	0.022	0.728	a	ใหญ่
8	0.328	0.892	1.220	0.022	0.731	a	ใหญ่
9	0.376	0.819	1.195	0.021	0.685	a	ใหญ่
10	0.361	0.805	1.167	0.021	0.691	a	ใหญ่
11	0.314	0.753	1.067	0.019	0.705	a	กลาง
12	0.000	1.342	1.342	0.024	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.321	1.321	0.024	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.303	1.303	0.023	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.291	1.291	0.023	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.274	1.274	0.023	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.234	1.234	0.022	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.217	1.217	0.022	1	t	กลาง
19	0.000	1.180	1.180	0.021	1	t	กลาง
20	0.000	1.140	1.140	0.020	1	t	กลาง
21	0.000	1.096	1.096	0.020	1	t	กลาง
22	0.000	1.017	1.017	0.018	1	t	กลาง
23	0.000	0.905	0.905	0.016	1	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 2

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.534	1.392	1.926	0.029	0.723	sm	ใหญ่
2	0.567	1.065	1.632	0.025	0.653	sm	ใหญ่
3	0.533	1.039	1.572	0.024	0.661	sm	ใหญ่
4	0.437	0.994	1.431	0.022	0.695	sm	ใหญ่
5	0.461	1.200	1.660	0.025	0.723	a	ใหญ่
6	0.452	1.155	1.607	0.024	0.719	a	ใหญ่
7	0.437	1.155	1.592	0.024	0.725	a	ใหญ่
8	0.399	1.165	1.564	0.024	0.745	a	ใหญ่
9	0.381	1.094	1.475	0.022	0.742	a	ใหญ่
10	0.388	1.012	1.399	0.021	0.723	a	ใหญ่
11	0.391	0.943	1.335	0.020	0.707	a	กลาง
12	0.000	1.600	1.600	0.024	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.459	1.459	0.022	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.442	1.442	0.022	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.436	1.436	0.022	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.410	1.410	0.021	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.391	1.391	0.021	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.341	1.341	0.020	1	t	กลาง
19	0.000	1.317	1.317	0.020	1	t	กลาง
20	0.000	1.291	1.291	0.020	1	t	กลาง
21	0.000	1.149	1.149	0.017	1	t	กลาง
22	0.000	1.034	1.034	0.016	1	t	กลาง
23	0.000	0.900	0.900	0.014	1	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 3

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.710	1.297	2.007	0.027	0.646	sm	ใหญ่
2	0.651	1.161	1.812	0.024	0.641	sm	ใหญ่
3	0.621	1.095	1.716	0.023	0.638	sm	ใหญ่
4	0.616	0.994	1.610	0.022	0.618	sm	ใหญ่
5	0.619	1.239	1.858	0.025	0.667	a	ใหญ่
6	0.535	1.163	1.698	0.023	0.685	a	ใหญ่
7	0.570	1.084	1.654	0.022	0.655	a	ใหญ่
8	0.556	1.122	1.678	0.022	0.669	a	ใหญ่
9	0.560	1.100	1.660	0.022	0.662	a	ใหญ่
10	0.556	1.080	1.636	0.022	0.660	a	ใหญ่
11	0.419	1.141	1.560	0.021	0.731	a	กลาง
12	0.000	1.795	1.795	0.024	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.742	1.742	0.023	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.662	1.662	0.022	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.624	1.624	0.022	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.600	1.600	0.021	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.576	1.576	0.021	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.531	1.531	0.021	1	t	กลาง
19	0.000	1.511	1.511	0.020	1	t	กลาง
20	0.000	1.477	1.477	0.020	1	t	กลาง
21	0.000	1.428	1.428	0.019	1	t	กลาง
22	0.000	1.415	1.415	0.019	1	t	กลาง
23	0.000	1.070	1.070	0.014	1	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 4

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.769	1.258	2.026	0.030	0.621	sm	ใหญ่
2	0.608	1.043	1.651	0.025	0.632	sm	ใหญ่
3	0.568	0.970	1.537	0.023	0.631	sm	ใหญ่
4	0.668	1.222	1.889	0.028	0.646	sm	ใหญ่
5	0.477	1.213	1.690	0.025	0.718	a	ใหญ่
6	0.439	1.203	1.642	0.024	0.733	a	ใหญ่
7	0.568	1.062	1.630	0.024	0.652	a	ใหญ่
8	0.524	1.009	1.533	0.023	0.658	a	ใหญ่
9	0.436	0.975	1.411	0.021	0.691	a	ใหญ่
10	0.430	0.943	1.373	0.020	0.687	a	ใหญ่
11	0.404	0.911	1.315	0.020	0.693	a	กลาง
12	0.000	1.610	1.610	0.024	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.539	1.539	0.023	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.503	1.503	0.022	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.409	1.409	0.021	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.371	1.371	0.020	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.317	1.317	0.020	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.303	1.303	0.019	1	t	กลาง
19	0.000	1.262	1.262	0.019	1	t	กลาง
20	0.000	1.221	1.221	0.018	1	t	กลาง
21	0.000	1.194	1.194	0.018	1	t	กลาง
22	0.000	1.174	1.174	0.017	1	t	กลาง
23	0.000	1.000	1.000	0.015	1	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 5

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.588	1.067	1.655	0.029	0.645	sm	ใหญ่
2	0.566	1.000	1.565	0.027	0.638	sm	ใหญ่
3	0.481	0.824	1.305	0.022	0.631	sm	ใหญ่
4	0.454	0.783	1.237	0.021	0.633	sm	ใหญ่
5	0.430	0.991	1.421	0.024	0.697	a	ใหญ่
6	0.422	0.941	1.364	0.024	0.690	a	ใหญ่
7	0.433	0.924	1.357	0.023	0.681	a	ใหญ่
8	0.385	0.964	1.350	0.023	0.714	a	ใหญ่
9	0.378	0.907	1.285	0.022	0.705	a	ใหญ่
10	0.410	0.841	1.251	0.022	0.672	a	ใหญ่
11	0.377	0.840	1.217	0.021	0.690	a	กลาง
12	0.000	1.454	1.454	0.025	1.000	t	ใหญ่
13	0.000	1.337	1.337	0.023	1.000	t	ใหญ่
14	0.000	1.287	1.287	0.022	1.000	t	ใหญ่
15	0.000	1.255	1.255	0.022	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.236	1.236	0.021	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.190	1.190	0.021	1.000	t	ใหญ่
18	0.000	1.170	1.170	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.134	1.134	0.020	1.000	t	กลาง
20	0.000	1.094	1.094	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	1.064	1.064	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.994	0.994	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.788	0.788	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 6

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.594	1.164	1.758	0.030	0.662	sm	ใหญ่
2	0.515	0.903	1.418	0.024	0.637	sm	ใหญ่
3	0.487	0.853	1.340	0.023	0.637	sm	ใหญ่
4	0.390	1.036	1.426	0.024	0.727	sm	ใหญ่
5	0.365	1.020	1.385	0.023	0.736	a	ใหญ่
6	0.372	0.979	1.351	0.023	0.724	a	ใหญ่
7	0.378	0.962	1.340	0.023	0.718	a	ใหญ่
8	0.368	0.964	1.332	0.022	0.724	a	ใหญ่
9	0.348	0.922	1.270	0.021	0.726	a	ใหญ่
10	0.324	0.924	1.248	0.021	0.740	a	ใหญ่
11	0.361	0.873	1.234	0.021	0.708	a	กลาง
12	0.000	1.430	1.430	0.024	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.367	1.367	0.023	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.330	1.330	0.022	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.244	1.244	0.021	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.231	1.231	0.021	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.211	1.211	0.020	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.187	1.187	0.020	1	t	กลาง
19	0.000	1.177	1.177	0.020	1	t	กลาง
20	0.000	1.154	1.154	0.019	1	t	กลาง
21	0.000	1.128	1.128	0.019	1	t	กลาง
22	0.000	1.070	1.070	0.018	1	t	กลาง
23	0.000	0.987	0.987	0.017	1	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 7

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.588	1.075	1.663	0.028	0.645	sm	ใหญ่
2	0.481	0.937	1.418	0.024	0.663	sm	ใหญ่
3	0.427	0.836	1.263	0.021	0.662	sm	ใหญ่
4	0.449	1.087	1.536	0.026	0.709	sm	ใหญ่
5	0.433	1.004	1.437	0.024	0.698	a	ใหญ่
6	0.395	0.986	1.381	0.023	0.715	a	ใหญ่
7	0.380	0.967	1.347	0.023	0.718	a	ใหญ่
8	0.402	0.931	1.333	0.022	0.698	a	ใหญ่
9	0.374	0.942	1.315	0.022	0.716	a	ใหญ่
10	0.369	0.908	1.277	0.021	0.711	a	ใหญ่
11	0.340	0.828	1.168	0.020	0.709	a	กลาง
12	0.000	1.447	1.447	0.024	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.397	1.397	0.023	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.370	1.370	0.023	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.325	1.325	0.022	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.288	1.288	0.022	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.262	1.262	0.021	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.222	1.222	0.021	1	t	กลาง
19	0.000	1.205	1.205	0.020	1	t	กลาง
20	0.000	1.189	1.189	0.020	1	t	กลาง
21	0.000	1.044	1.044	0.018	1	t	กลาง
22	0.000	1.011	1.011	0.017	1	t	กลาง
23	0.000	0.910	0.910	0.015	1	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 8

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.617	1.175	1.792	0.029	0.656	sm	ใหญ่
2	0.648	1.068	1.716	0.028	0.622	sm	ใหญ่
3	0.553	0.887	1.440	0.023	0.616	sm	ใหญ่
4	0.474	0.897	1.372	0.022	0.654	sm	ใหญ่
5	0.480	1.222	1.702	0.027	0.721	a	ใหญ่
6	0.530	1.080	1.610	0.026	0.671	a	ใหญ่
7	0.413	1.132	1.544	0.025	0.733	a	ใหญ่
8	0.442	1.066	1.508	0.024	0.707	a	ใหญ่
9	0.468	1.027	1.496	0.024	0.687	a	ใหญ่
10	0.425	1.018	1.442	0.023	0.705	a	ใหญ่
11	0.372	0.909	1.281	0.021	0.710	a	กลาง
12	0.000	1.543	1.543	0.025	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.432	1.432	0.023	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.413	1.413	0.023	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.329	1.329	0.021	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.273	1.273	0.020	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.234	1.234	0.020	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.198	1.198	0.019	1	t	กลาง
19	0.000	1.140	1.140	0.018	1	t	กลาง
20	0.000	1.068	1.068	0.017	1	t	กลาง
21	0.000	0.911	0.911	0.015	1	t	กลาง
22	0.000	0.886	0.886	0.014	1	t	กลาง
23	0.000	0.831	0.831	0.013	1	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 9

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.496	1.184	1.680	0.027	0.704	sm	ใหญ่
2	0.422	1.024	1.446	0.023	0.709	sm	ใหญ่
3	0.409	0.911	1.320	0.021	0.690	sm	ใหญ่
4	0.573	1.618	2.192	0.035	0.738	sm	ใหญ่
5	0.410	1.326	1.736	0.028	0.764	a	ใหญ่
6	0.378	1.286	1.664	0.026	0.772	a	ใหญ่
7	0.437	1.151	1.588	0.025	0.725	a	ใหญ่
8	0.394	1.106	1.500	0.024	0.737	a	ใหญ่
9	0.270	1.146	1.416	0.023	0.810	a	ใหญ่
10	0.295	1.039	1.334	0.021	0.779	a	ใหญ่
11	0.363	0.925	1.288	0.021	0.718	a	กลาง
12	0.000	1.608	1.608	0.026	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.501	1.501	0.024	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.427	1.427	0.023	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.401	1.401	0.022	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.368	1.368	0.022	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.339	1.339	0.021	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.140	1.140	0.018	1	t	กลาง
19	0.000	1.027	1.027	0.016	1	t	กลาง
20	0.000	0.967	0.967	0.015	1	t	กลาง
21	0.000	0.949	0.949	0.015	1	t	กลาง
22	0.000	0.908	0.908	0.014	1	t	กลาง
23	0.000	0.618	0.618	0.010	1	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 10

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.595	1.166	1.761	0.023	0.662	sm	ใหญ่
2	0.624	1.049	1.672	0.022	0.627	sm	ใหญ่
3	0.557	0.989	1.546	0.021	0.640	sm	ใหญ่
4	0.611	1.371	1.982	0.026	0.692	sm	ใหญ่
5	0.603	1.358	1.960	0.026	0.693	a	ใหญ่
6	0.494	1.362	1.856	0.025	0.734	a	ใหญ่
7	0.497	1.337	1.834	0.024	0.729	a	ใหญ่
8	0.558	1.245	1.803	0.024	0.690	a	ใหญ่
9	0.479	1.274	1.753	0.023	0.727	a	ใหญ่
10	0.460	1.176	1.636	0.022	0.719	a	ใหญ่
11	0.334	0.952	1.286	0.017	0.740	a	กลาง
12	0.000	1.974	1.974	0.026	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.902	1.902	0.025	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.662	1.662	0.022	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.651	1.651	0.022	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.639	1.639	0.022	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.615	1.615	0.022	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.517	1.517	0.020	1	t	กลาง
19	0.000	1.494	1.494	0.020	1	t	กลาง
20	0.000	1.435	1.435	0.019	1	t	กลาง
21	0.000	1.335	1.335	0.018	1	t	กลาง
22	0.000	1.272	1.272	0.017	1	t	กลาง
23	0.000	0.954	0.954	0.013	1	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 11

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.642	1.362	2.005	0.028	0.680	sm	ใหญ่
2	0.539	1.028	1.567	0.022	0.656	sm	ใหญ่
3	0.506	0.982	1.488	0.021	0.661	sm	ใหญ่
4	0.468	0.925	1.392	0.020	0.664	sm	ใหญ่
5	0.545	1.389	1.933	0.027	0.718	a	ใหญ่
6	0.459	1.374	1.833	0.026	0.750	a	ใหญ่
7	0.473	1.252	1.725	0.024	0.726	a	ใหญ่
8	0.475	1.136	1.612	0.023	0.705	a	ใหญ่
9	0.464	1.169	1.633	0.023	0.716	a	ใหญ่
10	0.444	1.077	1.521	0.021	0.710	a	ใหญ่
11	0.418	0.972	1.391	0.020	0.700	a	กลาง
12	0.000	1.853	1.853	0.026	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.754	1.754	0.025	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.655	1.655	0.023	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.634	1.634	0.023	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.625	1.625	0.023	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.564	1.564	0.022	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.397	1.397	0.020	1	t	กลาง
19	0.000	1.374	1.374	0.019	1	t	กลาง
20	0.000	1.297	1.297	0.018	1	t	กลาง
21	0.000	1.228	1.228	0.017	1	t	กลาง
22	0.000	1.160	1.160	0.016	1	t	กลาง
23	0.000	0.920	0.920	0.013	1	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 12

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.732	1.487	2.219	0.030	0.670	sm	ใหญ่
2	0.543	1.156	1.699	0.023	0.681	sm	ใหญ่
3	0.459	1.014	1.473	0.020	0.688	sm	ใหญ่
4	0.531	1.500	2.032	0.027	0.739	sm	ใหญ่
5	0.438	1.430	1.869	0.025	0.763	a	ใหญ่
6	0.405	1.287	1.693	0.023	0.760	a	ใหญ่
7	0.467	1.168	1.635	0.022	0.715	a	ใหญ่
8	0.437	1.177	1.613	0.022	0.729	a	ใหญ่
9	0.323	1.206	1.529	0.021	0.789	a	ใหญ่
10	0.423	1.139	1.563	0.021	0.729	a	ใหญ่
11	0.351	1.073	1.424	0.019	0.753	a	กลาง
12	0.000	1.951	1.951	0.026	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.878	1.878	0.025	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.742	1.742	0.023	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.648	1.648	0.022	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.592	1.592	0.021	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.543	1.543	0.021	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.524	1.524	0.021	1	t	กลาง
19	0.000	1.464	1.464	0.020	1	t	กลาง
20	0.000	1.410	1.410	0.019	1	t	กลาง
21	0.000	1.367	1.367	0.018	1	t	กลาง
22	0.000	1.261	1.261	0.017	1	t	กลาง
23	0.000	1.011	1.011	0.014	1	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 13

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.588	1.067	1.655	0.029	0.645	sm	ใหญ่
2	0.566	1.000	1.565	0.027	0.638	sm	ใหญ่
3	0.481	0.824	1.305	0.022	0.631	sm	ใหญ่
4	0.454	0.783	1.237	0.021	0.633	sm	ใหญ่
5	0.430	0.991	1.421	0.024	0.697	a	ใหญ่
6	0.422	0.941	1.364	0.024	0.690	a	ใหญ่
7	0.433	0.924	1.357	0.023	0.681	a	ใหญ่
8	0.385	0.964	1.350	0.023	0.714	a	ใหญ่
9	0.378	0.907	1.285	0.022	0.705	a	ใหญ่
10	0.410	0.841	1.251	0.022	0.672	a	ใหญ่
11	0.377	0.840	1.217	0.021	0.690	a	กลาง
12	0.000	1.454	1.454	0.025	1.000	t	ใหญ่
13	0.000	1.337	1.337	0.023	1.000	t	ใหญ่
14	0.000	1.287	1.287	0.022	1.000	t	ใหญ่
15	0.000	1.255	1.255	0.022	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.236	1.236	0.021	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.190	1.190	0.021	1.000	t	ใหญ่
18	0.000	1.170	1.170	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.134	1.134	0.020	1.000	t	กลาง
20	0.000	1.094	1.094	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	1.064	1.064	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.994	0.994	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.788	0.788	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 14

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.594	1.164	1.758	0.030	0.662	sm	ใหญ่
2	0.515	0.903	1.418	0.024	0.637	sm	ใหญ่
3	0.487	0.853	1.340	0.023	0.637	sm	ใหญ่
4	0.390	1.036	1.426	0.024	0.727	sm	ใหญ่
5	0.365	1.020	1.385	0.023	0.736	a	ใหญ่
6	0.372	0.979	1.351	0.023	0.724	a	ใหญ่
7	0.378	0.962	1.340	0.023	0.718	a	ใหญ่
8	0.368	0.964	1.332	0.022	0.724	a	ใหญ่
9	0.348	0.922	1.270	0.021	0.726	a	ใหญ่
10	0.324	0.924	1.248	0.021	0.740	a	ใหญ่
11	0.361	0.873	1.234	0.021	0.708	a	กลาง
12	0.000	1.430	1.430	0.024	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.367	1.367	0.023	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.330	1.330	0.022	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.244	1.244	0.021	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.231	1.231	0.021	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.211	1.211	0.020	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.187	1.187	0.020	1	t	กลาง
19	0.000	1.177	1.177	0.020	1	t	กลาง
20	0.000	1.154	1.154	0.019	1	t	กลาง
21	0.000	1.128	1.128	0.019	1	t	กลาง
22	0.000	1.070	1.070	0.018	1	t	กลาง
23	0.000	0.987	0.987	0.017	1	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

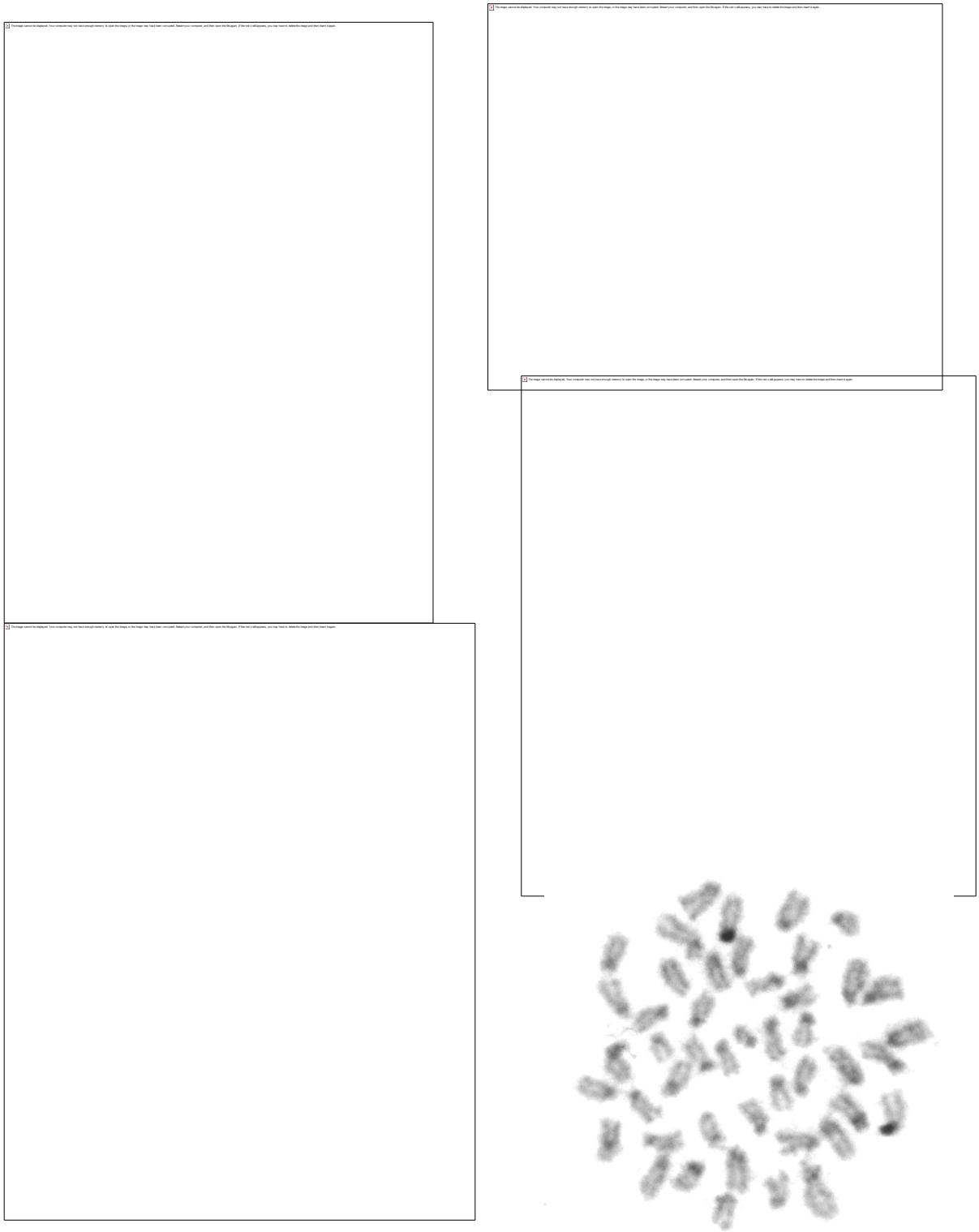
เซลล์ที่ 15

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.588	1.075	1.663	0.028	0.645	sm	ใหญ่
2	0.481	0.937	1.418	0.024	0.663	sm	ใหญ่
3	0.427	0.836	1.263	0.021	0.662	sm	ใหญ่
4	0.449	1.087	1.536	0.026	0.709	sm	ใหญ่
5	0.433	1.004	1.437	0.024	0.698	a	ใหญ่
6	0.395	0.986	1.381	0.023	0.715	a	ใหญ่
7	0.380	0.967	1.347	0.023	0.718	a	ใหญ่
8	0.402	0.931	1.333	0.022	0.698	a	ใหญ่
9	0.374	0.942	1.315	0.022	0.716	a	ใหญ่
10	0.369	0.908	1.277	0.021	0.711	a	ใหญ่
11	0.340	0.828	1.168	0.020	0.709	a	กลาง
12	0.000	1.447	1.447	0.024	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.397	1.397	0.023	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.370	1.370	0.023	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.325	1.325	0.022	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.288	1.288	0.022	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.262	1.262	0.021	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.222	1.222	0.021	1	t	กลาง
19	0.000	1.205	1.205	0.020	1	t	กลาง
20	0.000	1.189	1.189	0.020	1	t	กลาง
21	0.000	1.044	1.044	0.018	1	t	กลาง
22	0.000	1.011	1.011	0.017	1	t	กลาง
23	0.000	0.910	0.910	0.015	1	t	เล็ก

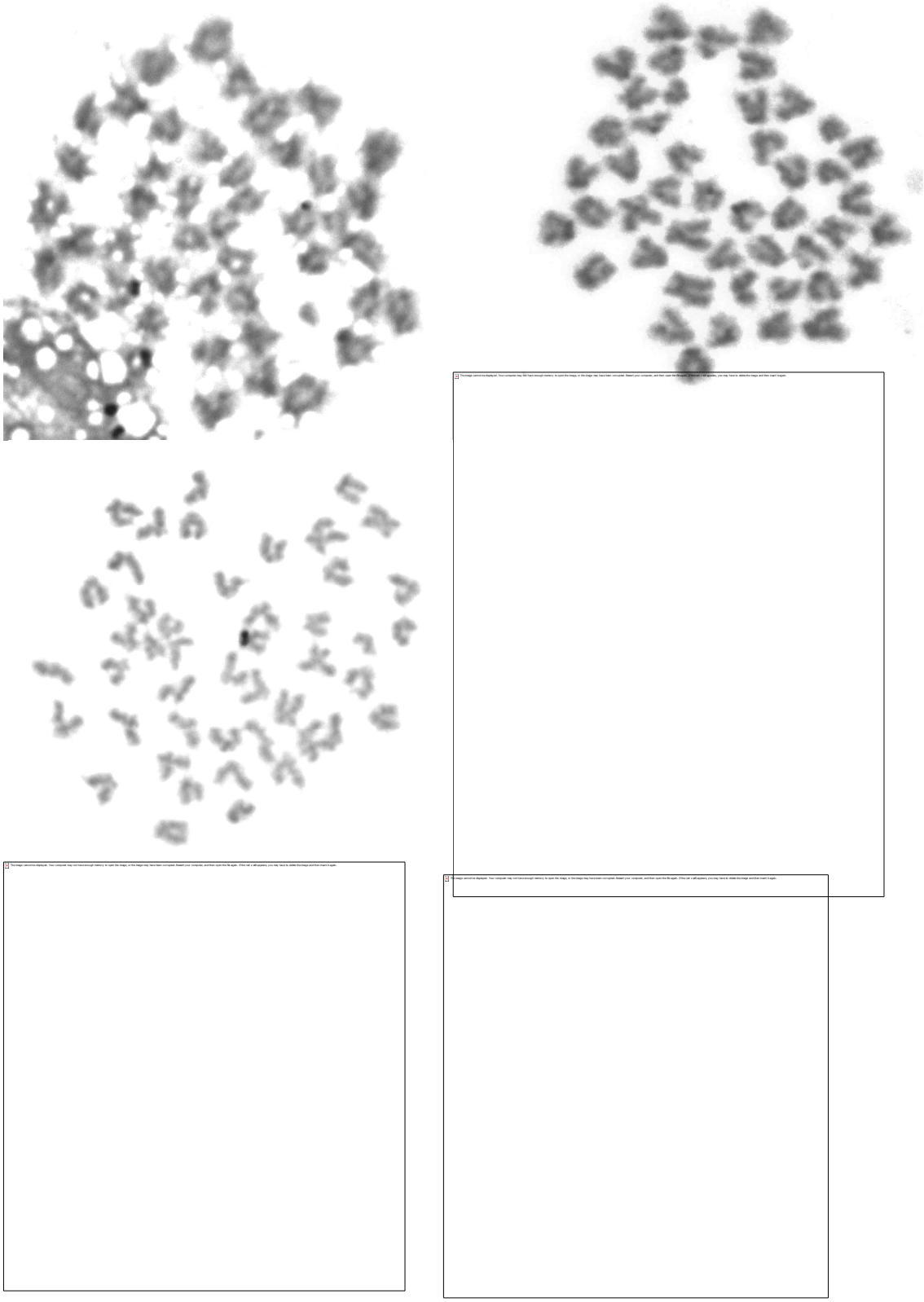
ตารางภาคผนวก ข-3 (ต่อ)

เซลล์ที่ 16

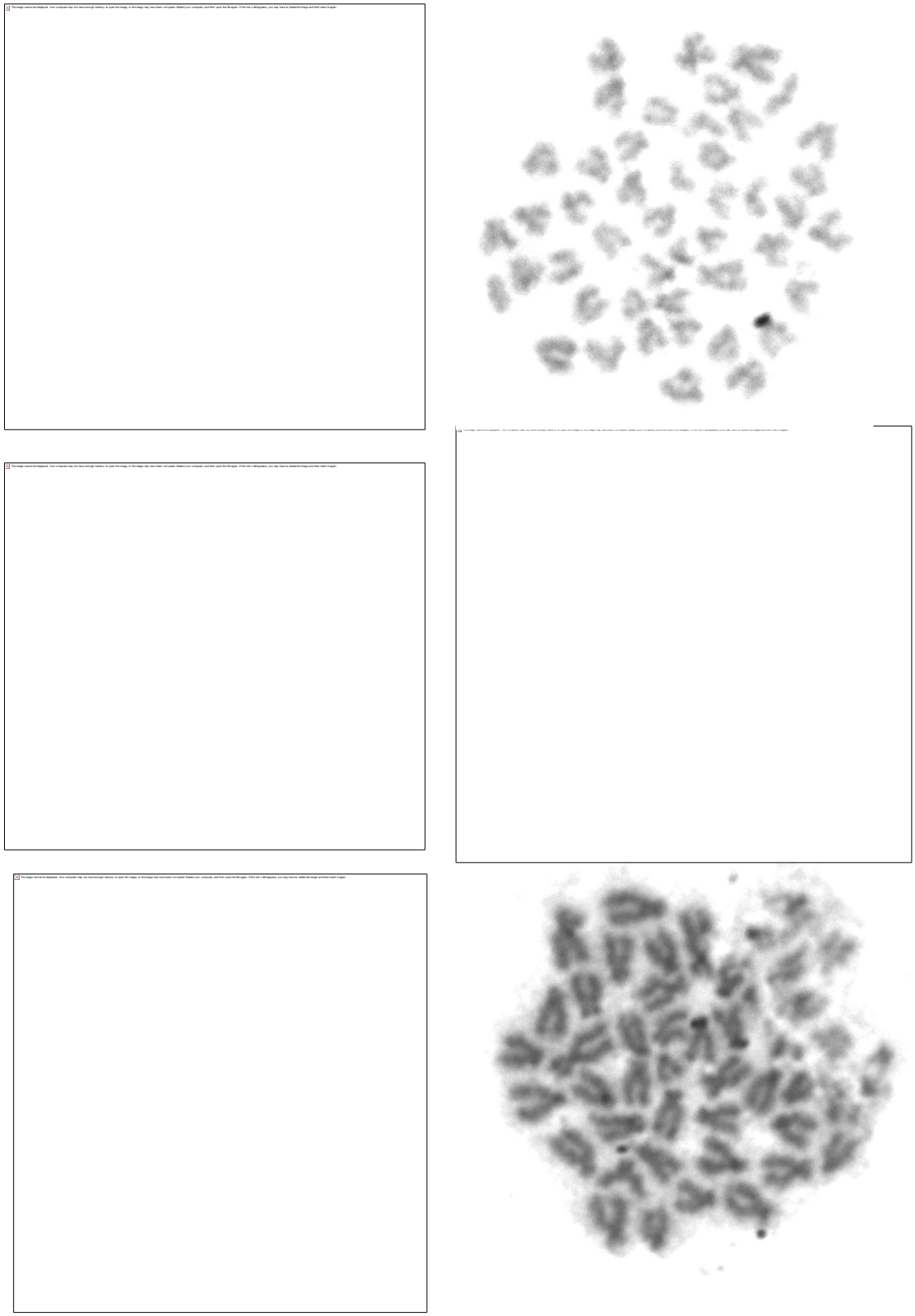
โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.617	1.175	1.792	0.029	0.656	sm	ใหญ่
2	0.648	1.068	1.716	0.028	0.622	sm	ใหญ่
3	0.553	0.887	1.440	0.023	0.616	sm	ใหญ่
4	0.474	0.897	1.372	0.022	0.654	sm	ใหญ่
5	0.480	1.222	1.702	0.027	0.721	a	ใหญ่
6	0.530	1.080	1.610	0.026	0.671	a	ใหญ่
7	0.413	1.132	1.544	0.025	0.733	a	ใหญ่
8	0.442	1.066	1.508	0.024	0.707	a	ใหญ่
9	0.468	1.027	1.496	0.024	0.687	a	ใหญ่
10	0.425	1.018	1.442	0.023	0.705	a	ใหญ่
11	0.372	0.909	1.281	0.021	0.710	a	กลาง
12	0.000	1.543	1.543	0.025	1	t	ใหญ่
13	0.000	1.432	1.432	0.023	1	t	ใหญ่
14	0.000	1.413	1.413	0.023	1	t	ใหญ่
15	0.000	1.329	1.329	0.021	1	t	ใหญ่
16	0.000	1.273	1.273	0.020	1	t	ใหญ่
17	0.000	1.234	1.234	0.020	1	t	ใหญ่
18	0.000	1.198	1.198	0.019	1	t	กลาง
19	0.000	1.140	1.140	0.018	1	t	กลาง
20	0.000	1.068	1.068	0.017	1	t	กลาง
21	0.000	0.911	0.911	0.015	1	t	กลาง
22	0.000	0.886	0.886	0.014	1	t	กลาง
23	0.000	0.831	0.831	0.013	1	t	เล็ก



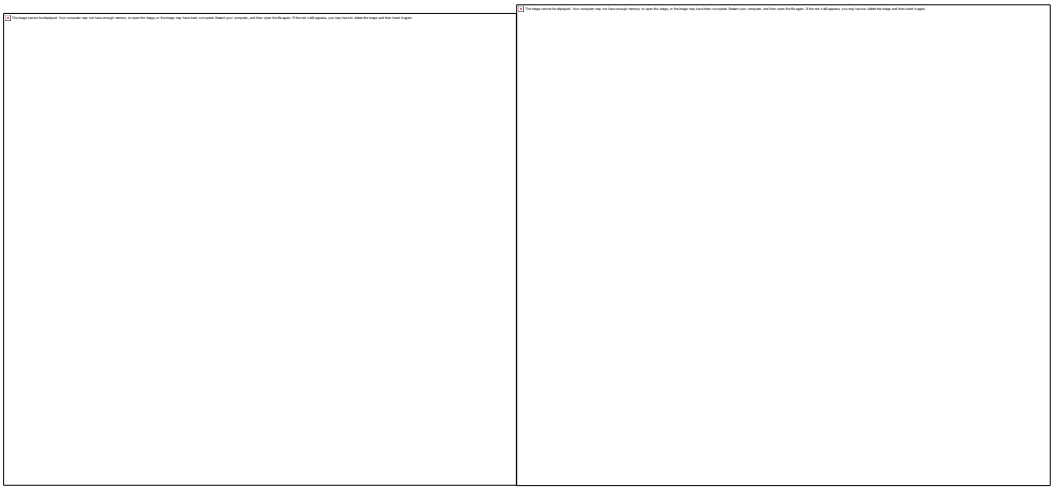
ภาพภาคผนวก ข-8 โครโมโซมระยะเมทาเฟสของปลาอมไข่ตาแดง

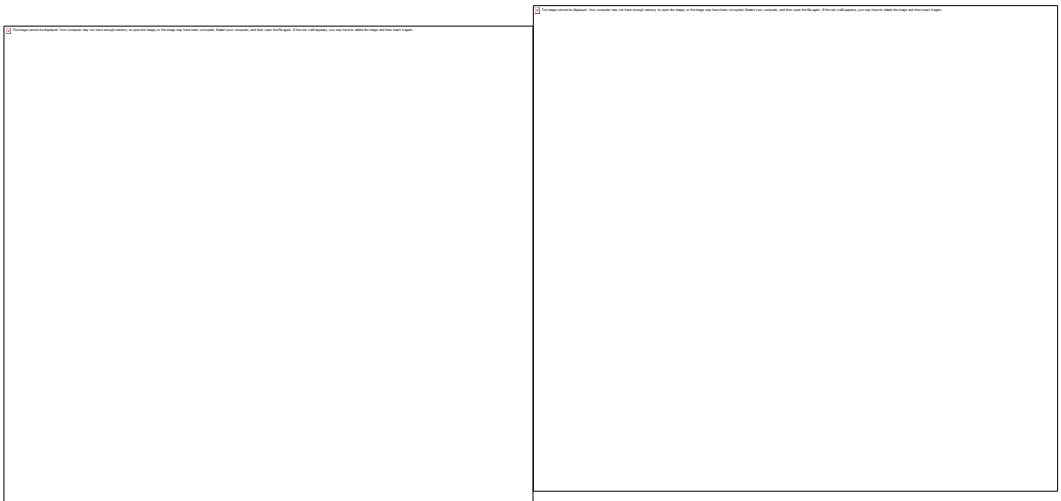


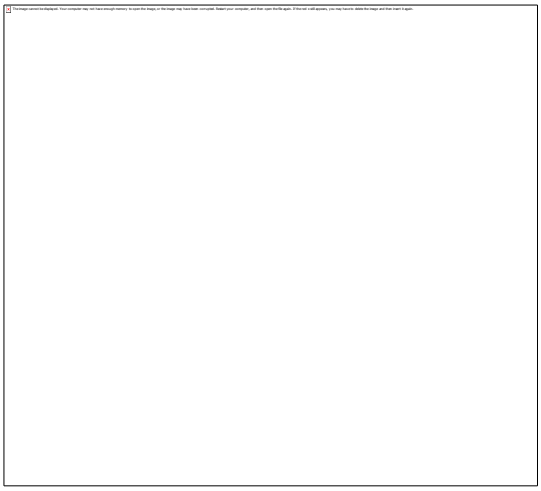
ภาพภาคผนวก ข-9 โครโมโซมระยะเมทาเฟสของปลาอมไข่ตาแดง



ภาพภาคผนวก ข-10 โครโมโซมระยะเมทาเฟสของปลาอมไข่ตาแดง







ภาพภาคผนวก ข-11 โครโมโซมระยะเมทาเฟสของปลาอมไข่ตาแดง

ตารางภาคผนวก ข-4 ความยาวโครโมโซมปลาอมไข่ตาแดงเซลล์ที่ 1-20

เซลล์ที่ 1

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.590	0.916	1.506	0.030	0.609	sm	ใหญ่
2	0.433	0.845	1.278	0.026	0.661	sm	ใหญ่
3	0.395	0.825	1.220	0.025	0.677	sm	ใหญ่
4	0.413	0.771	1.184	0.024	0.651	sm	ใหญ่
5	0.410	0.744	1.154	0.023	0.645	sm	ใหญ่
6	0.380	0.714	1.094	0.022	0.653	sm	กลาง
7	0.349	0.645	0.994	0.020	0.649	sm	กลาง
8	0.395	0.874	1.269	0.026	0.689	a	ใหญ่
9	0.346	0.818	1.164	0.023	0.703	a	ใหญ่
10	0.353	0.762	1.115	0.022	0.683	a	ใหญ่
11	0.297	0.776	1.074	0.022	0.723	a	ใหญ่
12	0.323	0.730	1.053	0.021	0.693	a	ใหญ่
13	0.317	0.719	1.036	0.021	0.694	a	กลาง
14	0.264	0.594	0.858	0.017	0.693	a	กลาง
15	0.000	1.228	1.228	0.025	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.181	1.181	0.024	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.092	1.092	0.022	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.008	1.008	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.999	0.999	0.020	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.983	0.983	0.020	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.948	0.948	0.019	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.746	0.746	0.015	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.706	0.706	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 2

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.584	1.044	1.628	0.032	0.641	sm	ใหญ่
2	0.531	0.813	1.344	0.027	0.605	sm	ใหญ่
3	0.470	0.818	1.287	0.026	0.635	sm	ใหญ่
4	0.369	0.800	1.169	0.023	0.684	sm	ใหญ่
5	0.349	0.759	1.108	0.022	0.685	sm	ใหญ่
6	0.343	0.736	1.079	0.021	0.682	sm	กลาง
7	0.317	0.716	1.033	0.021	0.693	sm	กลาง
8	0.342	0.866	1.208	0.024	0.717	a	ใหญ่
9	0.332	0.850	1.182	0.023	0.719	a	ใหญ่
10	0.327	0.810	1.136	0.023	0.712	a	ใหญ่
11	0.301	0.802	1.103	0.022	0.727	a	ใหญ่
12	0.294	0.798	1.092	0.022	0.731	a	ใหญ่
13	0.282	0.788	1.071	0.021	0.736	a	กลาง
14	0.305	0.726	1.031	0.020	0.704	a	กลาง
15	0.000	1.128	1.128	0.022	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.062	1.062	0.021	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.033	1.033	0.021	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.018	1.018	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.940	0.940	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.909	0.909	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.902	0.902	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.879	0.879	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.860	0.860	0.017	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 3

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.476	1.152	1.628	0.030	0.708	sm	ใหญ่
2	0.374	0.949	1.323	0.024	0.718	sm	ใหญ่
3	0.378	0.832	1.210	0.022	0.688	sm	ใหญ่
4	0.339	0.838	1.176	0.022	0.712	sm	ใหญ่
5	0.356	0.771	1.127	0.021	0.684	sm	ใหญ่
6	0.328	0.739	1.067	0.020	0.693	sm	กลาง
7	0.322	0.695	1.017	0.019	0.683	sm	กลาง
8	0.429	0.960	1.389	0.026	0.691	a	ใหญ่
9	0.344	0.905	1.249	0.023	0.724	a	ใหญ่
10	0.290	0.883	1.173	0.022	0.752	a	ใหญ่
11	0.291	0.870	1.161	0.021	0.749	a	ใหญ่
12	0.292	0.862	1.154	0.021	0.747	a	ใหญ่
13	0.277	0.809	1.086	0.020	0.745	a	กลาง
14	0.259	0.718	0.976	0.018	0.735	a	กลาง
15	0.000	1.436	1.436	0.027	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.368	1.368	0.025	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.254	1.254	0.023	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.180	1.180	0.022	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.153	1.153	0.021	1.000	t	กลาง
20	0.000	1.136	1.136	0.021	1.000	t	กลาง
21	0.000	1.113	1.113	0.021	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.881	0.881	0.016	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.789	0.789	0.015	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 4

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.381	1.001	1.383	0.030	0.724	sm	ใหญ่
2	0.398	0.820	1.217	0.026	0.673	sm	ใหญ่
3	0.399	0.737	1.136	0.025	0.649	sm	ใหญ่
4	0.346	0.714	1.061	0.023	0.674	sm	ใหญ่
5	0.295	0.693	0.988	0.021	0.701	sm	ใหญ่
6	0.272	0.658	0.929	0.020	0.707	sm	กลาง
7	0.262	0.591	0.854	0.019	0.693	sm	กลาง
8	0.299	0.883	1.182	0.026	0.747	a	ใหญ่
9	0.289	0.854	1.144	0.025	0.747	a	ใหญ่
10	0.320	0.758	1.078	0.023	0.704	a	ใหญ่
11	0.288	0.822	1.110	0.024	0.741	a	ใหญ่
12	0.252	0.762	1.014	0.022	0.751	a	ใหญ่
13	0.244	0.719	0.962	0.021	0.747	a	กลาง
14	0.215	0.606	0.821	0.018	0.738	a	กลาง
15	0.000	1.151	1.151	0.025	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	0.999	0.999	0.022	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	0.960	0.960	0.021	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.941	0.941	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.883	0.883	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.861	0.861	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.842	0.842	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.835	0.835	0.018	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.638	0.638	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 5

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.430	0.785	1.214	0.031	0.647	sm	ใหญ่
2	0.332	0.706	1.038	0.026	0.680	sm	ใหญ่
3	0.334	0.562	0.896	0.023	0.627	sm	ใหญ่
4	0.304	0.554	0.858	0.022	0.646	sm	ใหญ่
5	0.281	0.560	0.842	0.021	0.666	sm	ใหญ่
6	0.306	0.534	0.840	0.021	0.635	sm	กลาง
7	0.266	0.548	0.814	0.021	0.673	sm	กลาง
8	0.316	0.754	1.070	0.027	0.705	a	ใหญ่
9	0.288	0.688	0.976	0.025	0.705	a	ใหญ่
10	0.284	0.651	0.934	0.024	0.696	a	ใหญ่
11	0.263	0.634	0.896	0.023	0.707	a	ใหญ่
12	0.244	0.609	0.853	0.022	0.714	a	ใหญ่
13	0.257	0.577	0.834	0.021	0.692	a	กลาง
14	0.224	0.543	0.767	0.020	0.708	a	กลาง
15	0.000	0.923	0.923	0.024	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	0.838	0.838	0.021	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	0.792	0.792	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.770	0.770	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.758	0.758	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.748	0.748	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.726	0.726	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.710	0.710	0.018	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.528	0.528	0.013	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 6

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.503	0.838	1.340	0.028	0.625	sm	ใหญ่
2	0.475	0.832	1.307	0.027	0.637	sm	ใหญ่
3	0.431	0.819	1.250	0.026	0.655	sm	ใหญ่
4	0.428	0.745	1.173	0.024	0.635	sm	ใหญ่
5	0.346	0.677	1.023	0.021	0.662	sm	ใหญ่
6	0.341	0.637	0.978	0.020	0.652	sm	กลาง
7	0.306	0.620	0.926	0.019	0.670	sm	กลาง
8	0.325	0.895	1.221	0.025	0.733	a	ใหญ่
9	0.278	0.858	1.137	0.024	0.755	a	ใหญ่
10	0.319	0.794	1.113	0.023	0.713	a	ใหญ่
11	0.326	0.731	1.057	0.022	0.692	a	ใหญ่
12	0.322	0.719	1.042	0.022	0.691	a	ใหญ่
13	0.312	0.716	1.028	0.021	0.696	a	กลาง
14	0.285	0.705	0.990	0.021	0.713	a	กลาง
15	0.000	1.100	1.100	0.023	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.055	1.055	0.022	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.022	1.022	0.021	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.978	0.978	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.952	0.952	0.020	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.892	0.892	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.877	0.877	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.833	0.833	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.692	0.692	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 7

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.414	0.934	1.348	0.030	0.693	sm	ใหญ่
2	0.387	0.652	1.039	0.023	0.628	sm	ใหญ่
3	0.376	0.623	0.999	0.022	0.623	sm	ใหญ่
4	0.309	0.653	0.963	0.021	0.679	sm	ใหญ่
5	0.356	0.578	0.934	0.021	0.619	sm	ใหญ่
6	0.340	0.558	0.898	0.020	0.622	sm	กลาง
7	0.269	0.541	0.810	0.018	0.667	sm	กลาง
8	0.348	0.872	1.220	0.027	0.715	a	ใหญ่
9	0.344	0.852	1.196	0.026	0.713	a	ใหญ่
10	0.344	0.836	1.180	0.026	0.708	a	ใหญ่
11	0.310	0.738	1.048	0.023	0.704	a	ใหญ่
12	0.277	0.720	0.997	0.022	0.722	a	ใหญ่
13	0.240	0.660	0.900	0.020	0.733	a	กลาง
14	0.275	0.611	0.886	0.020	0.690	a	กลาง
15	0.000	1.140	1.140	0.025	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.053	1.053	0.023	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	0.995	0.995	0.022	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.962	0.962	0.021	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.907	0.907	0.020	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.841	0.841	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.829	0.829	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.811	0.811	0.018	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.666	0.666	0.015	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 8

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.589	0.942	1.531	0.029	0.615	sm	ใหญ่
2	0.463	0.786	1.249	0.024	0.629	sm	ใหญ่
3	0.451	0.776	1.228	0.023	0.632	sm	ใหญ่
4	0.400	0.793	1.193	0.023	0.665	sm	ใหญ่
5	0.414	0.759	1.173	0.022	0.647	sm	ใหญ่
6	0.399	0.745	1.145	0.022	0.651	sm	กลาง
7	0.378	0.665	1.043	0.020	0.638	sm	กลาง
8	0.523	0.918	1.442	0.027	0.637	a	ใหญ่
9	0.385	0.989	1.373	0.026	0.720	a	ใหญ่
10	0.400	0.897	1.297	0.025	0.692	a	ใหญ่
11	0.401	0.843	1.244	0.024	0.677	a	ใหญ่
12	0.381	0.837	1.218	0.023	0.687	a	ใหญ่
13	0.359	0.786	1.145	0.022	0.686	a	กลาง
14	0.325	0.713	1.038	0.020	0.687	a	กลาง
15	0.000	1.167	1.167	0.022	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.159	1.159	0.022	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.146	1.146	0.022	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.033	1.033	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.993	0.993	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.981	0.981	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.963	0.963	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.859	0.859	0.016	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.796	0.796	0.015	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 9

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.420	0.770	1.190	0.027	0.647	sm	ใหญ่
2	0.413	0.765	1.179	0.026	0.649	sm	ใหญ่
3	0.385	0.766	1.150	0.026	0.666	sm	ใหญ่
4	0.365	0.748	1.113	0.025	0.672	sm	ใหญ่
5	0.343	0.754	1.097	0.025	0.688	sm	ใหญ่
6	0.337	0.699	1.037	0.023	0.675	sm	กลาง
7	0.319	0.644	0.963	0.022	0.669	sm	กลาง
8	0.296	0.874	1.169	0.026	0.747	a	ใหญ่
9	0.297	0.869	1.166	0.026	0.746	a	ใหญ่
10	0.297	0.739	1.037	0.023	0.713	a	ใหญ่
11	0.260	0.712	0.972	0.022	0.732	a	ใหญ่
12	0.242	0.677	0.920	0.021	0.736	a	ใหญ่
13	0.260	0.617	0.877	0.020	0.703	a	กลาง
14	0.230	0.591	0.821	0.018	0.720	a	กลาง
15	0.000	0.999	0.999	0.022	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	0.957	0.957	0.021	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	0.935	0.935	0.021	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.888	0.888	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.874	0.874	0.020	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.861	0.861	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.844	0.844	0.019	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.813	0.813	0.018	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.472	0.472	0.011	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 10

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.373	0.765	1.138	0.025	0.672	sm	ใหญ่
2	0.401	0.732	1.133	0.025	0.646	sm	ใหญ่
3	0.387	0.731	1.117	0.025	0.654	sm	ใหญ่
4	0.376	0.704	1.081	0.024	0.652	sm	ใหญ่
5	0.366	0.687	1.053	0.024	0.652	sm	ใหญ่
6	0.324	0.668	0.991	0.022	0.673	sm	กลาง
7	0.323	0.580	0.903	0.020	0.642	sm	กลาง
8	0.412	0.900	1.312	0.029	0.686	a	ใหญ่
9	0.340	0.847	1.187	0.027	0.714	a	ใหญ่
10	0.332	0.761	1.093	0.024	0.696	a	ใหญ่
11	0.332	0.754	1.085	0.024	0.694	a	ใหญ่
12	0.333	0.704	1.037	0.023	0.679	a	ใหญ่
13	0.312	0.682	0.995	0.022	0.686	a	กลาง
14	0.295	0.671	0.966	0.022	0.695	a	กลาง
15	0.000	1.015	1.015	0.023	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	0.945	0.945	0.021	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	0.910	0.910	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.867	0.867	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.846	0.846	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.796	0.796	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.682	0.682	0.015	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.664	0.664	0.015	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.531	0.531	0.012	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 11

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.604	0.989	1.593	0.034	0.621	sm	ใหญ่
2	0.431	0.797	1.228	0.026	0.649	sm	ใหญ่
3	0.346	0.767	1.113	0.024	0.689	sm	ใหญ่
4	0.346	0.732	1.078	0.023	0.679	sm	ใหญ่
5	0.365	0.699	1.064	0.023	0.657	sm	ใหญ่
6	0.329	0.692	1.020	0.022	0.678	sm	กลาง
7	0.351	0.651	1.002	0.021	0.650	sm	กลาง
8	0.336	0.848	1.184	0.025	0.716	a	ใหญ่
9	0.321	0.801	1.122	0.024	0.714	a	ใหญ่
10	0.308	0.763	1.071	0.023	0.712	a	ใหญ่
11	0.340	0.728	1.068	0.023	0.682	a	ใหญ่
12	0.296	0.744	1.041	0.022	0.715	a	ใหญ่
13	0.255	0.718	0.973	0.021	0.738	a	กลาง
14	0.227	0.624	0.851	0.018	0.734	a	กลาง
15	0.000	1.075	1.075	0.023	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.037	1.037	0.022	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.000	1.000	0.021	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.942	0.942	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.909	0.909	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.879	0.879	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.850	0.850	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.836	0.836	0.018	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.697	0.697	0.015	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 12

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.511	0.924	1.435	0.027	0.644	sm	ใหญ่
2	0.489	0.798	1.287	0.025	0.620	sm	ใหญ่
3	0.429	0.760	1.190	0.023	0.639	sm	ใหญ่
4	0.412	0.749	1.161	0.022	0.645	sm	ใหญ่
5	0.394	0.759	1.153	0.022	0.658	sm	ใหญ่
6	0.386	0.749	1.135	0.022	0.660	sm	กลาง
7	0.355	0.708	1.063	0.020	0.666	sm	กลาง
8	0.458	0.990	1.448	0.028	0.684	a	ใหญ่
9	0.376	0.952	1.328	0.025	0.718	a	ใหญ่
10	0.373	0.863	1.236	0.024	0.698	a	ใหญ่
11	0.366	0.859	1.224	0.023	0.701	a	ใหญ่
12	0.373	0.827	1.200	0.023	0.689	a	ใหญ่
13	0.358	0.753	1.110	0.021	0.678	a	กลาง
14	0.309	0.719	1.028	0.020	0.699	a	กลาง
15	0.000	1.230	1.230	0.024	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.134	1.134	0.022	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.075	1.075	0.021	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.055	1.055	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.044	1.044	0.020	1.000	t	กลาง
20	0.000	1.020	1.020	0.020	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.967	0.967	0.019	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.836	0.836	0.016	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.744	0.744	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 13

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.506	0.806	1.312	0.032	0.615	sm	ใหญ่
2	0.412	0.791	1.203	0.030	0.658	sm	ใหญ่
3	0.370	0.679	1.048	0.026	0.644	sm	ใหญ่
4	0.298	0.622	0.920	0.023	0.676	sm	ใหญ่
5	0.328	0.579	0.907	0.022	0.639	sm	ใหญ่
6	0.341	0.563	0.904	0.022	0.623	sm	กลาง
7	0.266	0.470	0.736	0.018	0.638	sm	กลาง
8	0.336	0.763	1.099	0.027	0.695	a	ใหญ่
9	0.376	0.675	1.050	0.026	0.642	a	ใหญ่
10	0.312	0.681	0.992	0.024	0.686	a	ใหญ่
11	0.300	0.642	0.942	0.023	0.681	a	ใหญ่
12	0.277	0.605	0.883	0.022	0.686	a	ใหญ่
13	0.246	0.543	0.789	0.019	0.688	a	กลาง
14	0.232	0.503	0.735	0.018	0.685	a	กลาง
15	0.000	0.926	0.926	0.023	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	0.814	0.814	0.020	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	0.804	0.804	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.776	0.776	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.761	0.761	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.714	0.714	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.701	0.701	0.017	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.676	0.676	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.644	0.644	0.016	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 14

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.576	1.086	1.663	0.030	0.653	sm	ใหญ่
2	0.491	0.849	1.340	0.024	0.634	sm	ใหญ่
3	0.433	0.870	1.304	0.023	0.668	sm	ใหญ่
4	0.416	0.876	1.292	0.023	0.678	sm	ใหญ่
5	0.470	0.799	1.269	0.023	0.630	sm	ใหญ่
6	0.415	0.739	1.154	0.021	0.640	sm	กลาง
7	0.389	0.715	1.104	0.020	0.648	sm	กลาง
8	0.452	1.056	1.508	0.027	0.700	a	ใหญ่
9	0.412	1.026	1.439	0.026	0.713	a	ใหญ่
10	0.435	0.963	1.397	0.025	0.689	a	ใหญ่
11	0.410	0.949	1.359	0.024	0.698	a	ใหญ่
12	0.427	0.900	1.327	0.024	0.678	a	ใหญ่
13	0.385	0.866	1.252	0.022	0.692	a	กลาง
14	0.361	0.807	1.168	0.021	0.691	a	กลาง
15	0.000	1.301	1.301	0.023	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.258	1.258	0.023	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.229	1.229	0.022	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.105	1.105	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.025	1.025	0.018	1.000	t	กลาง
20	0.000	1.005	1.005	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.908	0.908	0.016	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.795	0.795	0.014	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.655	0.655	0.012	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 15

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.607	0.960	1.567	0.032	0.615	sm	ใหญ่
2	0.353	0.784	1.137	0.023	0.690	sm	ใหญ่
3	0.395	0.709	1.104	0.022	0.642	sm	ใหญ่
4	0.369	0.729	1.098	0.022	0.664	sm	ใหญ่
5	0.427	0.664	1.091	0.022	0.609	sm	ใหญ่
6	0.324	0.712	1.036	0.021	0.687	sm	กลาง
7	0.310	0.599	0.909	0.019	0.659	sm	กลาง
8	0.375	0.880	1.255	0.026	0.701	a	ใหญ่
9	0.335	0.870	1.205	0.025	0.722	a	ใหญ่
10	0.331	0.861	1.193	0.024	0.722	a	ใหญ่
11	0.356	0.799	1.156	0.024	0.692	a	ใหญ่
12	0.333	0.781	1.114	0.023	0.701	a	ใหญ่
13	0.314	0.784	1.098	0.022	0.714	a	กลาง
14	0.319	0.755	1.075	0.022	0.703	a	กลาง
15	0.000	1.088	1.088	0.022	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.056	1.056	0.021	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.047	1.047	0.021	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.988	0.988	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.959	0.959	0.020	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.926	0.926	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.895	0.895	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.820	0.820	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.753	0.753	0.015	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 16

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.432	0.890	1.322	0.026	0.673	sm	ใหญ่
2	0.394	0.788	1.182	0.024	0.667	sm	ใหญ่
3	0.397	0.755	1.152	0.023	0.656	sm	ใหญ่
4	0.368	0.776	1.143	0.023	0.678	sm	ใหญ่
5	0.363	0.736	1.098	0.022	0.670	sm	ใหญ่
6	0.344	0.738	1.082	0.022	0.682	sm	กลาง
7	0.359	0.687	1.046	0.021	0.657	sm	กลาง
8	0.416	0.919	1.335	0.027	0.688	a	ใหญ่
9	0.369	0.995	1.364	0.027	0.729	a	ใหญ่
10	0.356	0.918	1.274	0.025	0.721	a	ใหญ่
11	0.331	0.844	1.176	0.024	0.718	a	ใหญ่
12	0.362	0.795	1.157	0.023	0.687	a	ใหญ่
13	0.314	0.821	1.134	0.023	0.723	a	กลาง
14	0.335	0.780	1.115	0.022	0.700	a	กลาง
15	0.000	1.205	1.205	0.024	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.075	1.075	0.021	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.050	1.050	0.021	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.020	1.020	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.993	0.993	0.020	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.848	0.848	0.017	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.794	0.794	0.016	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.766	0.766	0.015	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.682	0.682	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 17

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.442	0.875	1.316	0.030	0.664	sm	ใหญ่
2	0.364	0.801	1.165	0.027	0.687	sm	ใหญ่
3	0.348	0.730	1.078	0.025	0.677	sm	ใหญ่
4	0.350	0.683	1.033	0.024	0.661	sm	ใหญ่
5	0.326	0.681	1.007	0.023	0.676	sm	ใหญ่
6	0.326	0.645	0.970	0.022	0.665	sm	กลาง
7	0.291	0.629	0.920	0.021	0.684	sm	กลาง
8	0.351	0.856	1.206	0.028	0.710	a	ใหญ่
9	0.311	0.801	1.112	0.026	0.720	a	ใหญ่
10	0.340	0.770	1.110	0.026	0.694	a	ใหญ่
11	0.282	0.765	1.046	0.024	0.731	a	ใหญ่
12	0.268	0.740	1.008	0.023	0.734	a	ใหญ่
13	0.265	0.693	0.958	0.022	0.723	a	กลาง
14	0.257	0.658	0.915	0.021	0.719	a	กลาง
15	0.000	0.972	0.972	0.022	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	0.862	0.862	0.020	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	0.843	0.843	0.019	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.751	0.751	0.017	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.718	0.718	0.017	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.695	0.695	0.016	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.665	0.665	0.015	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.648	0.648	0.015	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.631	0.631	0.015	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 18

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.497	0.933	1.430	0.029	0.653	sm	ใหญ่
2	0.518	0.815	1.332	0.027	0.612	sm	ใหญ่
3	0.387	0.786	1.173	0.024	0.670	sm	ใหญ่
4	0.368	0.727	1.095	0.022	0.663	sm	ใหญ่
5	0.349	0.706	1.054	0.022	0.669	sm	ใหญ่
6	0.365	0.645	1.010	0.021	0.638	sm	กลาง
7	0.340	0.618	0.957	0.020	0.645	sm	กลาง
8	0.372	0.886	1.259	0.026	0.704	a	ใหญ่
9	0.356	0.867	1.223	0.025	0.709	a	ใหญ่
10	0.381	0.799	1.179	0.024	0.677	a	ใหญ่
11	0.363	0.777	1.139	0.023	0.682	a	ใหญ่
12	0.353	0.779	1.133	0.023	0.688	a	ใหญ่
13	0.322	0.798	1.120	0.023	0.713	a	กลาง
14	0.323	0.705	1.028	0.021	0.685	a	กลาง
15	0.000	1.099	1.099	0.022	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.074	1.074	0.022	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	0.992	0.992	0.020	1.000	t	กลาง
18	0.000	0.948	0.948	0.019	1.000	t	กลาง
19	0.000	0.926	0.926	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	0.876	0.876	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.859	0.859	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.847	0.847	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.682	0.682	0.014	1.000	t	เล็ก

ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

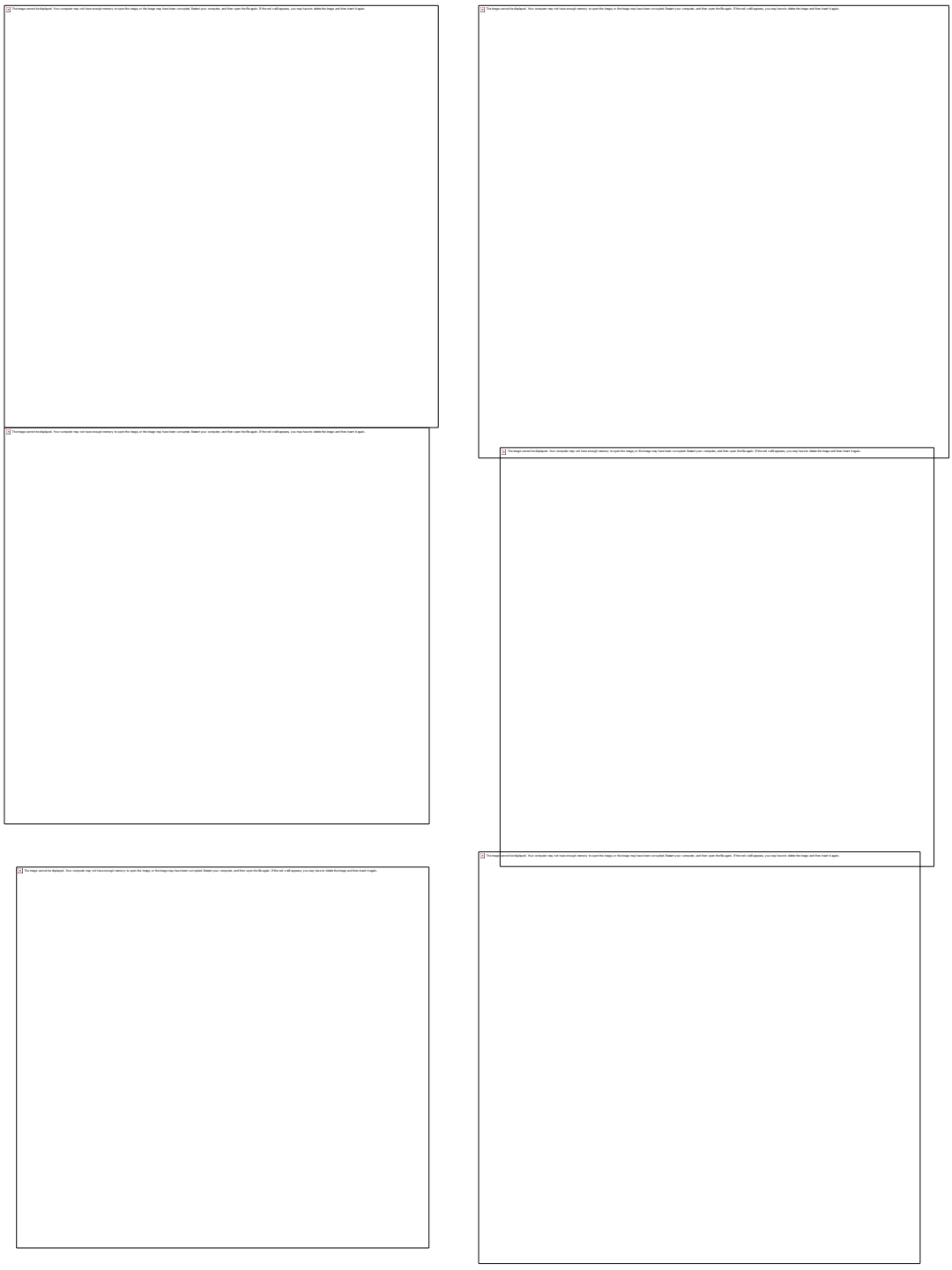
เซลล์ที่ 19

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.731	1.111	1.842	0.028	0.603	sm	ใหญ่
2	0.565	1.231	1.796	0.028	0.685	sm	ใหญ่
3	0.480	1.170	1.651	0.026	0.709	sm	ใหญ่
4	0.441	1.010	1.451	0.022	0.695	sm	ใหญ่
5	0.429	0.912	1.341	0.021	0.680	sm	ใหญ่
6	0.408	0.923	1.331	0.021	0.693	sm	กลาง
7	0.392	0.914	1.306	0.020	0.700	sm	กลาง
8	0.439	1.248	1.687	0.026	0.740	a	ใหญ่
9	0.440	1.156	1.596	0.025	0.724	a	ใหญ่
10	0.408	1.141	1.549	0.024	0.736	a	ใหญ่
11	0.367	1.159	1.526	0.024	0.760	a	ใหญ่
12	0.383	1.080	1.463	0.023	0.738	a	ใหญ่
13	0.329	1.006	1.336	0.021	0.753	a	กลาง
14	0.300	0.881	1.182	0.018	0.746	a	กลาง
15	0.000	1.663	1.663	0.026	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.506	1.506	0.023	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.334	1.334	0.021	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.279	1.279	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.241	1.241	0.019	1.000	t	กลาง
20	0.000	1.206	1.206	0.019	1.000	t	กลาง
21	0.000	1.138	1.138	0.018	1.000	t	กลาง
22	0.000	1.111	1.111	0.017	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.804	0.804	0.012	1.000	t	เล็ก

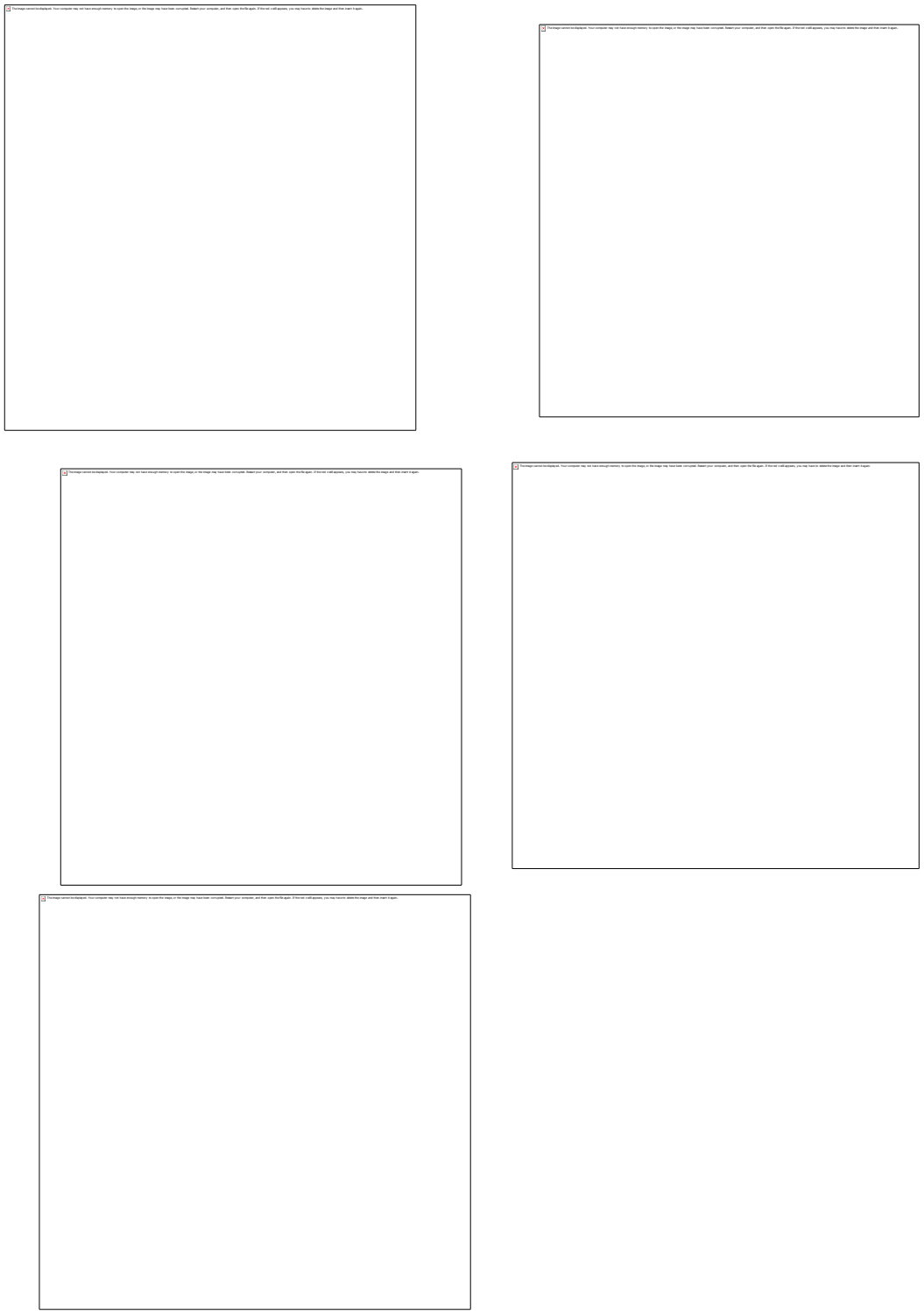
ตารางภาคผนวก ข-4 (ต่อ)

เซลล์ที่ 20

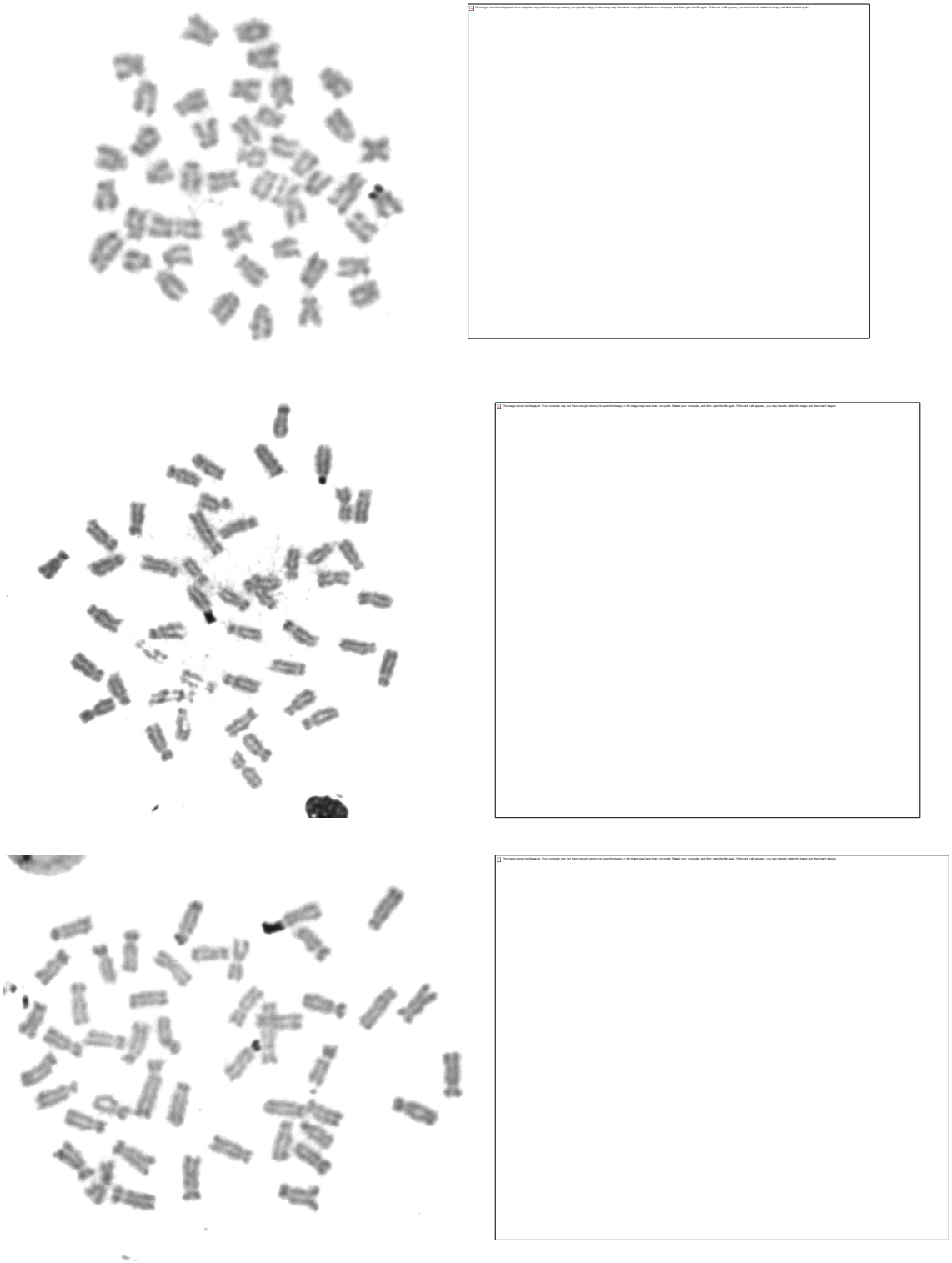
โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.576	1.086	1.663	0.030	0.653	sm	ใหญ่
2	0.491	0.849	1.340	0.024	0.634	sm	ใหญ่
3	0.433	0.870	1.304	0.023	0.668	sm	ใหญ่
4	0.416	0.876	1.292	0.023	0.678	sm	ใหญ่
5	0.470	0.799	1.269	0.023	0.630	sm	ใหญ่
6	0.415	0.739	1.154	0.021	0.640	sm	กลาง
7	0.389	0.715	1.104	0.020	0.648	sm	กลาง
8	0.452	1.056	1.508	0.027	0.700	a	ใหญ่
9	0.412	1.026	1.439	0.026	0.713	a	ใหญ่
10	0.435	0.963	1.397	0.025	0.689	a	ใหญ่
11	0.410	0.949	1.359	0.024	0.698	a	ใหญ่
12	0.427	0.900	1.327	0.024	0.678	a	ใหญ่
13	0.385	0.866	1.252	0.022	0.692	a	กลาง
14	0.361	0.807	1.168	0.021	0.691	a	กลาง
15	0.000	1.301	1.301	0.023	1.000	t	ใหญ่
16	0.000	1.258	1.258	0.023	1.000	t	ใหญ่
17	0.000	1.229	1.229	0.022	1.000	t	กลาง
18	0.000	1.105	1.105	0.020	1.000	t	กลาง
19	0.000	1.025	1.025	0.018	1.000	t	กลาง
20	0.000	1.005	1.005	0.018	1.000	t	กลาง
21	0.000	0.908	0.908	0.016	1.000	t	กลาง
22	0.000	0.795	0.795	0.014	1.000	t	กลาง
23	0.000	0.655	0.655	0.012	1.000	t	เล็ก



ภาพภาคผนวก ข-12 โครโมโซมระยะเมทาเฟสของปลาอมไข่ครีบยาว เพศผู้



ภาพภาคผนวก ข-13 โครโมโซมระยะเมทาเฟสของปลาอมไข่ครีบยาว เพศผู้



ภาพภาคผนวก ข-14 โครโมโซมระยะเมทาเฟสของปลาอมไข่ครีบยาว เพศเมีย

ภาพภาคผนวก ข-15 โครโมโซมระยะเมทาเฟสของปลาอมไข่ครีบยาว เพศเมีย

ตารางภาคผนวก ข-5 ความยาวโครโมโซมปลาอมไข่ครีบยาวเซลล์ที่ 1 ถึง 22

เซลล์ที่ 1

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.789	0.945	1.734	0.026	0.545	m	กลาง
2	0.628	0.787	1.415	0.021	0.556	m	กลาง
3	0.467	1.321	1.788	0.026	0.739	a	กลาง
4	0.590	1.608	2.198	0.032	0.732	a	ใหญ่
5	0.503	1.278	1.781	0.026	0.718	a	ใหญ่
6	0.408	1.247	1.655	0.024	0.753	a	ใหญ่
7	0.427	1.125	1.552	0.023	0.725	a	กลาง
8	0.489	1.044	1.532	0.023	0.681	sm	กลาง
9	0.455	1.044	1.499	0.022	0.696	a	กลาง
10	0.601	0.906	1.507	0.022	0.601	sm	กลาง
11	0.550	0.900	1.450	0.021	0.621	sm	กลาง
12	0.443	1.004	1.447	0.021	0.694	sm	กลาง
13	0.409	1.030	1.439	0.021	0.716	a	กลาง
14	0.423	1.004	1.427	0.021	0.703	a	กลาง
15	0.279	1.126	1.405	0.021	0.801	a	กลาง
16	0.325	1.068	1.392	0.021	0.767	a	กลาง
17	0.315	1.065	1.380	0.020	0.772	a	กลาง
18	0.618	0.757	1.375	0.020	0.550	sm	กลาง
19	0.395	0.945	1.339	0.020	0.705	a	กลาง
20	0.426	0.855	1.282	0.019	0.667	sm	กลาง
21	0.396	0.847	1.243	0.018	0.681	sm	กลาง
22	0.361	0.877	1.238	0.018	0.708	a	กลาง
23	0.274	0.903	1.177	0.017	0.767	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 2

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.618	0.646	1.264	0.024	0.511	m	กลาง
2	0.456	0.542	0.998	0.019	0.543	m	กลาง
3	0.557	1.051	1.607	0.031	0.654	a	กลาง
4	0.437	1.176	1.613	0.031	0.729	a	ใหญ่
5	0.437	0.978	1.415	0.027	0.691	a	ใหญ่
6	0.337	0.927	1.264	0.024	0.733	a	ใหญ่
7	0.363	0.904	1.267	0.024	0.714	a	กลาง
8	0.421	0.750	1.171	0.023	0.640	sm	กลาง
9	0.357	0.839	1.195	0.023	0.702	a	กลาง
10	0.328	0.817	1.144	0.022	0.714	sm	กลาง
11	0.329	0.750	1.079	0.021	0.695	sm	กลาง
12	0.325	0.736	1.060	0.020	0.694	sm	กลาง
13	0.291	0.841	1.132	0.022	0.743	a	กลาง
14	0.329	0.781	1.110	0.021	0.703	a	กลาง
15	0.304	0.849	1.153	0.022	0.737	a	กลาง
16	0.323	0.762	1.085	0.021	0.702	a	กลาง
17	0.285	0.774	1.060	0.020	0.731	a	กลาง
18	0.335	0.721	1.056	0.020	0.682	sm	กลาง
19	0.291	0.754	1.045	0.020	0.721	a	กลาง
20	0.309	0.624	0.933	0.018	0.669	sm	กลาง
21	0.274	0.579	0.853	0.016	0.679	sm	กลาง
22	0.285	0.730	1.015	0.020	0.719	a	กลาง
23	0.262	0.674	0.936	0.018	0.720	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 3

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.602	0.684	1.287	0.022	0.532	m	กลาง
2	0.510	0.597	1.107	0.019	0.539	m	กลาง
3	0.408	0.996	1.404	0.024	0.709	a	กลาง
4	0.389	1.333	1.722	0.029	0.774	a	ใหญ่
5	0.393	1.038	1.431	0.024	0.726	a	ใหญ่
6	0.379	1.033	1.413	0.024	0.731	a	ใหญ่
7	0.391	0.957	1.348	0.023	0.710	a	กลาง
8	0.517	0.990	1.506	0.026	0.657	sm	กลาง
9	0.383	0.942	1.326	0.023	0.711	a	กลาง
10	0.500	0.806	1.306	0.022	0.617	sm	กลาง
11	0.402	0.812	1.215	0.021	0.669	sm	กลาง
12	0.379	0.880	1.260	0.022	0.699	sm	กลาง
13	0.363	0.962	1.325	0.023	0.726	a	กลาง
14	0.369	0.930	1.299	0.022	0.716	a	กลาง
15	0.250	0.978	1.228	0.021	0.797	a	กลาง
16	0.356	0.880	1.236	0.021	0.712	a	กลาง
17	0.295	0.935	1.230	0.021	0.760	a	กลาง
18	0.391	0.785	1.176	0.020	0.667	sm	กลาง
19	0.365	0.841	1.206	0.021	0.697	a	กลาง
20	0.391	0.780	1.171	0.020	0.666	sm	กลาง
21	0.350	0.670	1.020	0.017	0.657	sm	กลาง
22	0.321	0.833	1.154	0.020	0.722	a	กลาง
23	0.330	0.859	1.190	0.020	0.722	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 4

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.571	0.648	1.219	0.021	0.531	m	กลาง
2	0.495	0.568	1.063	0.018	0.534	m	กลาง
3	0.370	0.989	1.359	0.023	0.727	a	กลาง
4	0.354	1.237	1.591	0.027	0.778	a	ใหญ่
5	0.404	1.010	1.414	0.024	0.714	a	ใหญ่
6	0.370	0.984	1.355	0.023	0.727	a	ใหญ่
7	0.412	0.934	1.346	0.023	0.694	a	กลาง
8	0.508	0.983	1.490	0.025	0.659	sm	กลาง
9	0.396	0.925	1.321	0.023	0.700	a	กลาง
10	0.497	0.788	1.285	0.022	0.613	sm	กลาง
11	0.394	0.817	1.211	0.021	0.675	sm	กลาง
12	0.357	0.898	1.254	0.021	0.716	sm	กลาง
13	0.342	0.977	1.319	0.023	0.741	a	กลาง
14	0.376	0.892	1.268	0.022	0.704	a	กลาง
15	0.262	0.939	1.202	0.021	0.782	a	กลาง
16	0.350	0.847	1.197	0.020	0.707	a	กลาง
17	0.270	0.908	1.178	0.020	0.771	a	กลาง
18	0.389	0.786	1.175	0.020	0.669	sm	กลาง
19	0.335	0.827	1.162	0.020	0.711	a	กลาง
20	0.394	0.764	1.158	0.020	0.660	sm	กลาง
21	0.346	0.659	1.006	0.017	0.656	sm	กลาง
22	0.338	0.821	1.160	0.020	0.708	a	กลาง
23	0.304	0.864	1.167	0.020	0.740	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 5

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.579	0.666	1.245	0.021	0.535	m	กลาง
2	0.528	0.545	1.074	0.018	0.508	m	กลาง
3	0.396	1.030	1.426	0.024	0.722	a	กลาง
4	0.586	1.418	2.004	0.034	0.708	a	ใหญ่
5	0.430	1.033	1.463	0.025	0.706	a	ใหญ่
6	0.405	1.088	1.494	0.025	0.729	a	ใหญ่
7	0.371	1.027	1.398	0.024	0.734	a	กลาง
8	0.423	0.918	1.340	0.023	0.685	sm	กลาง
9	0.409	0.979	1.389	0.024	0.705	a	กลาง
10	0.416	0.812	1.228	0.021	0.661	sm	กลาง
11	0.329	0.930	1.259	0.021	0.738	sm	กลาง
12	0.485	0.800	1.284	0.022	0.623	sm	กลาง
13	0.313	1.004	1.317	0.022	0.762	a	กลาง
14	0.324	0.962	1.286	0.022	0.748	a	กลาง
15	0.315	0.903	1.218	0.021	0.741	a	กลาง
16	0.337	0.888	1.226	0.021	0.725	a	กลาง
17	0.321	0.886	1.207	0.020	0.734	a	กลาง
18	0.405	0.781	1.186	0.020	0.658	sm	กลาง
19	0.373	0.845	1.217	0.021	0.694	a	กลาง
20	0.408	0.775	1.183	0.020	0.655	sm	กลาง
21	0.340	0.718	1.058	0.018	0.679	sm	กลาง
22	0.360	0.833	1.193	0.020	0.698	a	กลาง
23	0.332	0.811	1.143	0.019	0.710	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 6

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.864	0.888	1.752	0.022	0.507	m	กลาง
2	0.736	0.830	1.566	0.020	0.530	m	กลาง
3	0.451	1.702	2.153	0.027	0.790	a	กลาง
4	0.724	2.148	2.872	0.036	0.748	a	ใหญ่
5	0.573	1.365	1.938	0.024	0.704	a	ใหญ่
6	0.499	1.428	1.926	0.024	0.741	a	ใหญ่
7	0.483	1.430	1.913	0.024	0.748	a	กลาง
8	0.633	1.248	1.881	0.024	0.664	sm	กลาง
9	0.518	1.366	1.884	0.024	0.725	a	กลาง
10	0.537	1.282	1.819	0.023	0.705	sm	กลาง
11	0.447	1.258	1.705	0.022	0.738	sm	กลาง
12	0.484	1.209	1.693	0.021	0.714	sm	กลาง
13	0.433	1.375	1.808	0.023	0.761	a	กลาง
14	0.376	1.248	1.624	0.021	0.768	a	กลาง
15	0.312	1.550	1.862	0.024	0.832	a	กลาง
16	0.361	1.249	1.611	0.020	0.776	a	กลาง
17	0.338	1.266	1.604	0.020	0.789	a	กลาง
18	0.370	1.135	1.506	0.019	0.754	sm	กลาง
19	0.370	1.200	1.571	0.020	0.764	a	กลาง
20	0.423	1.014	1.437	0.018	0.705	sm	กลาง
21	0.490	0.856	1.345	0.017	0.636	sm	กลาง
22	0.394	1.097	1.491	0.019	0.736	a	กลาง
23	0.343	1.057	1.400	0.018	0.755	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 7

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.841	0.871	1.712	0.022	0.509	m	กลาง
2	0.713	0.826	1.539	0.019	0.537	m	กลาง
3	0.421	1.264	1.685	0.021	0.750	a	กลาง
4	0.564	2.005	2.568	0.032	0.781	a	ใหญ่
5	0.579	1.312	1.891	0.024	0.694	a	ใหญ่
6	0.544	1.380	1.924	0.024	0.717	a	ใหญ่
7	0.465	1.403	1.868	0.024	0.751	a	กลาง
8	0.577	1.253	1.830	0.023	0.685	sm	กลาง
9	0.501	1.342	1.842	0.023	0.728	a	กลาง
10	0.524	1.275	1.799	0.023	0.709	sm	กลาง
11	0.459	1.220	1.678	0.021	0.727	sm	กลาง
12	0.480	1.157	1.637	0.021	0.707	sm	กลาง
13	0.402	1.387	1.789	0.023	0.775	a	กลาง
14	0.382	1.205	1.587	0.020	0.759	a	กลาง
15	0.316	1.475	1.791	0.023	0.823	a	กลาง
16	0.362	1.218	1.581	0.020	0.771	a	กลาง
17	0.319	1.261	1.580	0.020	0.798	a	กลาง
18	0.345	1.154	1.499	0.019	0.770	sm	กลาง
19	0.357	1.186	1.542	0.019	0.769	a	กลาง
20	0.393	0.969	1.362	0.017	0.712	sm	กลาง
21	0.477	0.818	1.296	0.016	0.632	sm	กลาง
22	0.380	1.074	1.454	0.018	0.739	a	กลาง
23	0.330	1.004	1.334	0.017	0.752	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 8

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.685	0.785	1.470	0.027	0.534	m	กลาง
2	0.560	0.617	1.177	0.021	0.524	m	กลาง
3	0.368	0.930	1.297	0.024	0.717	a	กลาง
4	0.532	1.233	1.765	0.032	0.699	a	ใหญ่
5	0.396	1.039	1.435	0.026	0.724	a	ใหญ่
6	0.416	0.966	1.382	0.025	0.699	a	ใหญ่
7	0.376	0.940	1.316	0.024	0.714	a	กลาง
8	0.499	0.953	1.451	0.026	0.656	sm	กลาง
9	0.299	0.981	1.280	0.023	0.766	a	กลาง
10	0.452	0.832	1.284	0.023	0.648	sm	กลาง
11	0.354	0.898	1.252	0.023	0.717	sm	กลาง
12	0.457	0.765	1.222	0.022	0.626	sm	กลาง
13	0.361	0.856	1.217	0.022	0.703	a	กลาง
14	0.371	0.810	1.181	0.021	0.686	a	กลาง
15	0.283	0.880	1.163	0.021	0.757	a	กลาง
16	0.443	0.703	1.146	0.021	0.613	a	กลาง
17	0.342	0.809	1.151	0.021	0.703	a	กลาง
18	0.363	0.715	1.078	0.020	0.663	sm	กลาง
19	0.251	0.811	1.062	0.019	0.763	a	กลาง
20	0.299	0.721	1.020	0.019	0.707	sm	กลาง
21	0.313	0.641	0.955	0.017	0.672	sm	กลาง
22	0.291	0.630	0.921	0.017	0.684	a	กลาง
23	0.216	0.815	1.031	0.019	0.790	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 9

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.409	0.489	0.898	0.023	0.544	m	กลาง
2	0.350	0.437	0.787	0.020	0.555	m	กลาง
3	0.270	0.541	0.811	0.021	0.667	a	กลาง
4	0.396	0.861	1.257	0.032	0.685	a	ใหญ่
5	0.318	0.579	0.897	0.023	0.645	a	ใหญ่
6	0.325	0.622	0.946	0.024	0.657	a	ใหญ่
7	0.256	0.638	0.894	0.023	0.713	a	กลาง
8	0.342	0.545	0.887	0.023	0.615	sm	กลาง
9	0.285	0.557	0.841	0.022	0.662	a	กลาง
10	0.325	0.479	0.804	0.021	0.596	sm	กลาง
11	0.300	0.564	0.864	0.022	0.653	sm	กลาง
12	0.255	0.583	0.838	0.022	0.696	sm	กลาง
13	0.223	0.631	0.854	0.022	0.739	a	กลาง
14	0.237	0.607	0.845	0.022	0.719	a	กลาง
15	0.228	0.636	0.865	0.022	0.736	a	กลาง
16	0.234	0.545	0.779	0.020	0.699	a	กลาง
17	0.215	0.544	0.759	0.020	0.717	a	กลาง
18	0.283	0.484	0.767	0.020	0.631	sm	กลาง
19	0.276	0.460	0.736	0.019	0.625	a	กลาง
20	0.255	0.471	0.725	0.019	0.649	sm	กลาง
21	0.234	0.504	0.739	0.019	0.683	sm	กลาง
22	0.258	0.404	0.662	0.017	0.610	a	กลาง
23	0.191	0.503	0.694	0.018	0.725	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 10

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.518	0.532	1.049	0.022	0.507	m	กลาง
2	0.447	0.463	0.911	0.019	0.509	m	กลาง
3	0.259	0.721	0.980	0.021	0.736	a	กลาง
4	0.427	0.951	1.378	0.029	0.690	a	ใหญ่
5	0.335	0.845	1.180	0.025	0.716	a	ใหญ่
6	0.343	0.859	1.202	0.026	0.715	a	ใหญ่
7	0.316	0.785	1.102	0.024	0.713	a	กลาง
8	0.427	0.717	1.144	0.024	0.627	sm	กลาง
9	0.351	0.707	1.058	0.023	0.668	a	กลาง
10	0.323	0.676	0.999	0.021	0.676	sm	กลาง
11	0.322	0.630	0.952	0.020	0.662	sm	กลาง
12	0.322	0.663	0.985	0.021	0.673	sm	กลาง
13	0.304	0.728	1.031	0.022	0.706	a	กลาง
14	0.289	0.680	0.969	0.021	0.702	a	กลาง
15	0.247	0.718	0.965	0.021	0.744	a	กลาง
16	0.272	0.675	0.947	0.020	0.713	a	กลาง
17	0.265	0.664	0.930	0.020	0.715	a	กลาง
18	0.268	0.645	0.914	0.020	0.706	sm	กลาง
19	0.246	0.646	0.892	0.019	0.724	a	กลาง
20	0.318	0.582	0.900	0.019	0.647	sm	กลาง
21	0.276	0.597	0.873	0.019	0.684	sm	กลาง
22	0.204	0.666	0.870	0.019	0.766	a	กลาง
23	0.285	0.557	0.842	0.018	0.662	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 11

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.478	0.604	1.082	0.022	0.558	m	กลาง
2	0.410	0.579	0.989	0.020	0.586	m	กลาง
3	0.274	0.806	1.080	0.022	0.747	a	กลาง
4	0.425	0.963	1.387	0.029	0.694	a	ใหญ่
5	0.333	0.794	1.127	0.023	0.704	a	ใหญ่
6	0.309	0.826	1.135	0.023	0.728	a	ใหญ่
7	0.308	0.799	1.106	0.023	0.722	a	กลาง
8	0.443	0.674	1.117	0.023	0.603	sm	กลาง
9	0.361	0.688	1.049	0.022	0.656	a	กลาง
10	0.229	0.859	1.089	0.022	0.789	sm	กลาง
11	0.361	0.683	1.044	0.022	0.654	sm	กลาง
12	0.319	0.691	1.010	0.021	0.684	sm	กลาง
13	0.282	0.772	1.054	0.022	0.733	a	กลาง
14	0.296	0.787	1.083	0.022	0.727	a	กลาง
15	0.195	0.837	1.032	0.021	0.811	a	กลาง
16	0.288	0.726	1.014	0.021	0.716	a	กลาง
17	0.262	0.721	0.983	0.020	0.733	a	กลาง
18	0.277	0.618	0.895	0.018	0.691	sm	กลาง
19	0.291	0.691	0.983	0.020	0.704	a	กลาง
20	0.315	0.613	0.928	0.019	0.660	sm	กลาง
21	0.333	0.550	0.883	0.018	0.623	sm	กลาง
22	0.244	0.706	0.950	0.020	0.743	a	กลาง
23	0.216	0.594	0.811	0.017	0.733	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 12

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.525	0.655	1.180	0.021	0.555	m	กลาง
2	0.480	0.577	1.057	0.019	0.546	m	กลาง
3	0.312	0.866	1.178	0.021	0.735	a	กลาง
4	0.433	1.274	1.707	0.031	0.746	a	ใหญ่
5	0.404	0.946	1.350	0.024	0.701	a	ใหญ่
6	0.225	1.135	1.360	0.025	0.835	a	ใหญ่
7	0.339	0.953	1.293	0.023	0.737	a	กลาง
8	0.387	0.824	1.211	0.022	0.680	sm	กลาง
9	0.335	0.945	1.280	0.023	0.738	a	กลาง
10	0.420	0.785	1.206	0.022	0.651	sm	กลาง
11	0.376	0.789	1.165	0.021	0.677	sm	กลาง
12	0.358	0.793	1.151	0.021	0.689	sm	กลาง
13	0.240	0.924	1.164	0.021	0.794	a	กลาง
14	0.373	0.758	1.131	0.020	0.670	a	กลาง
15	0.223	0.999	1.222	0.022	0.818	a	กลาง
16	0.272	0.878	1.150	0.021	0.764	a	กลาง
17	0.276	0.851	1.127	0.020	0.755	a	กลาง
18	0.415	0.702	1.117	0.020	0.629	sm	กลาง
19	0.343	0.787	1.130	0.020	0.697	a	กลาง
20	0.363	0.726	1.089	0.020	0.667	sm	กลาง
21	0.373	0.674	1.047	0.019	0.644	sm	กลาง
22	0.324	0.718	1.042	0.019	0.689	a	กลาง
23	0.229	0.703	0.932	0.017	0.754	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 13

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.762	0.806	1.568	0.027	0.514	m	กลาง
2	0.670	0.759	1.429	0.024	0.531	m	กลาง
3	0.510	0.897	1.407	0.024	0.637	a	กลาง
4	0.517	1.250	1.768	0.030	0.707	a	ใหญ่
5	0.408	0.979	1.387	0.024	0.706	a	ใหญ่
6	0.382	1.118	1.500	0.026	0.745	a	ใหญ่
7	0.350	0.991	1.342	0.023	0.739	a	กลาง
8	0.552	0.968	1.520	0.026	0.637	sm	กลาง
9	0.462	0.919	1.382	0.024	0.666	a	กลาง
10	0.450	0.821	1.271	0.022	0.646	sm	กลาง
11	0.485	0.741	1.226	0.021	0.605	sm	กลาง
12	0.382	0.901	1.283	0.022	0.702	sm	กลาง
13	0.369	0.866	1.235	0.021	0.701	a	กลาง
14	0.384	0.845	1.229	0.021	0.687	a	กลาง
15	0.340	0.942	1.282	0.022	0.735	a	กลาง
16	0.329	0.853	1.182	0.020	0.722	a	กลาง
17	0.316	0.845	1.161	0.020	0.728	a	กลาง
18	0.383	0.715	1.098	0.019	0.651	sm	กลาง
19	0.304	0.840	1.143	0.019	0.734	a	กลาง
20	0.363	0.721	1.084	0.018	0.665	sm	กลาง
21	0.363	0.680	1.043	0.018	0.652	sm	กลาง
22	0.316	0.764	1.080	0.018	0.707	a	กลาง
23	0.309	0.743	1.052	0.018	0.706	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 14

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.944	0.962	1.906	0.023	0.505	m	กลาง
2	0.824	0.853	1.677	0.020	0.509	m	กลาง
3	0.450	1.343	1.794	0.022	0.749	a	กลาง
4	0.571	1.831	2.401	0.029	0.762	a	ใหญ่
5	0.446	1.680	2.126	0.026	0.790	a	ใหญ่
6	0.429	1.537	1.966	0.024	0.782	a	ใหญ่
7	0.508	1.426	1.933	0.023	0.737	a	กลาง
8	0.615	1.371	1.986	0.024	0.690	sm	กลาง
9	0.525	1.368	1.893	0.023	0.723	a	กลาง
10	0.518	1.395	1.913	0.023	0.729	sm	กลาง
11	0.573	1.222	1.796	0.022	0.681	sm	กลาง
12	0.523	1.278	1.801	0.022	0.710	sm	กลาง
13	0.463	1.497	1.961	0.024	0.764	a	กลาง
14	0.459	1.453	1.912	0.023	0.760	a	กลาง
15	0.309	1.374	1.683	0.020	0.816	a	กลาง
16	0.491	1.382	1.873	0.022	0.738	a	กลาง
17	0.405	1.396	1.801	0.022	0.775	a	กลาง
18	0.566	1.100	1.666	0.020	0.660	sm	กลาง
19	0.416	1.314	1.730	0.021	0.759	a	กลาง
20	0.504	1.103	1.608	0.019	0.686	sm	กลาง
21	0.476	0.989	1.465	0.018	0.675	sm	กลาง
22	0.466	1.182	1.648	0.020	0.717	a	กลาง
23	0.383	1.163	1.546	0.019	0.752	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 15

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.930	1.001	1.931	0.024	0.519	m	กลาง
2	0.806	0.999	1.806	0.022	0.553	m	กลาง
3	0.683	1.396	2.079	0.025	0.671	a	กลาง
4	0.644	1.784	2.428	0.030	0.735	a	ใหญ่
5	0.590	1.465	2.055	0.025	0.713	a	ใหญ่
6	0.435	1.457	1.893	0.023	0.770	a	ใหญ่
7	0.513	1.381	1.894	0.023	0.729	a	กลาง
8	0.631	1.251	1.882	0.023	0.665	sm	กลาง
9	0.550	1.262	1.812	0.022	0.696	a	กลาง
10	0.531	1.258	1.789	0.022	0.703	sm	กลาง
11	0.611	1.100	1.711	0.021	0.643	sm	กลาง
12	0.506	1.322	1.828	0.022	0.723	sm	กลาง
13	0.389	1.393	1.783	0.022	0.782	a	กลาง
14	0.501	1.297	1.798	0.022	0.722	a	กลาง
15	0.399	1.290	1.689	0.021	0.764	a	กลาง
16	0.444	1.275	1.719	0.021	0.742	a	กลาง
17	0.450	1.224	1.674	0.020	0.731	a	กลาง
18	0.560	1.090	1.651	0.020	0.661	sm	กลาง
19	0.471	1.148	1.619	0.020	0.709	a	กลาง
20	0.560	1.069	1.629	0.020	0.656	sm	กลาง
21	0.474	0.977	1.451	0.018	0.673	sm	กลาง
22	0.453	1.191	1.645	0.020	0.724	a	กลาง
23	0.457	1.133	1.590	0.019	0.713	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 16

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.916	0.921	1.837	0.022	0.501	m	กลาง
2	0.809	0.859	1.668	0.020	0.515	m	กลาง
3	0.390	1.435	1.825	0.022	0.786	a	กลาง
4	0.633	1.761	2.394	0.029	0.736	a	ใหญ่
5	0.550	1.481	2.031	0.025	0.729	a	ใหญ่
6	0.444	1.448	1.892	0.023	0.765	a	ใหญ่
7	0.491	1.381	1.872	0.023	0.738	a	กลาง
8	0.628	1.246	1.875	0.023	0.665	sm	กลาง
9	0.541	1.236	1.777	0.022	0.696	a	กลาง
10	0.528	1.253	1.782	0.022	0.703	sm	กลาง
11	0.592	1.103	1.695	0.021	0.651	sm	กลาง
12	0.493	1.311	1.804	0.022	0.726	sm	กลาง
13	0.382	1.379	1.761	0.022	0.783	a	กลาง
14	0.508	1.267	1.775	0.022	0.714	a	กลาง
15	0.404	1.264	1.668	0.020	0.758	a	กลาง
16	0.424	1.279	1.704	0.021	0.751	a	กลาง
17	0.450	1.201	1.651	0.020	0.727	a	กลาง
18	0.542	1.107	1.649	0.020	0.671	sm	กลาง
19	0.471	1.145	1.616	0.020	0.709	a	กลาง
20	0.544	1.059	1.602	0.020	0.661	sm	กลาง
21	0.466	0.968	1.434	0.018	0.675	sm	กลาง
22	0.439	1.154	1.593	0.019	0.724	a	กลาง
23	0.457	1.130	1.587	0.019	0.712	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 17

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.662	0.797	1.459	0.022	0.547	m	กลาง
2	0.611	0.713	1.324	0.020	0.539	m	กลาง
3	0.393	1.260	1.653	0.024	0.762	a	กลาง
4	0.571	1.492	2.063	0.030	0.723	a	ใหญ่
5	0.462	1.092	1.554	0.023	0.703	a	ใหญ่
6	0.446	1.290	1.736	0.026	0.743	a	ใหญ่
7	0.453	1.051	1.505	0.022	0.699	a	กลาง
8	0.510	1.106	1.616	0.024	0.684	sm	กลาง
9	0.537	1.027	1.564	0.023	0.657	a	กลาง
10	0.500	0.996	1.496	0.022	0.666	sm	กลาง
11	0.471	0.972	1.442	0.021	0.674	sm	กลาง
12	0.436	1.009	1.445	0.021	0.698	sm	กลาง
13	0.389	1.038	1.428	0.021	0.727	a	กลาง
14	0.471	0.925	1.396	0.021	0.663	a	กลาง
15	0.393	1.030	1.423	0.021	0.724	a	กลาง
16	0.404	0.959	1.363	0.020	0.704	a	กลาง
17	0.358	0.981	1.338	0.020	0.733	a	กลาง
18	0.436	0.953	1.389	0.021	0.686	sm	กลาง
19	0.415	0.911	1.326	0.020	0.687	a	กลาง
20	0.450	0.880	1.330	0.020	0.662	sm	กลาง
21	0.396	0.812	1.208	0.018	0.672	sm	กลาง
22	0.382	0.870	1.252	0.018	0.695	a	กลาง
23	0.350	0.851	1.201	0.018	0.709	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 18

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.696	0.880	1.576	0.024	0.558	m	กลาง
2	0.648	0.685	1.333	0.020	0.514	m	กลาง
3	0.363	1.146	1.509	0.023	0.759	a	กลาง
4	0.591	1.273	1.864	0.028	0.683	a	ใหญ่
5	0.471	1.031	1.502	0.023	0.687	a	ใหญ่
6	0.394	1.119	1.513	0.023	0.740	a	ใหญ่
7	0.427	1.049	1.476	0.022	0.711	a	กลาง
8	0.603	0.906	1.509	0.023	0.600	sm	กลาง
9	0.541	0.959	1.499	0.023	0.639	a	กลาง
10	0.528	0.883	1.411	0.021	0.626	sm	กลาง
11	0.521	0.830	1.350	0.020	0.614	sm	กลาง
12	0.450	0.969	1.419	0.021	0.683	sm	กลาง
13	0.423	0.978	1.401	0.021	0.698	a	กลาง
14	0.463	0.954	1.417	0.021	0.673	a	กลาง
15	0.356	0.973	1.328	0.020	0.732	a	กลาง
16	0.420	0.933	1.353	0.020	0.689	a	กลาง
17	0.429	0.926	1.355	0.021	0.683	a	กลาง
18	0.504	0.892	1.396	0.021	0.639	sm	กลาง
19	0.537	0.844	1.381	0.021	0.611	a	กลาง
20	0.467	0.804	1.271	0.019	0.633	sm	กลาง
21	0.425	0.716	1.141	0.017	0.628	sm	กลาง
22	0.387	0.925	1.312	0.020	0.705	a	กลาง
23	0.396	0.853	1.249	0.019	0.683	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 19

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.683	0.854	1.537	0.021	0.556	m	กลาง
2	0.664	0.699	1.364	0.019	0.513	m	กลาง
3	0.425	1.273	1.697	0.023	0.750	a	กลาง
4	0.674	1.576	2.250	0.031	0.700	a	ใหญ่
5	0.479	1.199	1.677	0.023	0.715	a	ใหญ่
6	0.394	1.269	1.663	0.023	0.763	a	ใหญ่
7	0.412	1.245	1.657	0.023	0.751	a	กลาง
8	0.522	1.137	1.659	0.023	0.685	sm	กลาง
9	0.465	1.154	1.619	0.022	0.713	a	กลาง
10	0.504	1.004	1.508	0.021	0.666	sm	กลาง
11	0.509	0.954	1.463	0.020	0.652	sm	กลาง
12	0.474	1.022	1.497	0.021	0.683	sm	กลาง
13	0.318	1.258	1.576	0.022	0.798	a	กลาง
14	0.404	1.184	1.587	0.022	0.746	a	กลาง
15	0.276	1.201	1.477	0.020	0.813	a	กลาง
16	0.295	1.226	1.521	0.021	0.806	a	กลาง
17	0.297	1.162	1.459	0.020	0.796	a	กลาง
18	0.404	1.071	1.475	0.020	0.726	sm	กลาง
19	0.330	1.120	1.450	0.020	0.772	a	กลาง
20	0.480	0.893	1.373	0.019	0.650	sm	กลาง
21	0.474	0.886	1.360	0.019	0.652	sm	กลาง
22	0.402	1.004	1.407	0.019	0.714	a	กลาง
23	0.396	0.977	1.373	0.019	0.712	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 20

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.885	0.900	1.785	0.024	0.504	m	กลาง
2	0.718	0.783	1.501	0.020	0.522	m	กลาง
3	0.285	1.317	1.603	0.022	0.822	a	กลาง
4	0.553	1.653	2.206	0.030	0.749	a	ใหญ่
5	0.450	1.324	1.775	0.024	0.746	a	ใหญ่
6	0.436	1.420	1.856	0.025	0.765	a	ใหญ่
7	0.424	1.215	1.640	0.022	0.741	a	กลาง
8	0.453	1.145	1.598	0.022	0.716	sm	กลาง
9	0.463	1.115	1.578	0.021	0.706	a	กลาง
10	0.467	1.102	1.569	0.021	0.702	sm	กลาง
11	0.470	1.033	1.503	0.020	0.688	sm	กลาง
12	0.432	1.180	1.611	0.022	0.732	sm	กลาง
13	0.405	1.206	1.611	0.022	0.748	a	กลาง
14	0.399	1.157	1.557	0.021	0.743	a	กลาง
15	0.346	1.159	1.505	0.020	0.770	a	กลาง
16	0.371	1.167	1.538	0.021	0.759	a	กลาง
17	0.417	1.076	1.493	0.020	0.721	a	กลาง
18	0.466	1.031	1.497	0.020	0.689	sm	กลาง
19	0.410	1.093	1.502	0.020	0.727	a	กลาง
20	0.466	0.990	1.456	0.020	0.680	sm	กลาง
21	0.409	0.945	1.354	0.018	0.698	sm	กลาง
22	0.390	1.088	1.479	0.020	0.736	a	กลาง
23	0.427	0.955	1.382	0.019	0.691	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 21

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	0.699	1.001	1.701	0.022	0.589	m	กลาง
2	0.722	0.934	1.657	0.022	0.564	m	กลาง
3	0.368	1.273	1.641	0.021	0.776	a	กลาง
4	0.616	1.733	2.349	0.031	0.738	a	ใหญ่
5	0.480	1.290	1.770	0.023	0.729	a	ใหญ่
6	0.386	1.296	1.681	0.022	0.771	a	ใหญ่
7	0.482	1.205	1.687	0.022	0.714	a	กลาง
8	0.527	1.226	1.753	0.023	0.700	sm	กลาง
9	0.496	1.172	1.668	0.022	0.703	a	กลาง
10	0.454	1.241	1.695	0.022	0.732	sm	กลาง
11	0.437	1.221	1.658	0.022	0.736	sm	กลาง
12	0.413	1.224	1.637	0.021	0.748	sm	กลาง
13	0.375	1.309	1.684	0.022	0.777	a	กลาง
14	0.455	1.180	1.635	0.021	0.721	a	กลาง
15	0.379	1.190	1.569	0.021	0.758	a	กลาง
16	0.395	1.201	1.595	0.021	0.753	a	กลาง
17	0.450	1.082	1.532	0.020	0.706	a	กลาง
18	0.499	1.004	1.502	0.020	0.668	sm	กลาง
19	0.405	1.085	1.490	0.019	0.728	a	กลาง
20	0.467	0.962	1.429	0.019	0.673	sm	กลาง
21	0.455	0.966	1.421	0.019	0.680	sm	กลาง
22	0.335	1.180	1.515	0.020	0.779	a	กลาง
23	0.376	1.033	1.409	0.018	0.733	a	กลาง

ตารางภาคผนวก ข-5 (ต่อ)

เซลล์ที่ 22

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL	CI	ชนิด	ขนาด
1	1.062	1.084	2.146	0.022	0.505	m	กลาง
2	0.825	0.975	1.800	0.018	0.542	m	กลาง
3	0.718	1.739	2.457	0.025	0.708	a	กลาง
4	0.830	2.127	2.957	0.030	0.719	a	ใหญ่
5	0.670	1.779	2.449	0.025	0.726	a	ใหญ่
6	0.641	1.845	2.485	0.025	0.742	a	ใหญ่
7	0.662	1.773	2.435	0.024	0.728	a	กลาง
8	1.029	1.632	2.661	0.027	0.613	sm	กลาง
9	0.705	1.463	2.168	0.022	0.675	a	กลาง
10	0.783	1.474	2.257	0.023	0.653	sm	กลาง
11	0.718	1.450	2.168	0.022	0.669	sm	กลาง
12	0.663	1.495	2.158	0.022	0.693	sm	กลาง
13	0.705	1.377	2.082	0.021	0.661	a	กลาง
14	0.713	1.343	2.056	0.021	0.653	a	กลาง
15	0.510	1.527	2.038	0.020	0.750	a	กลาง
16	0.607	1.542	2.149	0.022	0.717	a	กลาง
17	0.638	1.437	2.075	0.021	0.692	a	กลาง
18	0.664	1.398	2.062	0.021	0.678	sm	กลาง
19	0.552	1.448	2.000	0.020	0.724	a	กลาง
20	0.649	1.366	2.015	0.020	0.678	sm	กลาง
21	0.583	1.162	1.746	0.018	0.666	sm	กลาง
22	0.544	1.423	1.967	0.020	0.724	a	กลาง
23	0.571	1.351	1.923	0.019	0.703	a	กลาง

ภาคผนวก ค

ข้อมูลเผยแพร่ดุษฎีนิพนธ์

ได้รับการยอมรับการตีพิมพ์ลงในวารสารระดับนานาชาติ 2 เรื่อง

1. Kasiroek, W., Indananda, C., Pinthong, K., Supiwong, W. and Tanomtong, A. (2016). NOR Polymorphism and Chromosome Analysisof BanggaiCardinalfish, *Pterapogon kauderni* (Perciformes, Apogonidae). *Cytologia.* Accepted.
2. Kasiroek, W., Indananda, C., Luangoon, N. , Pinthong, K., Supiwong, W. and Tanomtong, A. (2016). First Chromosome Analysis of the Humpback Cardinalfish, *Fibramia lateralis* (Perciformes, Apogonidae). *Cytologia.* Accepted.

NOR Polymorphism and Chromosome Analysis of Banggai Cardinalfish, *Pterapogon kauderni* (Perciformes, Apogonidae)

Wannapa Kasiroek[1, 2],ChantraIndananda[3],Krit Pinthong[4], Weerayuth Supiwong[5] and Alongklod Tanomtong[6*]

[1]Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Muang, Chonburi20131,Thailand

[2]Institute of Marine Science, Burapha University, Muang, Chonburi 20131, Thailand

[3]Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Muang, Chonburi 20131, Thailand

[4]Department of Fundamental Science, Faculty of Science and Technology, SurindraRajabhat University,Muang,Surin 32000, Thailand

[5]Faculty of Applied Science and Engineering, KhonKaen University, NongKhai Campus, Muang, NongKhai 43000, Thailand

[6]Toxic Substances in Livestock and Aquatic Animals Research Group,Department of Biology, Faculty ofScience, KhonKaen University, Muang, KhonKaen 40002, Thailand

Received ; *accepted January 29, 2016*

Summary This is the first nucleolar organizer region (NOR) polymorphism and chromosome analysis of Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni* Koumans, 1933). Kidney cell samples were taken from 10male and 10female fish. Mitotic chromosome preparations were prepared directly from kidney cells. Conventional and Ag–NORbanding techniques were applied to stain the chromosomes. The results showed that the diploid chromosome number of *P. kauderni*was 2*n*=46,and the fundamental number (NF) was92 in both males and females. The types of chromosomes were 6large acrocentric, 4 medium metacentric, 14 medium submetacentric, and 22 medium acrocentric chromosomes.The results indicated that the short arm subtelomeric of the acrocentric chromosome pair 13 showed clearly observable NORs. This finding exhibited that three NOR polymorphism patterns were found: 1) homomorphic which shows an equal size of both chromosome pair 13 (13a13a), 2) heteromorphic that displays different sizes of NORs of chromosome pair 13 (13a13c) and 3) heteromorphic which is found in only one homologous chromosome pair 13 (13a13b).There was no observation of strange size chromosomes related to sex. The karyotype formula for *P. Kauderni* was:

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

Key words *Pterapogon kauderni*, Chromosome, NOR polymorphism, Karyotype.

---

*Corresponding author, e–mail: tanomtong@hotmail.com

The Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni*Koumans, 1933) (Fig. 1) belongs to the class Actinopterygii (ray-finned fishes), superorder Percomorpha, order Perciformes, suborder Percoidei, and family Apogonidae(Nelson 2006). Cardinalfishes are a family Apogonidae found in the Atlantic, Indian, and Pacific Oceans; they are chiefly marine, but some species are found in brackish water and a few are found in fresh water. A handful of species are kept in the aquarium and are popular as small, peaceful, and colorful fish. Most species live in tropical or subtropical waters, where they inhabit coral reefs and lagoons (Johnson and Gill 1998).

Nucleolar organizer regions(NORs) are parts of chromosomes in which there are ribosomal ribonucleic acid (rRNA)encoding genes (5.8S, 18S, and 28S). In all eukaryotic organisms, rRNA genes occur in manycopies, thus reflecting high cell demand for rRNA. NORs, as ribosomal gene clusters that were active in previous interphase, formprominent cytogenetic features, namely secondary constrictions (Andraszek *et al*. 2009). An important characteristic of NORs in fish is its inter- and intra-species polymorphism.NOR characterization can be a cytogenetic marker for cytotaxonomic studies and can even aid in constructingphylogenetic hypotheses for severalfish groups. Some fish groups present a simple NOR system characterized by ribosomal cistrons on only one chromosome pair, whereas others have multiple NOR systems composed of cistrons dispersed over several chromosomes (Galetti 1998).

Although basic cytogenetic information is available for Apogonidae (Table 1), little is known about the karyotypic features of apogonids in the Pacific.The present study is the first report on chromosomal characteristics of *P. kauderni* using conventional staining and Ag-NOR bandingtechniques. The results obtained will increase our basic knowledge of the cytogenetics of *P. kauderni*, which could form the basis for future research and provide data to ensure their survival.

Materials and methods

Sample collection

Twenty *P. kauderni* individuals (10 males and 10females) were collected from Phang Nga Coastal Research and Development Center, Thailand. All specimens were maintained in aerated,flowing seawater aquaria until analysis.

Chromosome preparation

Chromosomes were prepared *in vivo* (Nanda *et al.* 1995) as follows. Phytohemagglutinin (PHA) solution was injected into the fish's abdominal cavity. After 24 h, colchicine was injectedinto the fish's intramuscular and/or its abdominal cavity and then left for 2–4 h. The kidney was cut into small pieces, and then squash mixed with 0.075 M KCl. After discarding all largepieces of tissue, 8 mL of cell sediments were transferred to a centrifuge tube and incubated for 25–35 min. The KCl was discarded from the supernatant after centrifugation at 1200 rpm for 8 min.Cells were fixed in fresh, cool fixative (3 methanol: 1 glacial acetic acid) to which up to 8 mL offixative were gradually added before being centrifuged again at 1200 rpm for 8 min, at which timethe supernatant was discarded. The fixation was repeated until the supernatant was clear, and thepellet was mixed with 1 mL of fixative. The mixture was dropped onto a clean and cold slide by amicropipette, and then an air-drying technique was applied.

Chromosome staining

Conventional staining was done using 20% Giemsa's solution for 30 min. Ag–NOR banding technique (Howell and Black 1980) was performed by adding four drops of 50% silver nitrate and 2% gelatinon slides. The slides were then sealed with cover glasses and incubated at 60˚Cfor 5 min. Next, theslides were soaked in distilled water until the cover glasses were separated. Then, they were stained with 20% Giemsa's solution for 1 min.

Results and discussion

Diploid chromosome number, fundamental number and karyotype of P. kauderni

According to the results, this is the first report on *P. kauderni* cytogenetical knowledge. The present investigation revealed that the somatic chromosome number of *P. kauderni*is $2n$=46, the fundamental numbers (NF) were 92 in both males and females (Fig. 2). The types of chromosomes were 6large acrocentric, 4 medium metacentric, 14 medium submetacentric, and 22 medium acrocentric chromosomes. Comparative studies with others in family Apogonidae have shown the samechromosome number as those found in *Apogon doederleini*, *A. notatus*, *Sphaeramia orbicularis* (Ojima and Kojima 1985), *A. endekataenia* (Rishi 1973), *A. lineatus*

(Murofushi 1986), *A*. *moluccensis* (Rishi 1973), *A*. *semilineatus* (Murofushi *et al*. 1980,Ojima and Kojima 1985), and *Nectamiafusca* (Rivlin *et al*. 1986).Similar to other species in family Apogonidae, no cytologically distinguishable sex chromosomewas observed (Araújo *et al*.2010).

According to the previous cytogenetic information of the family Apogonidae, it is known that it has particular cytogenetic features, as they present extremely low diploid values in relation to the order Perciformes, and in some species, a remarkable variation in the karyotype formulae is also found. Such reduction in the diploid number might be as low as 2*n*=34, as reported in *A*. *maculatus* (Rivlin *et al.* 1988). Nevertheless, the chromosomal numbers are reduced, suggesting a high incidence of centric fusions, and high fundamental numbers (NF) are also reported, like in *A*. *nubilus* (2*n*=46, NF=92), which indicates that other rearrangements, such as pericentric inversions, have also played a major role in the chromosomal diversification of this fish group.

The chromosome information of the family Apogonidae revealed that 62.5% of all species analyzed so far (N=16 spp.) present diploid values equal to 2*n*=46, suggesting this should be an ancestor condition for this family. Among them, thespecies *A. endekataenia*and *A. moluccensis* are characterized by a karyotype exclusively composed of telocentric chromosomes (Rishi, 1973), a symplesiomorphic cytogenetic feature widely observed within the order Perciformes (Molina 2006). Accordingly, the available data indicates a great karyotypic diversity in the evolution of the group regarding both diploid number and chromosomal formulas, resulting in high fundamental numbers (NF=46–92). This scenario indicates a simultaneous occurrence of different mechanisms of karyotypic diversification in the family Apogonidae, mainly Robertsonian rearrangements and pericentric inversions (Araújo *et al*. 2010). The karyotype formula for *P*. *kauderni*is as follows:

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

Chromosome markers of P. kauderni

This is the first report on *P*. *kauderni* accomplished by Ag-NOR banding technique. The technique showdark bands (NOR-position) on the short arm subtelomeric of acrocentric chromosome pair 13 in both males and females (Figs. 3 and 4). For other comparative studies, the species in the family Apogonidae, *A*. *americanus*,hada NOR on the short arm subtelomeric of submetacentric chromosome pair 8 (Araújo *et al*.2010).

Our obtained results indicated that the short arm subtelomeric of the acrocentric chromosome pair 13 showed clearly observable NORs in all of 20 examined fish (10male and 10female fish). It was found that the respective NOR polymorphism patterns were detected in three, six and one of both male and female fish. Three karyotypic patterns of this fish are described below:1) homomorphic which shows an equal size of both chromosome pair 13 (13a13a), 2) heteromorphic that displays different sizes of NORs of chromosome pair 13 (13a13c) and 3) heteromorphic which is found in only one homologous chromosome pair 13 (13a13b).This is in agreement with several previous reports on *Moenkhausia sanctae filomenae* (Forest*et al.* 1989), *Aphanius fasciatus* (Vitturi*et al.*1995), *Leporinus friderici* (Galetti*et al.* 1995), *Salmo trutta* (Castro *et al.* 1996), *Salvelinus alpines* (Reed and Phillips 1997), *Chondrostoma lusitanicum* (Collares-Pereira and Ráb 1999), *Hoplias malabaricus* (Born and Bertollo 2000), *Oedalechilus labeo* (Rossi *et al.* 2000), *Astyanaxscabripinnis* (Soza*et al.* 2001), *A. altiparanae* (Mantovani*et al.* 2005), *Bryconamericus*aff.*exodon* (Paintner-Marques *et al.* 2002), *Apareiodon affinis*(Jorge and Filho 2004), *Aphanius fasciatus*(Vitturi *et al.* 2005), *Prochilodus lineatus*(Gras *et al.* 2007), *B.* aff. *iheringii*(Capistano*et al*. 2008), *Puntioplites proctozysron*(Supiwong*et al.* 2012), and *Lutjanus johnii* (Phimphan*et al.* 2013).

NORs play an important role in the display of perfect markers to display chromosomal polymorphism within and between species in many groups of fish. This variety may affect the NOR number, its localization on the chromosome, size, and active numbers in each genome. The previous studies of NOR exhibited variations between species, within species, and even between individuals (Castro*et al.* 1996). NORs on different homologous chromosomes may have different sizes. Some fish may even indicate a difference of up to a factor of two in size between NORs found on the same homologous chromosome. This is in accordance with previous reportsthat this extent of variety between NORs may be attributed to the number of cistrons and differences in transcriptional activity (Galetti *et al.* 1984).

In a view of both macro and microevolutionary points, NORs are very dynamic regions in evolutionary terms. These regions have been frequently used as phylogenetic markers (Amemiya and Gold 1988), and consequently ledto differences in chromosome location being detected even between sibling species (Volleth 1987). These changes in position during evolution have been quite often attributed to chromosome rearrangements (Hall and Parker 1995). In

another way, conventional cytogenetic and the most recent hybridization techniques have shown NOR regions to be also polymorphic both in number and location within species (Schmid *et al*. 1995). Although one NOR–bearing chromosome pair is usually considered plesiomorphic in most groups analyzed, some vertebrate species show a multichromosomal location of NORs (Suzuki *et al*. 1990). A constant number of several stable NOR sites has been usually observed in these species, but in some cases, the multichromosomal pattern appears to be unstable (Castro *et al*. 2000).

The asymmetrical karyotype of *P*. *kauderni* with three types of chromosomes (metacentric, submetacentric, and acrocentric chromosomes) found in this study is the important chromosome marker. The idiogram shows continuous length gradation chromosomes (Figs. 5 and 6). The size difference between the largest and the smallest chromosomesis approximately twofold. The chromosome marker of *P*. *kauderni*, chromosome pair 10, is the largest acrocentric chromosome. Data of the chromosomal checks on mitotic metaphase cells of the *P*. *kauderni*are shown inTable 2.

Acknowledgements

This work was supported by the doctoral thesis support grant from the Faculty of Science, Burapha University, fiscal year 2015 and Institute of Marine Science, Burapha University.

References

Alvarez, M.C., Otis, J., Amores, A. and Guise, K. 1991.Short-term cell culture techniquefor obtaining chromosomes in marine and freshwater fish. J. Fish Biol.**39**: 817–824.

Amemiya, C. T.,and Gold, J. R. 1988.Chromosomal NORs astaxonomic and systematic characters in North American cyprinid fishes.Genetica**76**: 81–90.

Andraszek, K., Horoszewicz, E. and Smalec, E. 2009.Nucleolar organizer regions, satellite associationsand nucleoli of goat cells (*Capra hircus*). Arch.Tierz.**52**: 177–186.

Araújo, W. C., Martínez, P. A. and Molina, W. F. 2010.Mapping of ribosomal DNA by FISH, *EcoRL* digestion and replication bands in the cardinalfish*Apogonamericanus* (Perciformes).Cytologia**75**: 109–117.

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

Capistano, T. G., Portela Castro, A. L. B. and Julio–Junior, H. F. 2008. Chromosome divergence and NOR polymorphismin *Bryconamericus*aff. *iheringii*(Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema andlvaí river, Paraná, Brazil. Genet. Mol. Biol. **31**: 203–207.

Castro, J., Rodríguez, S., Pardo, B. G., Sánchez, L. and Martínez, P. 2000. Population analysis of an unusual NORsite polymorphism in brow trout (*Salmotrutta* L.). Heredity **86**: 291–302.

Castro, J., Viñas, A., Sánchez, L. and Martínez, P. 1996. Characterization of an atypical NOR site polymorphism in browntrout (*Salmotrutta*) with Ag– and CMA3–staining, and fluorescent *in situ* hybridization. Cytogenet.Cell Genet.**75**: 234–239.

Collares-Pereira, M. J. and Ráb, P. 1999. NOR polymorphism in the Iberian species *Chondrostomalusitanicum*(Pisces:Cyprinidae) re-examination by FISH. Genetica**105**: 301–303.

Foresti, F., Almeida-Toledo, L. F. and Toledo, S. A. 1989. Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterizationand multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausiasanctaefilomenae*(Pisces, Characidae).Genetica**79**: 107–114.

Galetti, P. M., Jr. 1998. Chromosome diversity in neotropical fish. NOR studies. Ital. J. Zool. (Modena)**65** (Suppl): 53–56.

Galetti, P. M., Jr.,Foresti, F., Bertollo, L. A. C. and Moreira-Filho, O. 1984.Characterization of eight species ofAnostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. Caryologia **4**: 401–406.

Galetti, P. M., Jr.,Mestriner, C. A., Monaco, P. J. and Rasch, E. M. 1995. Post–zygotic modifications and intra– and interindividualnucleolar organizing region variation in fish: Report of a case involving *Leporinusfriderici*.Chromosome Res. **3**: 285–290.

Gras, D. E., Brassesco, M. S., Markariani, R., Roncati, H. A., Sakamoto–Hojo, E. T., Fenocchio, A. S. and Pastori, N. C.2007. Cytogenetic polymorphism in *Prochiloduslineatus*(Pisces: Characiformes) from the middle Paraná RiverSanta Fe City, Argentina. Comp. Cytogenet. **1**: 113–119.

Hall, K. J. and Parker, J. S. 1995. Stable chromosome fissionassociated with rDNA mobility. Chromosome Res. **3**: 417–422.

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

Johnson, G. D. and Gill, A. C. 1998. Encyclopedia of Fishes. Academic Press,San Diego. p.183.

Jorge, L. C. and Filho, O. M. 2004.Nucleolar organizer region as markers of chromosomal polymorphism in *Apareiodonaffinis*(Pisces, Parodontidae). Caryologia **57**: 195–199.

Mantovani, M., Able, L. D. S. and Moreira-Filho, O. 2005. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localizationrevealed by FISH in *Astyanaxscabripinnis*(Pisces, Characidae). Genetica**123**: 211–216.

Molina, W. F. 2006. Chromosomal changes and stasis in marine fish groups. In: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F. andKapoor, B. G. (eds.). Fish Cytogenetics.Science Publishers, Enfield. pp. 69–110.

Murofushi, M. 1986.A study of karyotype classification and karyotype evolution inmarine teleosts. Rep. Mishima Res. Inst. Sci. Liv., Nihon University**9**: 95–157.

Murofushi, M., Oishi, M. and Nawa, N. 1980.Karyological studies in *Apogonsemilineatus*.Rep. Mishima Res. Inst. Sci. Liv., Nihon University**3**: 47–50.

Nanda, I., Schsrtl, M., Fiechtinger, W., Schlupp, I., Parzefall, J. and Schmid, M. 1995.Chromosomal evidence for laboratorysynthesis of triploid hybrid between the gynogenetic teleost Poecilia Formosa and its host species. J. Fish Biol. **47**: 619–623.

Nelson, J. S. 2006. Fishes of the World, 4 ed. John Wiley & Sons, New York.

Ojima, Y. and Kojima, T. 1985.Chromosomal polymorphisms in Apogonidaefishes. Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.**61**: 79–82.

Paintner-Marques, T. R., Giuliano-Caetano, L. and Dias, A. L. 2002.Multiple NORs in *Bryconamericus*aff.*Exodon*(Osteichthyes, Characidae, Teuagonopterinae).Hereditas**137**: 107–112.

Phimphan, S., Tanomtong, A., Jumrusthanasan, S., Supiwong, W., Siripiyasing, P. and Sanoamuang, L. 2013.First report of NORs polymorphism and chromosome analysis ofJohn's snapper, *Lutjanusjohnii*(Perciformes, Lutjanidae) in Thailand. Cytologia **78**: 335–344.

Reed, M. K. and Phillips, R. B. 1997. Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the putative sex chromosomesof Arctic char (*Salvelinus alpines*) is not sex related. Chromosome Res. **5**: 221–227.

Rishi, K. K. 1973. A preliminary report on the karyotypes of eighteen marine fishes. Res.Bull. Punjab University**24**: 161–162.

Rivlin, K.A., Dale, G. and Rachlin, J. W. 1986.Karyotypic analysis of three species ofcardinalfish (Apogonidae) and its implications for the taxonomic status of the genera*Apogon*and *Phaeoptyx*. Ann. N. Y. Acad. Sci.**463**: 211–213.

Rivlin, K.A., Rachlin, J. W. and Dale, G. 1987. Intraspecific chromosomal variation in *Apogonbinotatus*(Perciformes: Apogonidae)from the Florida Keys and St. Croix. Ann. N.Y. Acad. Sci. **494**: 263–265.

Rivlin, K.A., Rachlin, J. W.and Warkentine, B. E. 1988. G-Banding of the chromosomes of*Apogonmaculatus*and *A.pseudomaculatus*(Perciformes: Apogonidae). Ann. N.Y. Acad. Sci. **529**: 160–163.

Rossi, A. R., Gornung, E., Crosetti, D., Innocentti, S. and Sola, L. 2000. Cytogenetic analysis of *Oedalechiluslabeo*(Pisces: Muglidae), with a report of NOR variability. Mar. Biol. **136**:159–162.

Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños, F. and Feón, P. 1995.Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer regions in*Agalychniscallidryas* (Anura, Hylidae). Cytogenet.CellGenet.**69**: 18–26.

Soza, I. L., Galian, J., De La Rua, P., Bertollo, L. A. C. and Moreira-Filho, O. 2001. Non-random distribution and nucleolarrDNA sites on *Astyanaxscabripinnis*chromosomes. Cytologia **66**: 85–91.

Supiwong, W., Tanomtong, A., Supanuam, P., Jantarat, S., Khakhong, S. and Sanoamuang, S. 2012.A discovery of nucleolarorganizer regions (NORs) polymorphism and karyological analysis of Smith's barb, *Puntioplitesproctozysron*(Cypriniformes, Cyprinidae) in Thailand. Cytologia **77**: 35–42.

Suzuki, H., Kurihara, Y., Kanemisha, Y. andMoriwaki, K.1990. Variation in the distribution of silver–staining nucleolar organizer regions on the chromosomes of the wildmouse *Musmusculus*. Mol. Biol. Evol. **7**: 271–282.

Vitturi, R., Catalano, E., Colomba, M. S., Montagnino, L. and Pellerito, L. 1995. Karyotype analysis of *Aphaniusfasciatus*(Pisces: Cyprinodontiformes): Ag-NORs and C-band polymorphism in four populations from Sicily. Biol. Zent.Bl. **114**: 392–402.

Vitturi, R.,Colomba, M., Vizzini, S., Libertini, A., Barbieri, R. and Mazzola, A. 2005. Chromosomal location polymorphismof major rDNA sites in two Mediterranean populations of the killifish *Aphaniusfasciatus*(Pisces:Cyprinodontidae). Micron **36**: 243–246.

Volleth, M. 1987. Differences in the location of nucleolusorganizer regions in European vespertilionid bats.Cytogenet.Cell Genet.**44**: 186–197.

Table1. Review of fish cytogenetic reports in the family Apogonidae (genera; *Apogon*, *Nectamia*, *Phaeoptyx*, *Pterapogon*, and *Sphaeramia*).

Table 2. Mean length of short arm chromosome (Ls), length long arm chromosome (Ll), length total arm chromosome (LT), relative length (RL), centromeric index (CI) and standard deviation (SD) of RL, CI from 20 metaphase cells of the male and female Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni*), 2*n*=46.

Fig. 1. General characteristic of the Banggai cardinalfish, *Pterapogon kauderni* Koumans, 1933 (Perciformes: Apogonidae).

Fig. 2. Metaphase chromosome plates and karyotypes of the Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni*) male (A.) and female (B.), 2*n* (diploid) = 46 by conventional staining technique. Arrows indicates nucleolar organizer regions (NORs)(Scale bar = 5 μm).

Fig. 3. Metaphase chromosome plates and karyotypes of the Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni*) male (A.) and female (B.), 2*n* (diploid) = 46 by Ag-NOR banding technique. Arrows show three polymorphism patterns of nucleolar organizer regions (NORs) of chromosome pair 13 (13a13a, 13c13a, and 13a13b). Scale bars indicate 5 μm.

Fig. 4. The six representative cells displaying polymorphism in size of nucleolar organizer regions (NORs) of chromosome pair 13(13a, 13b, and 13c)of the 10 male and female Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni*). Arrows indicate nucleolar organizer regions.

Fig. 5. Idiogram showing lengths and shapes of chromosomes of the Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni*),diploid (2*n*) = 46, by conventional staining technique. Arrow indicates nucleolar organizer region (NOR).

Fig. 6. Idiogram showing lengths and shapes of chromosomes of the Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni*),diploid (2*n*) = 46, by Ag-NOR banding technique. Arrow indicates nucleolar organizer region (NOR).

Table1. Review of fish cytogenetic reports in the familyApogonidae (genera; *Apogon*, *Nectamia*, *Phaeoptyx*,*Pterapogon*,and *Sphaeramia*).

Species	2*n*	NF	Karyotype	Ag-NORs	Locality	Reference
Apogonamericanus	36	70	12m+6sm+16a+2t	2(SCR)	Brazil	Araújo*et al*. (2010)
A.binotatus	36	50	14m/sm+22a/t	-	USA	Rivlin*et al*. (1987)
	36	62	26m/sm+10a/t	-	USA	Rivlin*et al*. (1987)
	35	49	14m/sm+21a/t	-	USA	Rivlin*et al*. (1987)
A. doederleini	46	54	2m+6sm+38a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
A.endekataenia	46	46	46a/t	-	India	Rishi (1973)
	46	52	2m+4sm+16a+24t	-	Japan	Murofushi (1986)
A. imberbis	36	56	-	-	Spain	Alvarez *et al*. (1991)
A. lineatus	46	52	2m+4sm+2a+38t	-	Japan	Murofushi (1986)
A. maculatus	34	61	27m/sm+7a/t	-	Puerto Rico	Rivlin*et al*. (1988)
A. moluccensis	46	46	46a/t	-	India	Rishi (1973)
A. notatus	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
	46	53	2m+5sm+39a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
	46	52	2m+4sm+40a/t		Japan	Murofushi (1986)
A.nubilis	46	92	2m+36sm+8a	-	USA	Rivlin*et al*. 1986.
A. pseudomaculatus	36	66	30m/sm+2a+4t	-	Puerto Rico	Rivlin*et al*. (1986)
A. semilineatus	46	52	2m+4sm+20a+20t	-	Japan	Murofushi*et al*. (1980)
	46	54	2m+6sm+38a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
Nectamiafusca	46	-	2m+44sm/a/t	-	Pacific	Rivlin*et al*. (1986)
Phaeoptyxpigmentaria	38	-	6m+32sm/a/t	-	Atlantic	Rivlin*et al*. (1986)
Pterapogonkauderni	46	92	4m+14sm+28a	2(SCR)	Thailand	Present study
Sphaeramia orbicularis	46	50	4sm+42a/t	-	Pacific	Ojima and Kojima (1985)

Remarks: 2*n* = diploid chromosome number,NF = fundamental number (number of chromosome arm), m = metacentric,sm = submetacentric,a = acrocentric, t = telocentric chromosome,NORs = nucleolar organizer regions, SCR = subcentromeric region, and - = not available.

Table 2. Mean length of short arm chromosome (Ls), length long arm chromosome (Ll), length total arm chromosome (LT), relative length (RL), centromeric index (CI) and standard deviation (SD) of RL, CI from 20 metaphase cells of the male and female Banggaicardinalfish (*Pterapogonkauderni*), 2*n*=46.

Chro. pair	Ls	Ll	LT	RL±SD	CI±SD	Chro. type	Chro. size
1	0.700	0.801	1.501	0.0230±0.0016	0.535±0.016	Metacentric	Medium
2	0.613	0.705	1.318	0.0201±0.0015	0.535±0.033	Metacentric	Medium
3	0.523	1.022	1.545	0.0235±0.0015	0.660±0.030	Submetacentric	Medium
4	0.465	0.974	1.439	0.0219±0.0008	0.674±0.032	Submetacentric	Medium
5	0.422	0.982	1.404	0.0214±0.0005	0.696±0.038	Submetacentric	Medium
6	0.450	0.939	1.389	0.0212±0.0006	0.675±0.036	Submetacentric	Medium
7	0.423	0.891	1.315	0.0200±0.0007	0.675±0.048	Submetacentric	Medium
8	0.418	0.842	1.261	0.0192±0.0008	0.667±0.022	Submetacentric	Medium
9	0.392	0.787	1.179	0.0180±0.0010	0.667±0.032	Submetacentric	Medium
10	0.548	1.456	2.004	0.0306±0.0020	0.724±0.024	Acrocentric	Large
11	0.448	1.147	1.596	0.0243±0.0013	0.715±0.020	Acrocentric	Large
12	0.402	1.191	1.594	0.0244±0.0010	0.745±0.055	Acrocentric	Large
13*	0.442	1.142	1.584	0.0241±0.0026	0.722±0.030	Acrocentric	Medium
14	0.414	1.102	1.516	0.0231±0.0007	0.725±0.034	Acrocentric	Medium
15	0.442	1.037	1.479	0.0226±0.0007	0.700±0.034	Acrocentric	Medium
16	0.371	1.064	1.435	0.0219±0.0007	0.740±0.047	Acrocentric	Medium
17	0.400	0.993	1.394	0.0213±0.0009	0.711±0.030	Acrocentric	Medium
18	0.315	1.067	1.382	0.0211±0.0008	0.770±0.036	Acrocentric	Medium
19	0.363	1.008	1.371	0.0208±0.0006	0.732±0.033	Acrocentric	Medium
20	0.350	0.987	1.338	0.0203±0.0005	0.737±0.040	Acrocentric	Medium
21	0.372	0.939	1.311	0.0200±0.0005	0.713±0.039	Acrocentric	Medium
22	0.348	0.905	1.253	0.0190±0.0011	0.719±0.022	Acrocentric	Medium
23	0.331	0.872	1.204	0.0183±0.0009	0.726±0.035	Acrocentric	Medium

Remarks: * NOR-bearing chromosome and chro. = chromosome

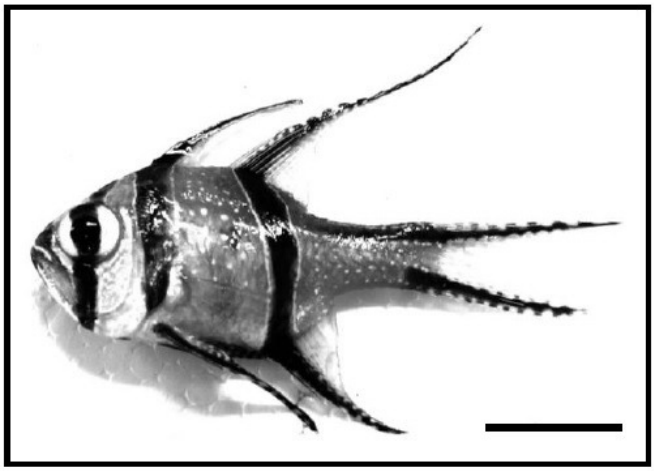


Fig. 1. General characteristic of the Banggai cardinalfish, *Pterapogon kauderni* Koumans, 1933 (Perciformes: Apogonidae).

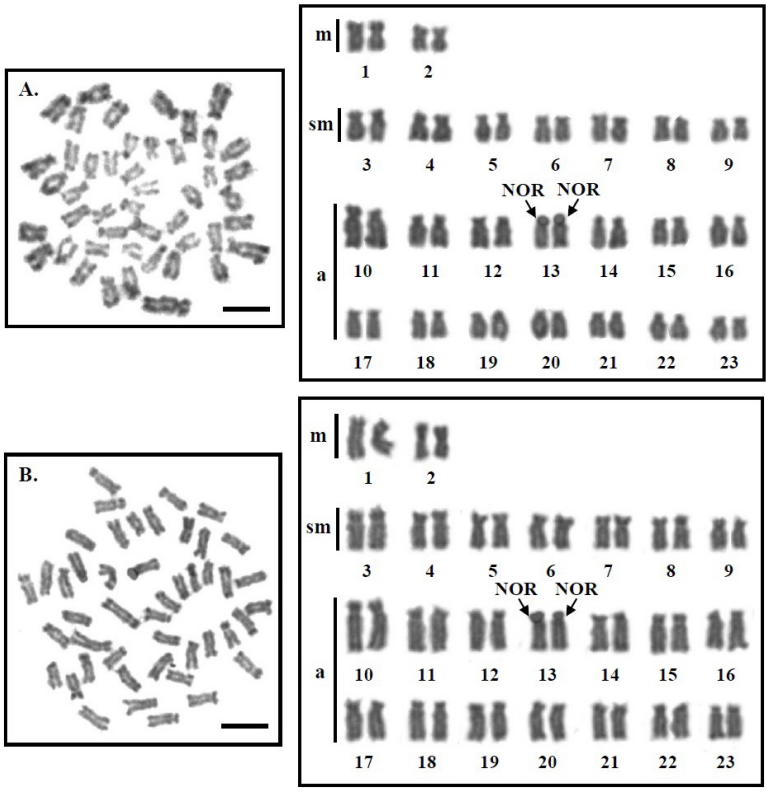


Fig. 2. Metaphase chromosome plates and karyotypes of the Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni*) male (A.) and female (B.), 2*n* (diploid) = 46 by conventional staining technique. Arrows indicates nucleolar organizer regions (NORs)(Scale bar = 5 µm).

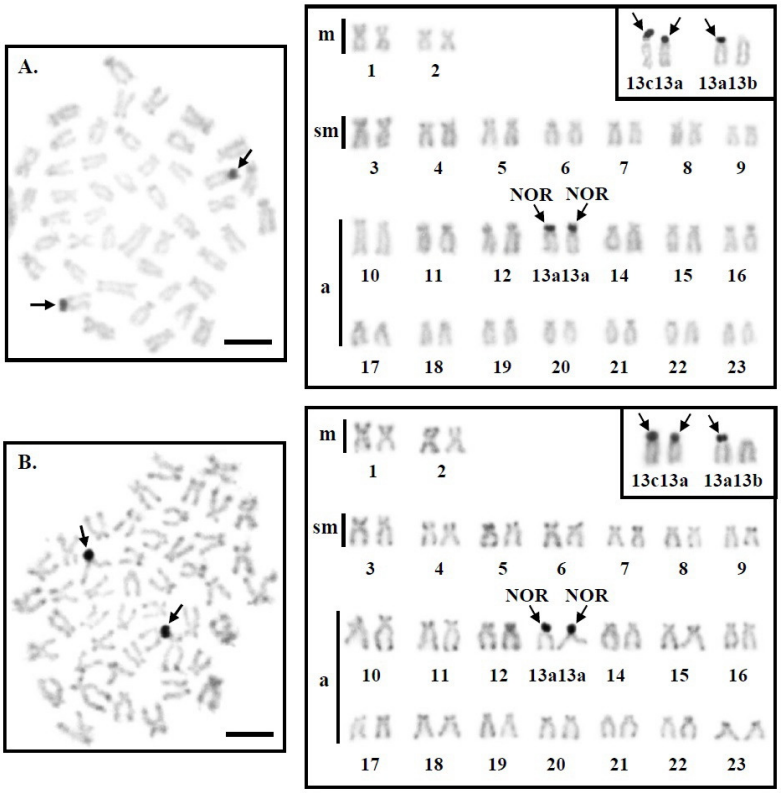


Fig. 3. Metaphase chromosome plates and karyotypes of the Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni*) male (A.) and female (B.), 2*n* (diploid) = 46 by Ag-NOR banding technique. Arrows show three polymorphism patterns of nucleolar organizer regions (NORs) of chromosome pair 13 (13a13a, 13c13a, and 13a13b). Scale bars indicate 5 µm.

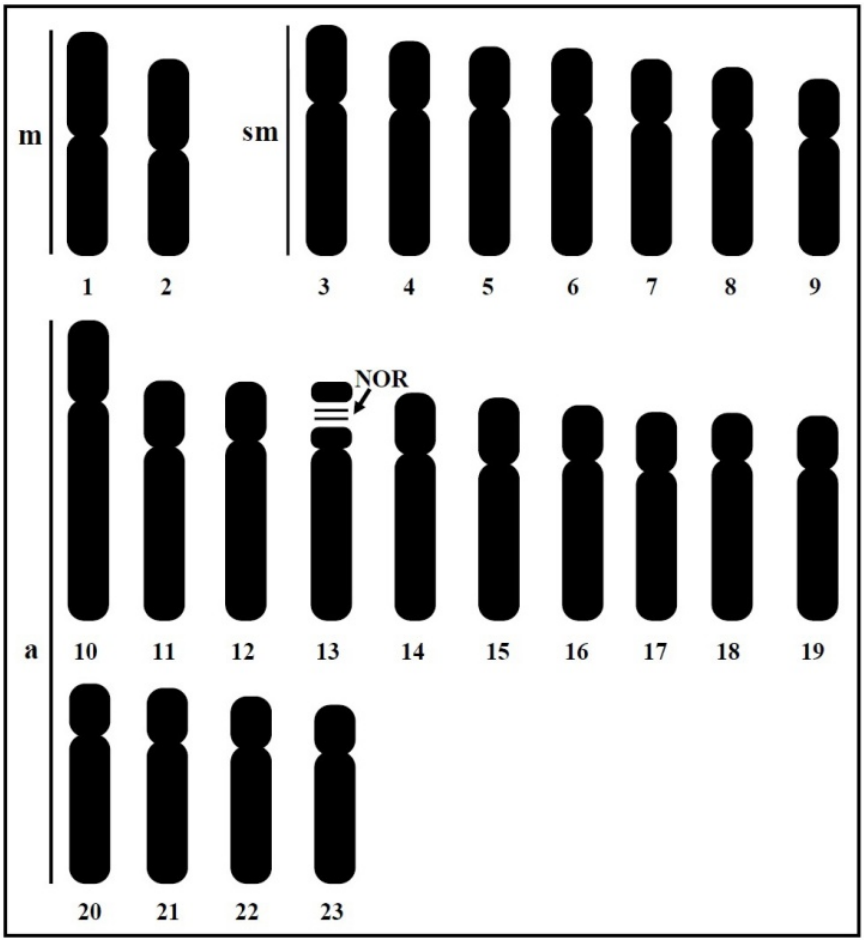


Fig. 4. The six representative cells displaying polymorphism in size of nucleolar organizer regions (NORs) of chromosome pair 13(13a, 13b, and 13c)of the 10 male and female Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni*). Arrows indicate nucleolar organizer regions.

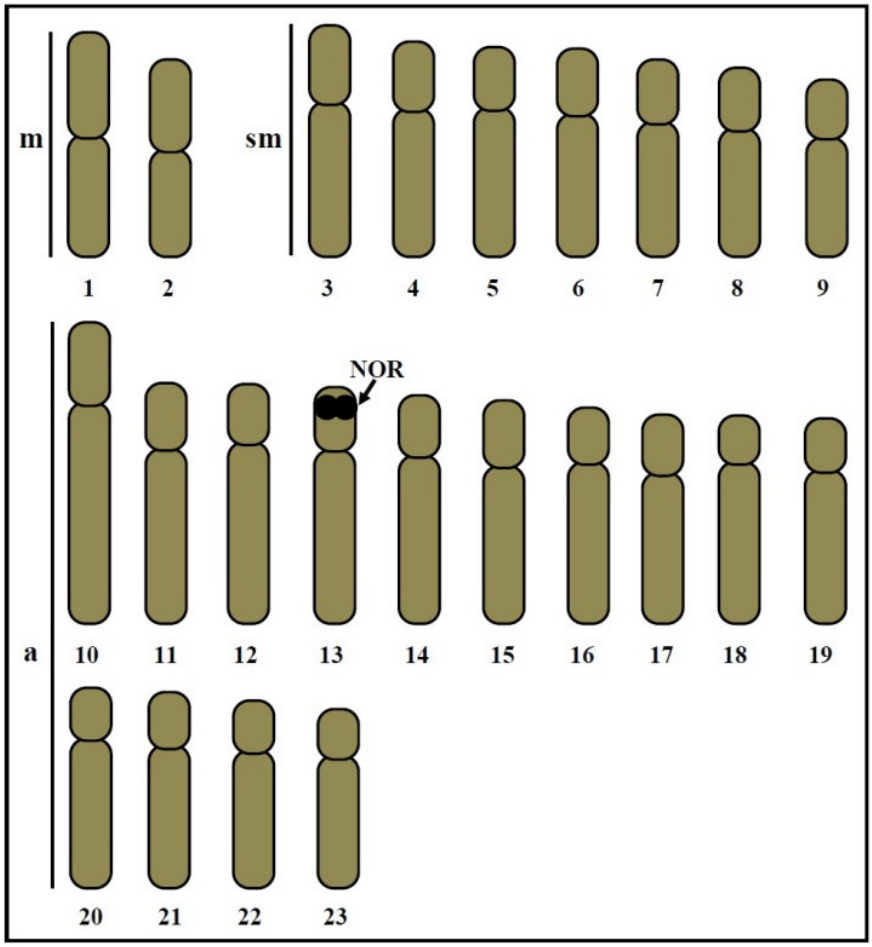


Fig. 5. Idiogram showing lengths and shapes of chromosomes of the Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni*),diploid (2*n*) = 46, by conventional staining technique. Arrow indicates nucleolar organizer region (NOR).

First Chromosome Analysis of the Humpback Cardinalfish, *Fibramia lateralis* (Perciformes, Apogonidae)

Wannapa Kasiroek[1, 2], Chantra Indananda[3], Nattawut Luangoon[2], Krit Pinthong[4], Weerayuth Supiwong[5] and Alongklod Tanomtong[6*]

[1] Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Muang, Chonburi 20131, Thailand

[2] Institute of Marine Science, Burapha University, Muang, Chonburi 20131, Thailand

[3] Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Muang, Chonburi 20131, Thailand

[4] Department of Fundamental Science, Faculty of Science and Technology, Surindra Rajabhat University, Muang, Surin 32000, Thailand

[5] Faculty of Applied Science and Engineering, Khon Kaen University, Nong Khai Campus, Muang, Nong Khai 43000, Thailand

[6] Toxic Substances in Livestock and Aquatic Animals Research Group, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen 40002, Thailand

Received July 27, 2015; *accepted January 29, 2016*

Summary The first chromosome analysis and nucleolar organizer region (NOR) pattern of the humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis*) were studied. Samples from 10 male and 10 female fish were collected from the Andaman Sea and Gulf of Thailand. Mitotic chromosome preparations were prepared directly from kidney tissues. Conventional and Ag-NOR staining techniques were applied to stain the chromosomes. The results showed that the diploid chromosome number of *F. lateralis* was 2*n*=46, and the fundamental numbers (NF) were 54 in both sexes. The karyotype consisted of 8 large acrocentric, 12 large telocentric, 24 medium telocentric and 2 small telocentric chromosomes. Moreover, the results indicated that the region adjacent to the telomere of the short arm of the second acrocentric chromosome pair showed clearly observable nucleolar organizer regions (NORs). Strange size chromosomes related to sex were not observed. The karyotype formula for *F. lateralis* is as follows:

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

Key words *Fibramia lateralis*, Chromosome, Karyotype, Nucleolar organizer region.

---

*Corresponding author, e–mail: tanomtong@hotmail.com

Cardinalfishes are a family Apogonidae belonging to the class Actinopterygii (ray-finned fishes), superorder Percomorpha, order Perciformes and suborder Percoidei (Nelson 2006). They are chiefly marine, but some species are found in brackish water and a few are found in fresh water. Several species are kept in the aquarium and are popular as small, peaceful and colorful fish. Most species live in tropical or subtropical waters, where they inhabit coral reefs and lagoons (Johnson and Gill 1998). Apogonids are widely distributed from warm temperate to tropical areas in the Pacific, Indian and Atlantic Oceans. Most species occur in coral or rocky reefs, while some species inhabit seagrass and coralline algal meadows, soft-bottom communities, estuaries and lowland freshwater. Eschmeyer and Fong (2015) reported 356 valid species from the listings in the Catalog of Fishes. The family has been traditionally divided into four subfamilies: Apogoninae including most of the species (333 species), Pseudamiinae including only 20 species, Amioidinae including only two species and Paxtoninae including only one species (Eschmeyer and Fong 2015). The Humpback cardinalfish, *Fibramia lateralis* (Valenciennes 1832) has a discreet or diffuse midline body stripe ending in a basicaudal spot smaller than the pupil of the eye (Fig. 1).

Up to the present, basic cytogenetic information is available for the family Apogonidae in only 14 of the 356 species (Table 1). The 2*n* varied from 34 to 46 chromosomes (mostly 2*n*=46) and the NF variation occurred between 46 and 92 in this family. Nevertheless, little is known about the karyotypic features of apogonids in the Pacific and Indian Oceans. NOR banding technique was also studied in only one species to detect nucleolar organizer regions (NORs) (Araújo *et al*. 2010). These regions are parts of chromosomes in which there are ribosomal ribonucleic acid (rRNA) encoding genes (5.8S, 18S, and 28S). In all eukaryotic organisms, rRNA genes occur in many copies, thus reflecting high cell demand for rRNA. NORs, as ribosomal gene clusters, which were active in previous interphase, form prominent cytogenetic features, namely secondary constrictions (Andraszek *et al*. 2009). NOR characterization can be a cytogenetic marker for cytotaxonomic studies and can even aid in constructing phylogenetic hypotheses for several fish groups. Some fish groups have a simple NOR system characterized by ribosomal cistrons on only a single chromosome pair, whereas others have a multiple NOR system composed of cistrons dispersed over several chromosome pairs (Galetti 1998).

The present study is the first report on chromosomal characteristics of *F. lateralis* using conventional staining and Ag-NOR banding techniques. The obtained results will increase the basic knowledge of the cytogenetics of *F. lateralis,* which could form the basis for future research and provide data to ensure their survival. Moreover, the knowledge on basic cytogenetics could be applied to numerous breeding studies, and this could also provide insight into species conservation and chromosome evolution studies of Apogonidae.

Materials and methods

Sample collection

We collected 10 males and 10 females of *F. lateralis* (20 samples) from the Andaman Sea and the Gulf of Thailand. All specimens were maintained in aerated, flowing seawater aquaria at the Institute of Marine Science, Burapha University, Muang, Chonburi Province until analysis.

Chromosome preparation

Chromosomes were prepared *in vivo* (Chen and Ebeling 1968, Nanda *et al.* 1995) as follows. The 0.05% colchicine was injected into the fish's intramuscular and then left for one hour. The kidney was cut into small pieces, and then squash mixed with 0.075 M KCl. After discarding all large pieces of tissue, 8 mL of cell sediments were transferred to a centrifuge tube and incubated for 25–35 min. The KCl was discarded from the supernatant after centrifugation at 1200 rpm for 8 min. Cells were fixed in fresh, cool fixative (3 methanol: 1 glacial acetic acid) to which up to 8 mL of fixative were gradually added before being centrifuged again at 1200 rpm for 8 min, at which time the supernatant was discarded. The fixation was repeated until the supernatant was clear, and the pellet was mixed with 1 mL of fixative. The mixture was dropped onto a clean and cold slide by a micropipette followed by air-drying.

Chromosome staining

Conventional staining was done using 20% Giemsa's solution for 30 min. Ag-NOR banding technique was performed by adding four drops of 50% silver nitrate and 2% gelatin on

slides. The slides were then sealed with cover glasses and incubated at 60˚C for 5 min. Next, the slides were soaked in distilled water until the cover glasses were separated. Then, they were stained with 20% Giemsa's solution for 1 min (Howell and Black 1980).

Chromosome analysis

Metaphase figures were analyzed according to the chromosome classification of Chaiyasut (1989). The centromeric index (CI) between 0.50–0.59, 0.60–0.69, 0.70–0.89 and 0.90–0.99 were described as metacentric, submetacentric, acrocentric and telocentric chromosomes, respectively. The fundamental number, number of chromosome arm (NF), was obtained by assigning a value of two to metacentric, submetacentric and acrocentric chromosomes and one to telocentric chromosomes.

Results and discussion

Diploid chromosome number, fundamental number and karyotype of F. lateralis

This is the first report on *F. lateralis* cytogenetical knowledge. The present study revealed that the diploid chromosome number of *F. lateralis* was 2*n*=46, and the fundamental numbers (NF) were 54 in both males and females (Fig. 2). The types of chromosomes were 8 large acrocentric, 12 large telocentric, 24 medium telocentric, and 2 small telocentric chromosomes. Comparative studies with others in the family Apogonidae have shown the same chromosome number as those found in *Jaydia lineata* (Murofushi 1986), *Nectamia fusca* (Rivlin *et al*. 1986), *Ostorhinchus doederleini*, *O. notatus*, *Sphaeramia orbicularis* (Ojima and Kojima 1985), *O. endekataenia*, *O. moluccensis* (Rishi 1973) and *O. semilineatus* (Murofushi *et al*. 1980, Ojima and Kojima 1985). However, it differs from *Phaeoptyx pigmentaria* (2*n*=38), *A. americanus*, *A. binotatus*, *A. imberbis*, *A. pseudomaculatus* (2*n*=36) and *A. maculatus* (2*n*=34) (Rivlin *et al*. 1986, 1987, 1988, Alvarez *et al*. 1991). Although *F. lateralis* has the same 2*n* as most of the species, its NF is different except *O. doederleini* and *O. semilineatus* (Ojima and Kojima 1985). In addition, the results showed that cytologically distinguishable sex chromosomes were observed. It is similar to other species in the family Apogonidae, (Araújo *et al*. 2010).

The chromosome data of the family Apogonidae revealed that 60% of all species analyzed so far (N=15 spp.) present diploid values equal to 2*n*=46, suggesting this should be an ancestor condition for this family. According to the chromosome diploid, the family Apogonidae is divided into two groups: first, 2*n*=46 found in the genera *Fibramia*, *Jaydia*, *Nectamia*, *Ostorhinchus* and *Sphaeramia*; second, 2*n*=34–38 found in the genera *Apogon* and *Phaeoptyx*. It is known that it has particular cytogenetic features, as they present extremely low diploid values in relation to the order Perciformes and, in some species, a remarkable variation in the karyotype formulae is also found. Such reduction in the diploid number might be as low as 2*n*=34, as reported in *A. maculatus* (Rivlin *et al.* 1988). Nevertheless, the chromosomal numbers are reduced, suggesting a high incidence of centric fusions, and high fundamental numbers (NF) are also reported, like in *N. fusca* (2*n*=46, NF=92), which indicates that other rearrangements, such as pericentric inversions, have also played a major role in the chromosomal diversification of this fish group (Araújo *et al*. 2010).

Among species in the family Apogonidae, some species, such as *O. endekataenia* and *O. moluccensis*, are characterized by a karyotype exclusively composed of telocentric chromosomes (Rishi 1973), a symplesiomorphic cytogenetic feature widely observed within the order Perciformes (Molina 2006). Accordingly, the available data indicates a great karyotypic diversity in the evolution of the group, regarding both diploid number and chromosomal formulas, resulting in high fundamental numbers (NF=46–92). This scenario indicates a simultaneous occurrence of different mechanisms of karyotypic diversification in the family Apogonidae, mainly Robertsonian rearrangements and pericentric inversions (Araújo *et al*. 2010). The karyotype formula for *F. lateralis* is as follows:

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

Chromosome markers of F. lateralis

This is the first report on *F. lateralis* accomplished by the Ag-NOR banding technique. The technique shows dark bands (NOR positions) on the subtelomeric short arm of the second acrocentric chromosome pair in both males and females (Fig. 3). For other comparative studies of the species in the family Apogonidae, *A. americanus* had a NOR on the subtelomeric short arm of the submetacentric chromosome pair 8 (Araújo *et al*. 2010).

Our obtained results indicated that the subtelomeric short arm of the second acrocentric chromosome pair showed clearly observable NORs in all of 20 examined fish (10 male and 10 female fish). The number and location of NORs in chromosomes can be variable among populations and/or closely related species, thus representing a useful cytotaxonomic marker for phylogenetic reconstruction in some groups (Cross *et al.* 2006). Structural rearrangements might be a cause of variation in either chromosomal location or frequency of these regions (Gu and Hua 2003, Shan *et al.* 2003). Although the karyotypes in Apogonidae have been related to a great number of pericentric inversions and Robertsonian fusions, variation in the number or position of NORs were absent between both analyzed populations of *F. lateralis*. The lack of information in other species restrains any further studies about the evolutionary pattern of these regions within Apogonidae.

NORs play an important role in displaying the perfect markers to display chromosomal polymorphism within and between species in many groups of fish. This variety may affect NOR number, its localization on the chromosome, size, and active numbers in each genome. The previous studies of NOR exhibited variations between species, within species, and even between individuals (Castro *et al.* 1996). NORs on different homologous chromosomes may have different sizes. Some fish may even indicate a difference of up to a factor of two in size between NORs found on the same homologous chromosome. This is in accordance with previous reports that this extent of variety between NORs may be attributed to the number of cistrons and differences in transcriptional activity (Galetti *et al.* 1984).

In a view of both macro- and microevolutionary points, NORs are very dynamic regions in evolutionary terms. These regions have been frequently used as phylogenetic markers (Amemiya and Gold 1988), and consequently lead to differences in chromosome location being detected even between sibling species (Volleth 1987). These changes in position during evolution have been quite often attributed to chromosome rearrangements (Hall and Parker 1995). In another way, conventional cytogenetic and the most recent hybridization techniques have shown NOR regions to be also polymorphic both in number and location within species (Schmid *et al*. 1995). Although one NOR–bearing chromosome pair is usually considered plesiomorphic in most groups analyzed, some vertebrate species show a multichromosomal location of NORs (Suzuki *et al*. 1990). A constant number of several stable NOR sites has been usually observed in these

species, but in some cases, the multichromosomal pattern appears to be unstable (Castro *et al*. 2000).

The asymmetrical karyotype of *F. lateralis* with two types of chromosomes (acrocentric and telocentric chromosomes) found in the present study is an important chromosome marker. The idiograms show continuous length gradation chromosomes (Figs. 4 and 5). The size difference between the largest and the smallest chromosomes is approximately twofold. The chromosome markers of *F. lateralis* are chromosome pairs 5 and 23, which are the largest and the smallest telocentric chromosomes, respectively. Data of the chromosomal checks on mitotic metaphase cells of the *F. lateralis* is shown in the Table 2. Further studies in other species of the Apogonidae family are required in order to provide a better understanding about the dynamic scenario of karyotype diversification in this family.

Acknowledgements

This work was supported by the doctoral thesis support grant from the Faculty of Science, Burapha University, fiscal year 2015, the Institute of Marine Science, Burapha University and the Toxic Substances in Livestock and Aquatic Animals Research Group, Khon Kaen University.

References

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

Amemiya, C. T. and Gold, J. R. 1988. Chromosomal NORs as taxonomic and systematic characters in North American cyprinid fishes. Genetica **76**: 81–90.

Andraszek, K., Horoszewicz, E. and Smalec, E. 2009. Nucleolar organizer regions, satellite associations and nucleoli of goat cells (*Capra hircus*). Arch. Tierz. **52**: 177–186.

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

Castro, J., Rodríguez, S., Pardo, B. G., Sánchez, L. and Martínez, P. 2000. Population analysis of an unusual NORsite polymorphism in brow trout (*Salmo trutta* L.). Heredity **86**: 291–302.

Castro, J., Viñas, A., Sánchez, L. and Martínez, P. 1996. Characterization of an atypical NOR site polymorphism in browntrout (*Salmo trutta*) with Ag– and CMA3–staining, and fluorescent *in situ* hybridization. Cytogenet. Cell Genet. **75**: 234–239.

Chaiyasut, K. 1989. Cytogenetics and Cytotaxonomy of the Family Zephyranthes. Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok.

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

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

Eschmeyer, W. N. and Fong, J. D. 2015. Species by family/subfamily. Online version, updated 2 July 2015. http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp. (Accessed 20 July 2015).

Galetti, P. M., Jr. 1998. Chromosome diversity in neotropical fish. NOR studies. Ital. J. Zool. (Modena) **65**: 53–56.

Galetti, P. M., Jr., Foresti, F., Bertollo, L. A. C. and Moreira-Filho, O. 1984. Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. Caryologia **4**: 401–406.

Gu, Z. J. and Hua, X. 2003. Physical mapping of the 18S-26S rDNA by fluorescent in situ hybridization (FISH) in *Camellia reticulata* polyploid complex (Theaceae). Plant Sci. **164**: 279–285.

Hall, K. J. and Parker, J. S. 1995. Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. Chromosome Res. **3**: 417–422.

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

Johnson, G. D. and Gill, A. C. 1998. Encyclopedia of Fishes. Academic Press, San Diego. p. 183.

Molina, W. F. 2006. Chromosomal changes and stasis in marine fish groups. In: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F. and Kapoor, B. G. (eds.). Fish Cytogenetics. Science Publishers, Enfield. pp. 69–110.

Murofushi, M. 1986. A study of karyotype classification and karyotype evolution in marine teleosts. Rep. Mishima Res. Inst. Sci. Liv., Nihon University **9**: 95–157.

Murofushi, M., Oishi, M. and Nawa, N. 1980. Karyological studies in *Apogon semilineatus*. Rep. Mishima Res. Inst. Sci. Liv., Nihon University **3**: 47–50.

Nanda, I., Schsrtl, M., Fiechtinger, W., Schlupp, I., Parzefall, J. and Schmid, M. 1995. Chromosomal evidence for laboratory synthesis of triploid hybrid between the gynogenetic teleost Poecilia Formosa and its host species. J. Fish Biol. **47**: 619–623.

Nelson, J. S. 2006. Fishes of the World, 4 ed. John Wiley & Sons, New York.

Ojima, Y. and Kojima, T. 1985. Chromosomal polymorphisms in Apogonidae fishes. Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci. **61**: 79–82.

Rishi, K. K. 1973. A preliminary report on the karyotypes of eighteen marine fishes. Res. Bull. Punjab University **24**: 161–162.

Rivlin, K. A., Dale, G. and Rachlin, J. W. 1986. Karyotypic analysis of three species of cardinalfish (Apogonidae) and its implications for the taxonomic status of the genera *Apogon* and *Phaeoptyx*. Ann. N. Y. Acad. Sci. **463**: 211–213.

Rivlin, K. A., Rachlin, J. W. and Dale, G. 1987. Intraspecific chromosomal variation in *Apogon binotatus* (Perciformes: Apogonidae) from the Florida Keys and St. Croix. Ann. N. Y. Acad. Sci. **494**: 263–265.

Rivlin, K. A., Rachlin, J. W. and Warkentine, B. E. 1988. G-Banding of the chromosomes of *Apogon maculates* and *A. pseudomaculatus* (Perciformes: Apogonidae). Ann. N. Y. Acad. Sci. **529**: 160–163.

Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños, F. and Feón, P. 1995. Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). Cytogenet. Cell Genet. **69**: 18–26.

Shan, F. C., Yan, G. J. and Plummer, J. A. 2003. Cytoevolution of Boronia genomes revealed by fluorescent *in situ* hybridization with rDNA probes. Genome **46**: 507–513.

Suzuki, H., Kurihara, Y., Kanemisha, Y. and Moriwaki, K.1990. Variation in the distribution of silver–staining nucleolar organizer regions on the chromosomes of the wildmouse *Musmusculus*. Mol. Biol. Evol. **7**: 271–282.

Volleth, M. 1987. Differences in the location of nucleolus organizer regions in European vespertilionid bats. Cytogenet. Cell Genet. **44**: 186–197.

Table 1. Review of fish cytogenetic reports in the family Apogonidae (genera; *Apogon*, *Fibramia*, *Jaydia*, *Nectamia*, *Ostorhinchus*, *Phaeoptyx* and *Sphaeramia*).

Table 2. Mean length of short arm chromosome (Ls), length long arm chromosome (Ll), length total arm chromosome (LT), relative length (RL), centromeric index (CI) and standard deviation (SD) of RL, CI from 20 metaphase cells of the male and female humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis*), 2*n*=46.

Fig. 1. General characteristic of the humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis*); scale bar indicates 1 cm.

Fig. 2. Metaphase chromosome plates and karyotypes of male (A.) and female (B.) humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis*), 2*n*=46 by conventional staining technique (scale bars 10 μm).

Fig. 3. Metaphase chromosome plates and karyotypes of male (A.) and female (B.) humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis*), 2*n*=46 by Ag-NOR banding technique; scale bars indicate 10 μm.

Fig. 4. Standardized idiogram showing lengths and shapes of chromosomes of the humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis*), 2*n*=46 by conventional staining technique.

Fig. 5. Standardized idiogram of chromosomes of the humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis*), 2*n*=46 by Ag-NOR banding technique. The arrow indicates nucleolar organizer regions on the short arm of acrocentric chromosome pair 2.

Table1. Review of fish cytogenetic reports in the family Apogonidae (genera; *Apogon*, *Fibramia*, *Jaydia*, *Nectamia*, *Ostorhinchus*, *Phaeoptyx*, and *Sphaeramia*).

Species	2*n*	NF	Karyotype	Ag-NORs	Locality	Reference
Apogon americanus	36	70	12m+6sm+16a+2t	2(TR)	Brazil	Araújo *et al*. (2010)
A. binotatus	36	50	14m/sm+22a/t	-	USA	Rivlin *et al*. (1987)
	36	62	26m/sm+10a/t	-	USA	Rivlin *et al*. (1987)
	35	49	14m/sm+21a/t	-	USA	Rivlin *et al*. (1987)
A. imberbis	36	56	-	-	Spain	Alvarez *et al*. (1991)
A. maculatus	34	61	27m/sm+7a/t	-	Puerto Rico	Rivlin *et al*. (1988)
A. pseudomaculatus	36	66	30m/sm+2a+4t	-	Puerto Rico	Rivlin *et al*. (1986)
Fibramia lateralis	46	54	8a+38t	2(TR)	Thailand	Present study
Jaydia lineata	46	52	2m+4sm+2a+38t	-	Japan	Murofushi (1986)
*A. lineatus**						
Nectamia fusca	46	-	2m+44sm/a/t	-	Pacific	Rivlin *et al*. (1986)
*A. nubilus**	46	92	2m+36sm+8a	-	USA	Rivlin *et al*. (1986)
Ostorhinchus doederleini	46	54	2m+6sm+38a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
*A. doederleini**						
O. endekataenia	46	46	46a/t	-	India	Rishi (1973)
*A. endekataenia**	46	52	2m+4sm+16a+24t	-	Japan	Murofushi (1986)
O. moluccensis	46	46	46a/t	-	India	Rishi (1973)
*A. moluccensis**						
O. notatus	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
*A. notatus**	46	53	2m+5sm+39a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
	46	52	2m+4sm+40a/t	-	Japan	Murofushi (1986)
O. semilineatus	46	52	2m+4sm+20a+20t	-	Japan	Murofushi *et al*. (1980)
*A. semilineatus**	46	54	2m+6sm+38a/t	-	Japan	Ojima and Kojima (1985)
Phaeoptyx pigmentaria	38	-	6m+32sm/a/t	-	Atlantic	Rivlin *et al*. (1986)
Sphaeramia orbicularis	46	50	4sm+42a/t	-	Pacific	Ojima and Kojima (1985)

Remarks: 2*n* = diploid chromosome number, NF = fundamental number (number of chromosome arm), m = metacentric, sm = submetacentric, a = acrocentric, t = telocentric chromosome, NORs = nucleolar organizer regions, TR = telomeric region, * = scientific name in the report, and - = not available.

Table 2. Mean length of short arm chromosome (Ls), length long arm chromosome (Ll), length total arm chromosome (LT), relative length (RL), centromeric index (CI) and standard deviation (SD) of RL, CI from 20 metaphase cells of the male and female Humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis*), 2*n*=46.

Chro. pair	Ls	Ll	LT	RL±SD	CI±SD	Chro. type	Chro. size
1	0.333	1.054	1.388	0.0268±0.0017	0.753±0.049	Acrocentric	Large
2*	0.305	0.996	1.301	0.0254±0.0020	0.761±0.033	Acrocentric	Large
3	0.307	0.951	1.258	0.0243±0.0013	0.753±0.033	Acrocentric	Large
4	0.296	0.870	1.166	0.0225±0.0015	0.743±0.035	Acrocentric	Large
5	0.000	1.585	1.585	0.0307±0.0025	1.000±0.000	Telocentric	Large
6	0.000	1.347	1.347	0.0260±0.0011	1.000±0.000	Telocentric	Large
7	0.000	1.275	1.275	0.0246±0.0009	1.000±0.000	Telocentric	Large
8	0.000	1.231	1.231	0.0238±0.0007	1.000±0.000	Telocentric	Large
9	0.000	1.201	1.201	0.0232±0.0008	1.000±0.000	Telocentric	Large
10	0.000	1.178	1.178	0.0227±0.0007	1.000±0.000	Telocentric	Large
11	0.000	1.157	1.157	0.0223±0.0006	1.000±0.000	Telocentric	Medium
12	0.000	1.134	1.134	0.0219±0.0006	1.000±0.000	Telocentric	Medium
13	0.000	1.112	1.112	0.0215±0.0004	1.000±0.000	Telocentric	Medium
14	0.000	1.090	1.090	0.0211±0.0004	1.000±0.000	Telocentric	Medium
15	0.000	1.072	1.072	0.0207±0.0005	1.000±0.000	Telocentric	Medium
16	0.000	1.050	1.050	0.0203±0.0004	1.000±0.000	Telocentric	Medium
17	0.000	1.026	1.026	0.0198±0.0005	1.000±0.000	Telocentric	Medium
18	0.000	0.981	0.981	0.0190±0.0008	1.000±0.000	Telocentric	Medium
19	0.000	0.945	0.945	0.0183±0.0007	1.000±0.000	Telocentric	Medium
20	0.000	0.911	0.911	0.0177±0.0008	1.000±0.000	Telocentric	Medium
21	0.000	0.875	0.875	0.0170±0.0010	1.000±0.000	Telocentric	Medium
22	0.000	0.828	0.828	0.0161±0.0011	1.000±0.000	Telocentric	Medium
23	0.000	0.734	0.734	0.0144±0.0021	1.000±0.000	Telocentric	Small

Remarks: * NOR-bearing chromosome and chro. = chromosome

Fig. 1. General characteristic of the humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis*); scale bar indicates 1 cm.

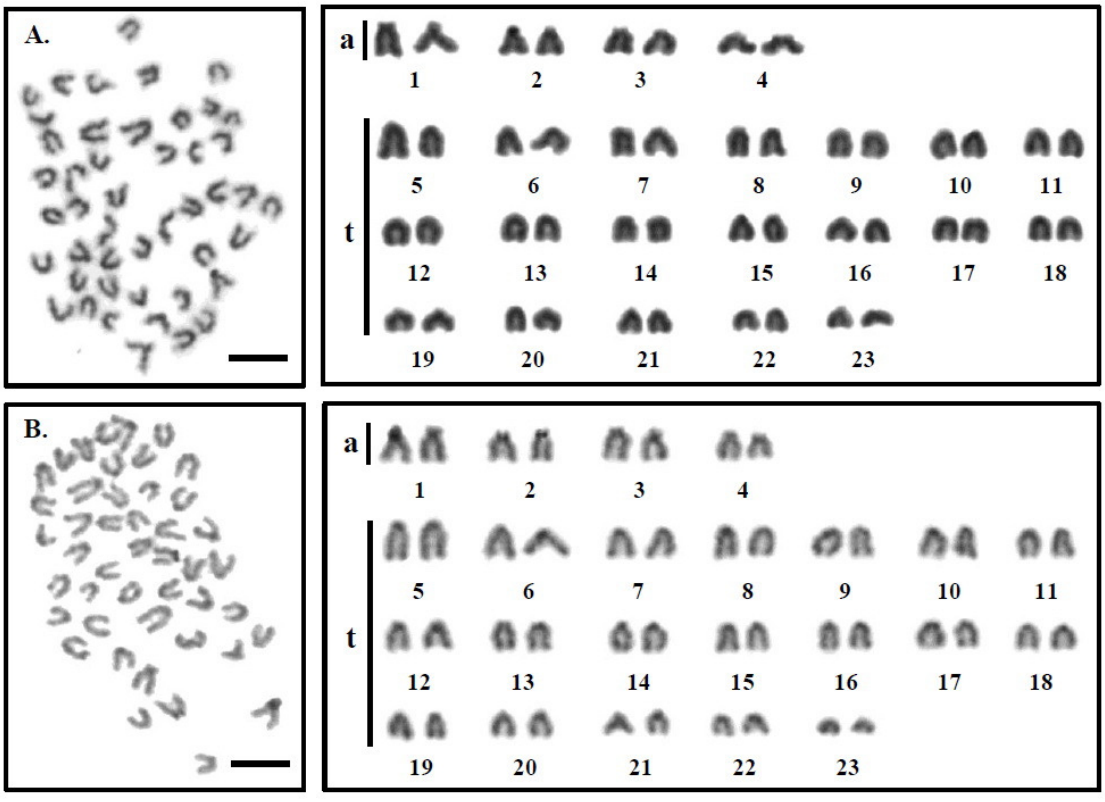


Fig. 2. Metaphase chromosome plates and karyotypes of male (A.) and female (B.) humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis*), 2*n*=46 by conventional staining technique (scale bars 10 μm).

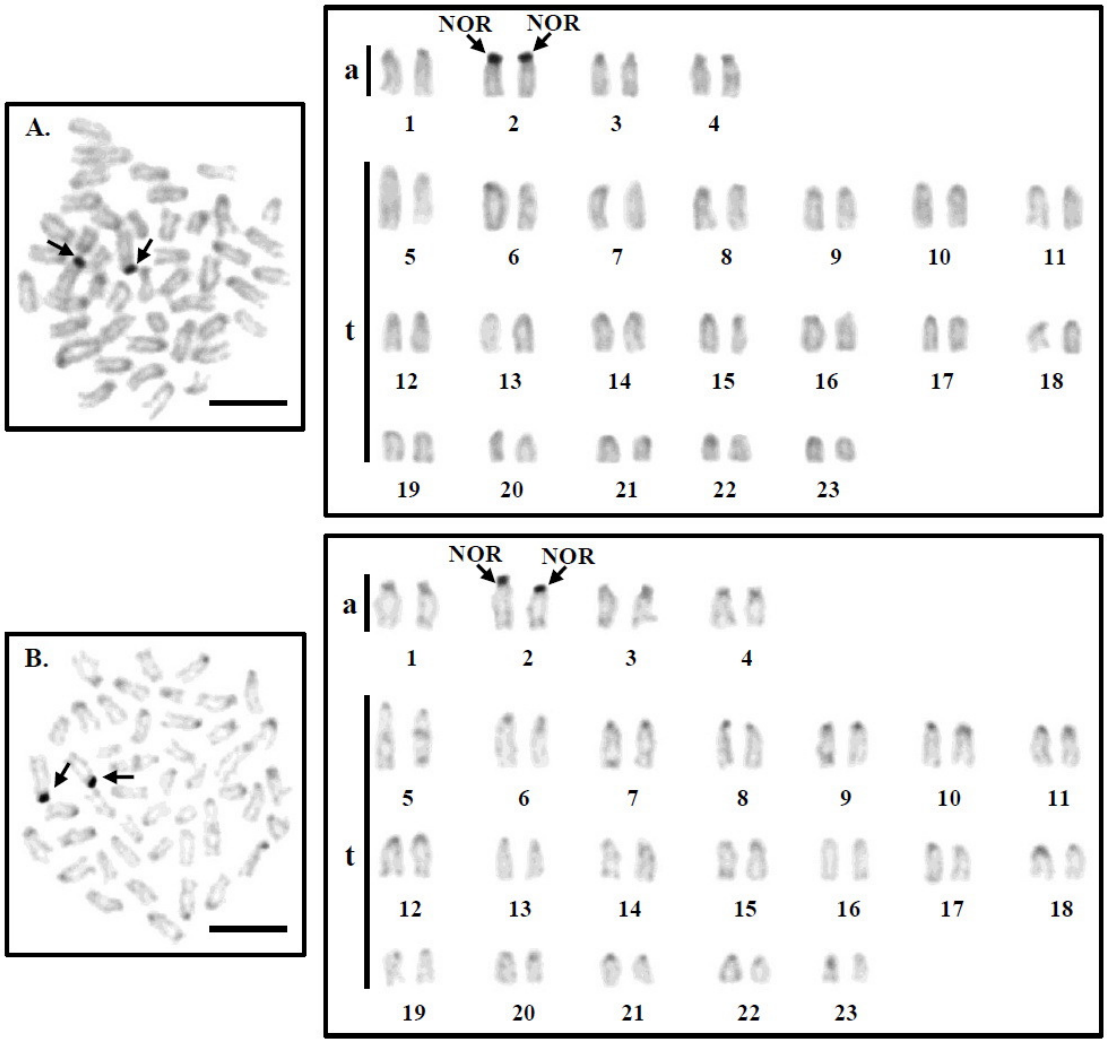


Fig. 3. Metaphase chromosome plates and karyotypes of male (A.) and female (B.) humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis*), 2*n*=46 by Ag-NOR banding technique; scale bars indicate 10 μm.

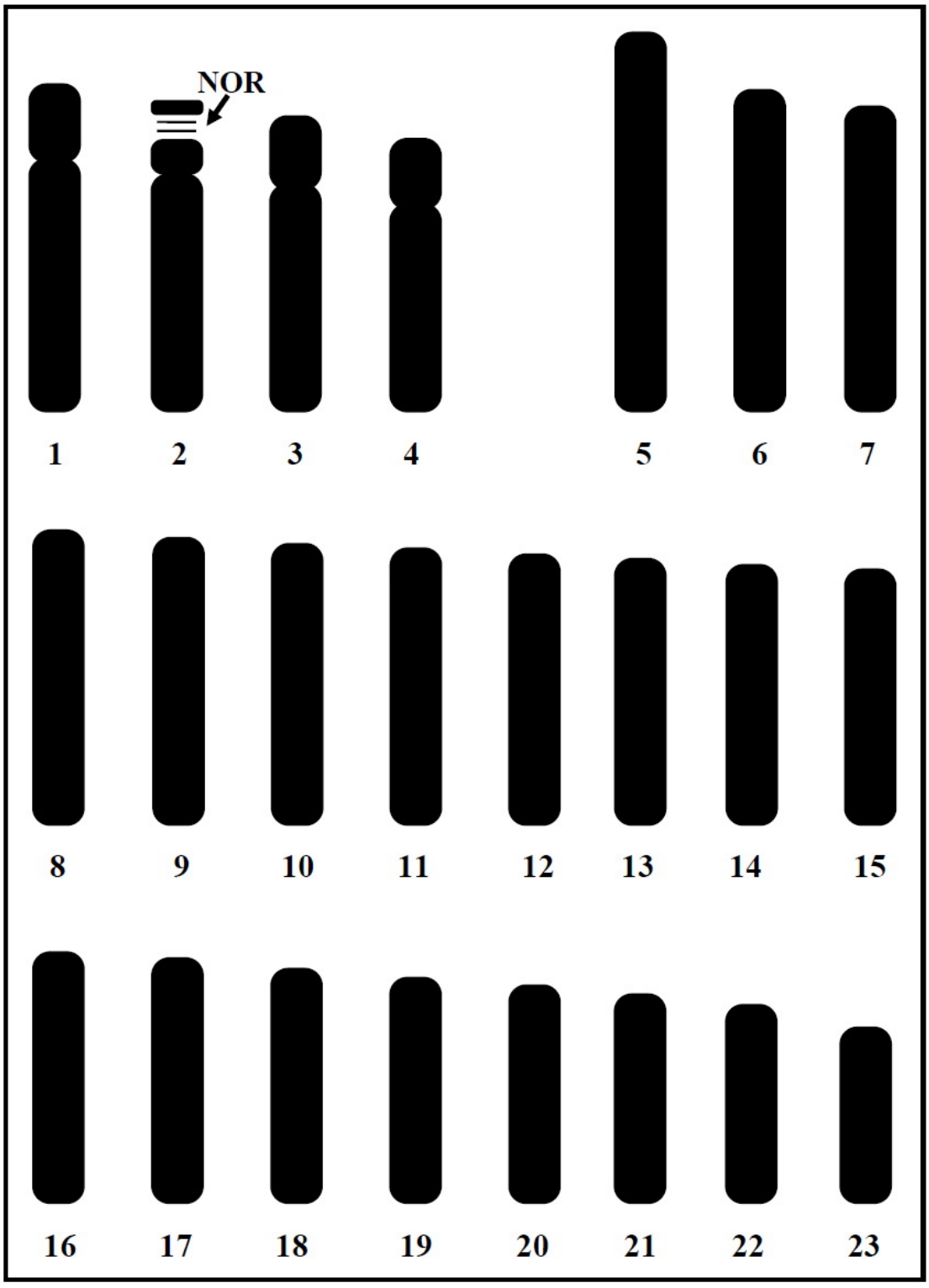


Fig. 4. Standardized idiogram showing lengths and shapes of chromosomes of the humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis*), 2*n*=46 by conventional staining technique.

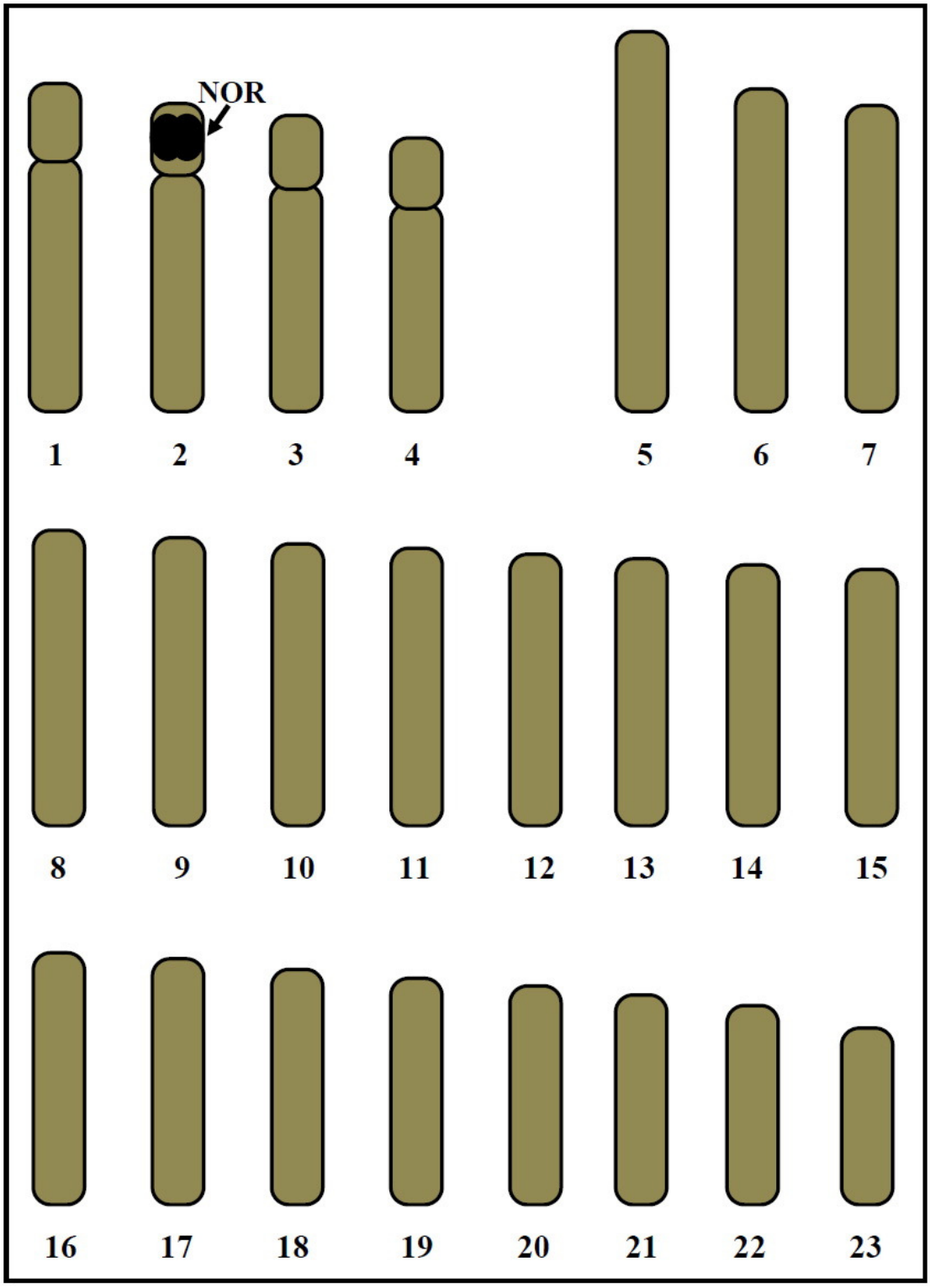


Fig. 5. Standardized idiogram of chromosomes of the humpback cardinalfish (*Fibramia lateralis*), 2*n*=46 by Ag-NOR banding technique. The arrow indicates nucleolar organizer regions on the short arm of acrocentric chromosome pair 2.