การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลากระสูบจุด (Hampala dispar) และปลากระสูบขีด (Hampala macrolepidota) ในประเทศไทย

Cytogenetic study of Spotted hampara barb (Hampala dispar) and Tranverse-bar barb (Hampala macrolepidota) in Thailand

พิชญา บัวศรียอด[1], สถิตย์ อรุณแสง[2*], กฤษณ์ ปิ่นทอง[3], สุมาลี พิมพันธุ์[4], สิทธิศักดิ์ จันทรัตน์[5], วีระยุทธ สุภิวงค์[6] และ อลงกลด แทนออมทอง[7]

Phichaya Buasriyot[1,*], Satit Arunsang[2], Krit Pinthong[2], Sumalee Phimphan[3], Sitthisak Jantarat[4], Weerayuth Supiwong[5], and Alongklod Tanomtong[1]

*[*1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002*

*[*2]สาขาวิชาสาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ พระนครศรีอยุธยา 13000*

*[*3]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ เพชรบูรณ์ 67000*

*[*4] สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปัตตานี 94000*

*[*5] คณะสหวิทยาการ วิทยาเขตหนองคาย มหาวิทยาลัยขอนแก่น หนองคาย 43000*

*[*1] Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002*

*[*2] Program in Animal Science, Faculty of Agricultural Technology and Agro-industry, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Phra Nakhon Si Ayutthaya, Ayutthaya, 13000*

*[*3] Biology program, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun, 67000*

*[*4] Department of Science, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani, 94000*

*[*5] Faculty of Interdisciplinary Studies, Nong Khai Campus, Khon Kaen University, Nong Khai, 43000*

Received : 2024-03-14 Revised : 2024-04-02 Accepted : 2024-04-03

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของปลาวงศ์ตะเพียน ในสกุล Hampala จำนวน 2 ชนิด คือ ปลากระสูบจุด และปลากระสูบขีด โดยเตรียมโครโมโซมจากเซลล์ไตของตัวอย่างปลาชนิดละ 10 ตัว ทำการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์ ผลการศึกษาพบว่าปลาทั้งสองชนิดมีจำนวนโครโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 50 มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 108 และ 92 และจัดแคริโอไทป์ได้ดังนี้ 8m+22sm+16a+4t และ 10m+12sm+20a+8t ตามลำดับ ปลาทั้งสองชนิดนี้ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย การย้อมแถบสีแบบนอร์พบบริเวณปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 9 และโครโมโซมคู่ที่ 21 ในปลากระสูบจุด และโครโมโซมคู่ที่ 8 และโครโมโซมคู่ที่ 12 ในปลากระสูบขีด ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ที่ได้นี้แสดงถึงความแปรผันทางโครโมโซมของปลาที่ศึกษาภายในสกุลเดียวกันซึ่งมีความใกล้ชิดกัน และสามารถใช้เป็นความรู้พื้นฐานทางชีววิทยาที่สามารถนำไปบูรณาการร่วมกับองค์ความรู้อื่น ๆ ในด้านอนุกรมวิธาน พันธุศาสตร์และวิวัฒนาการต่อไปได้

คำสำคัญ : แคริโอไทป์, โครโมโซม, ปลากระสูบจุด, ปลากระสูบขีด

Abstract

The purpose of this research was to study the cytogenetics of two Hampala species, *Hampala dispar*

* สถิตย์ อรุณแสง
E-mail address: sathit.a@rmutsb.ac.th

and *Hampala macrolepidota*, by preparing chromosomes from the kidney cells of 10 fish specimens. Stained by using conventional and Ag-NOR banding techniques. The results showed that both species had a diploid chromosome number of 50, the fundamental numbers (NF) were 108 and 92, and the karyotypes were arranged as follows: 8m+22sm+16a+4t and 10m+12sm+20a+8t, respectively. There were no differences in karyotypes between males and females in these two fish species. Ag-NOR staining was found in the regions adjacent to the telomere of the short arm of chromosome pair 9 and pair 21 in *H. dispar*, and chromosome pair 8 and pair 12 in *H. macrolepidota*. This cytogenetic data shows the chromosomal variables of the fish studied within the same genus, which are closely related, and it can be used as basic biological knowledge that can be integrated with other knowledge in the fields of Taxonomy, Genetics and Evolution.

Keywords : karyotype, chromosome, *Hampala dispar*, *Hampala macrolepidota*

1.บทนำ

วงศ์ปลาตะเพียน (Cyprinidae) เป็นปลาน้ำจืดที่พบมากที่สุดในประเทศไทย พบอย่างน้อย 261 ชนิด [1] ปลาน้ำจืดมีความสำคัญทั้งในด้านอาหารและด้านเศรษฐกิจ เป็นปลาสวยงาม ที่มีความสำคัญในแง่นิเวศวิทยาและการอนุรักษ์ เนื่องจากเป็นตัวบ่งชี้ความสมดุลทางธรรมชาติได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของปลาจึงมีความจำเป็นต้องทราบข้อมูลพื้นฐานทางด้านพันธุศาสตร์ของปลามาประกอบกัน เนื่องจากปลาน้ำจืดหลายชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก ซึ่งเป็นอุปสรรคในการจัดจำแนก โดยในปัจจุบันได้มีการนำเอาวิธีการทางเซลล์อนุกรมวิธาน (Cytotexonomy) [2, 3] โดยใช้ความรู้เกี่ยวกับพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ (Cytogenetics) มาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของปลา ซึ่งเป็นการศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมจากความรู้พื้นฐานที่ระบุว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของโครโมโซมที่แตกต่างกัน การศึกษาโครโมโซมของปลาในวงศ์ตะเพียนพบจำนวนอย่างน้อย 17 ชนิด [4] เช่น การศึกษาของพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาในวงศ์ย่อย Cyprininae ได้แก่ ปลากระโห้ (*Catlocarpio siamensis*) ปลายี่สกไทย (*Probarbus jullieni*) ผลการศึกษาพบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=96 เท่ากัน แต่มีชนิดของโครโมโซมที่ต่างกัน คือ 18m+54sm+a+18t และ 22m+14sm+60t ตามลำดับ [5] ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนปลาทั้งหมดที่มีในวงศ์ย่อย Cyprininae พบว่ายังมีการศึกษาที่ค่อนข้างน้อย นอกจากนี้ปลาหลายชนิดมีความแตกต่างผันแปรทางด้านพันธุกรรมค่อนข้างมาก การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาโดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิเคราะห์ลักษณะโครโมโซม ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับโครโมโซม เพื่อให้เข้าใจกระบวนการเกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ (speciation) การปรับปรุงสายพันธุ์ [6] ตลอดจนสามารถนำมาประกอบการศึกษาด้านวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของปลาได้ โดยการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของปลาในวงศ์ตะเพียน (Cyprinidae) ในสกุล Hampala จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ปลากระสูบจุด (*H. dispar*) และปลากระสูบขีด (*H. macrolepidota*) เพื่อให้ทราบถึงจำนวนโครโมโซมและแคริโอไทป์ รวมถึงโครโมโซมเครื่องหมาย (marker chromosome) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มียีนสำหรับสังเคราะห์ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) ชนิด 18S และ 28S เพื่อติดตามและสังเกตพฤติกรรมการถ่ายทอดลักษณะบางอย่างของปลาทั้งสองชนิดนี้ ทั้งนี้เพื่อให้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านเซลล์อนุกรมวิธาน (cytotaxonomy) รวมถึงสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในด้านการอนุรักษ์ปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาในสกุลนี้ที่พบในประเทศไทยต่อไป

2.วิธีดำเนินการวิจัย

2.1การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปลากระสูบจุด (H. dispar) และปลากระสูบขีด (H. macrolepidota) ตัวอย่างชนิดละ 10 ตัว จากแม่น้ำสงคราม จังหวัดบึงกาฬ ประเทศไทย นำตัวอย่างปลาที่เก็บได้มาเลี้ยงในตู้ปลาของห้องปฏิบัติการ โดยให้ออกซิเจนตลอดเวลา เพื่อให้ปลาสามารถปรับสภาพได้

2.2การเตรียมโครโมโซม

การเตรียมโครโมโซมเตรียมโดยวิธีทางตรง โดยใช้ไตเป็นอวัยวะที่ใช้ในการศึกษา เนื่องจากเป็นอวัยวะที่มีการแบ่งตัวตลอดเวลา โดยเตรียมจากภายในตัวปลาในสภาพ In vivo [7] ฉีดโคลซิซิน 0.05% ขนาด 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เข้าไปในช่องท้องของปลา 1 ชั่วโมง สลบปลาโดยใช้น้ำแข็งนำเฉพาะส่วนของไตมาสับให้ละเอียด เติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ 6-8 มิลลิลิตร บ่มในอุณหภูมิห้อง 30 นาที นำตะกอนเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,200-1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง และเติมน้ำยาตรึงสภาพที่มีส่วนผสมของเมทานอล 3 ส่วน ต่อกรดอะซิติก 1 ส่วน (methanol: acetic acid; 1:3 เติมจนครบ 6-8 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปั่นที่ความเร็ว 1,200-1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง เติมน้ำยาตรึงสภาพ 6-8 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทำซ้ำเพื่อล้างตะกอนให้สะอาด 3-4 ครั้ง เก็บตะกอนเซลล์ในสารละลายตรึงสภาพไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.3การย้อมสีโครโมโซม

2.3.1การย้อมสีจิมซ่าส์ (Giemsa's solution)

ย้อมสไลด์ด้วยสีจิมซ่าความเข้มข้นร้อยละ 10 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 6.8 เป็นเวลา 30-40 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 100 เท่า

2.3.2การย้อมแถบสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding)

หยดซิลเวอร์ไนเตรท 50% (50% $AgNO_3$) ลงบนสไลด์ 4 หยด และหยดเจลลาติน 4% ลงบนสไลด์ 2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำเข้าตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หรือจนกว่าสไลด์จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม ล้างซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ผึ่งสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง [8]

2.4การวิเคราะห์โครโมโซม

การตรวจสอบโครโมโซมโดยเลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมระยะเมทาเฟสกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกันจำนวน 100 เซลล์ เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซม ความถี่ของจำนวนโครโมโซมที่พบมากที่สุด จะเป็นค่าของจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (diploid number; 2n) จำแนกชนิดของโครโมโซมตามหลักของ Turpin and Lejeune [9] โดยจับคู่โครโมโซมคู่เหมือนและทำการวัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls) และคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (total length; LT, LT = Ll + Ls) คำนวณค่า relative length (RL) และ centromeric index (CI) เพื่อระบุชนิดของโครโมโซม ซึ่งสามารถแบ่งได้ 4 ชนิด คือ เมทาเซนทริก (metacentric; m) ซับเมทาเซนทริก (submetacentric; sm) อะโครเซนทริก (acrocentric; a) และเทโลเซนทริก (telocentric; t) จากนั้นทำการจัดเรียงแคริโอไทป์ตามชนิดของโครโมโซม

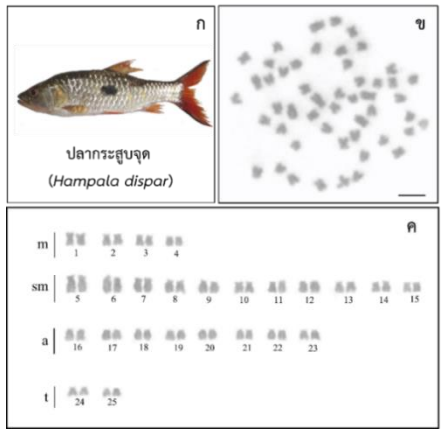
3.ผลการวิจัย

3.1จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน และแคริโอไทป์

ปลากระสูบจุด (*H. dispar*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 50 จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 108 ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์เพศผู้และเพศเมีย ดังแสดงในรูปที่ 1 แคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 6 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 16 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดกลาง 14 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง ความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมดังแสดงในตารางที่ 1 สามารถเขียนสูตรแคริโอไทป์ได้ดังนี้

2n=50; $L^{m}_{2}+ L^{sm}_{6}+ L^{a}_{2}+M^{m}_{6}+ M^{sm}_{16}+ M^{a}_{14}+ M^{t}_{4}$

หรือ 2n=50; 8m+22sm+16a+4t

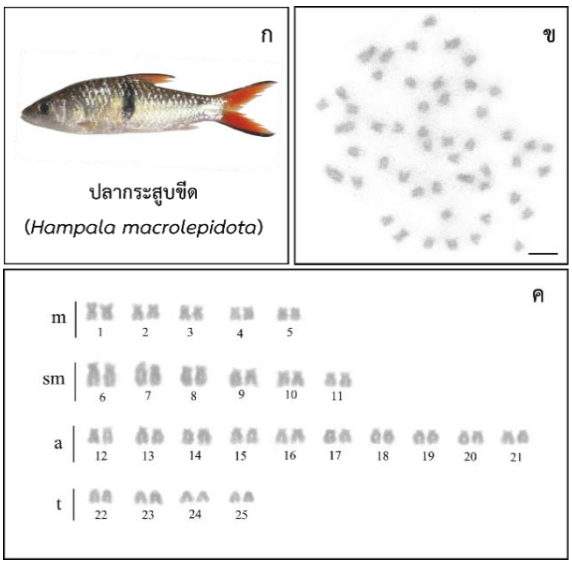


รูปที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ก), เซลล์ในระยะเมทาเฟส (ข) และแคริโอไทป์ของปลากระสูบจุด (ค) (แถบมาตราส่วน 5 ไมโครเมตร)

ปลากระสูบขีด (*H. macrolepidota*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 50 จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 92 ไม่พบความแตกต่างของแคริโอไทป์เพศผู้และเพศเมียดังแสดงในรูปที่ 2 แคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 4 แท่ง อะโครเซนทริก 4 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 8 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 8 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดกลาง 16 แท่ง และ เทโลเซนทริกขนาดกลาง 8 แท่ง ความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมแสดงดังตารางที่ 2 สามารถเขียนสูตรแคริโอไทป์ได้ดังนี้

$2n=50;\ L^{m}_{2}+ L^{sm}_{4}+ L^{a}_{4}+M^{m}_{8}+ M^{sm}_{8}+ M^{a}_{16}+ M^{t}_{8}$

หรือ 2n=50; 10m+12sm+20a+8t



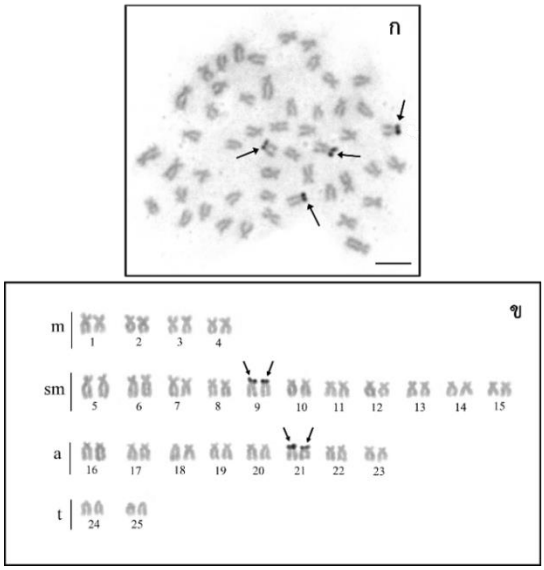
รูปที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ก), เซลล์ในระยะเมทาเฟส (ข) และแคริโอไทป์ของปลากระสูบขีด (ค) (แถบมาตราส่วน 5 ไมโครเมตร)

3.2โครโมโซมเครื่องหมาย (maker chromosome)

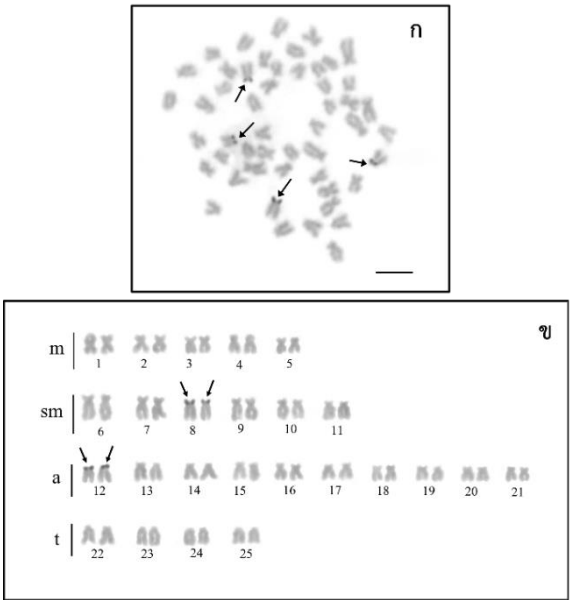
จากการย้อมแถบสีแบบนอร์ (Ag-NOR) พบตำแหน่งนอร์ดังต่อไปนี้

ปลากระสูบจุด (*H. dispar*) พบตำแหน่งนอร์บริเวณปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมจำนวน 2 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 9 (submetacentric) และโครโมโซมคู่ที่ 21 (acrocentric) ดังแสดงในรูปที่ 3 และรูปที่ 5 (ก)

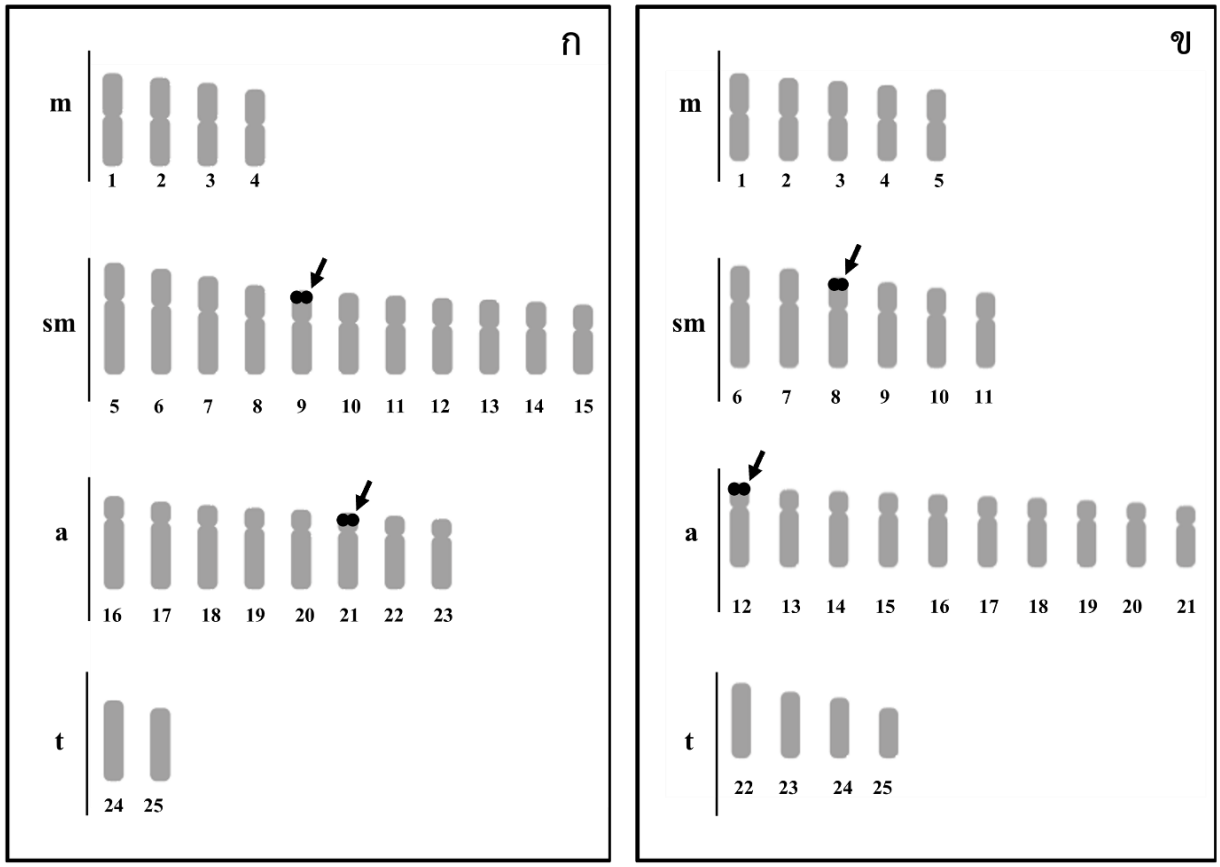
ปลากระสูบขีด (*H. macrolepidota*) พบตำแหน่งนอร์บริเวณปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมจำนวน 2 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 8 (submetacentric) และโครโมโซมคู่ที่ 12 (acrocentric) ดังแสดงในรูปที่ 4 และรูปที่ 5 (ข)



รูปที่ 3 เซลล์ในระยะเมทาเฟส (ก) และแคริโอไทป์ของปลากระสูบจุด (ข) ลูกศรระบุตำแหน่งนอร์ (แถบมาตราส่วน 5 ไมโครเมตร)



รูปที่ 4 เซลล์ในระยะเมทาเฟส (ก) และแคริโอไทป์ของปลากระสูบขีด (ข) ลูกศรระบุตำแหน่งนอร์ (แถบมาตราส่วน 5 ไมโครเมตร)



รูปที่ 5 อิดิโอแกรมของปลากระสูบจุด (*H. dispar*) (ก) และปลากระสูบขีด (*H. macrolepidota*) (ข) โดยเทคนิคการย้อมแถบสีแบบนอร์ (ลูกศรระบุโครโมโซมคู่ที่ย้อมติดแถบสีแบบนอร์)

4.อภิปรายผลการวิจัย

4.1จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน และแคริโอไทป์

จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) ของปลากระสูบจุดและปลากระสูบขีดเท่ากับ 50 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [10-12] จากจำนวนโครโมโซมของปลาวงศ์ปลาตะเพียนเป็นปลาที่ยังคงมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากันกับบรรพบุรุษ คือ 50 จัดเป็นปลาที่มีวิวัฒนาการอย่างช้า ๆ ลักษณะนี้ถือเป็นลักษณะโบราณ (Primitive Stage) [13] แต่อย่างไรก็ตามปลาแต่ละชนิดมีรูปแบบของแคริโอไทป์แตกต่างกัน ในรายงานของเกรียงไกร สีตะพันธุ์ พบว่า แคริโอไทป์ของปลากระสูบจุดจัดเรียงดังนี้ คือ 3m+3sm+11st+8a และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (NF) เท่ากับ 84 [14] ซึ่งเท่ากันกับรายงานของวีระยุทธและคณะ [15] ที่ศึกษาแคริโอไทป์ของปลากระสูบจุดในจังหวัดหนองคาย พบว่ามีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 84 เช่นกัน ส่วนแคริโอไทป์จัดเรียงได้ดังนี้ 2m+13sm+7a+3t และในรายงานของ ธวัช และอนันต์ [12] แคริโอไทป์ของปลากระสูบจุด คือ 5m+5sm+3st+12a โครโมโซมพื้นฐาน (NF) เท่ากับ 70 นอกจากนี้การศึกษาแคริโอไทป์ปลากระสูบขีดในครั้งนี้สามารถเขียนการจัดเรียงได้ดังนี้ 10m+12sm+20a+8t ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของ Soulivongsa และคณะที่ศึกษาปลากระสูบขีดจากแม่น้ำ Nam Kok ประเทศลาว โดยพบว่าการจัดเรียงแคริโอไทป์เป็น 3m+9sm+6a+7t และการศึกษาของธวัช และอนันต์ จัดเรียงแคริโอไทป์ของปลากระสูบขีดที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำมูล จังหวัดนครราชสีมา สามารถเขียนได้ดังนี้ 13m+7sm+2a+3t โครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 90 [12] นอกจากนี้การศึกษาของ Stivari and Martins-Santos [16] พบว่าปลา Rhamdia quelen จาก 2 แหล่งน้ำ ในประเทศบราซิล พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=58 เท่ากัน แต่มีรูปแบบแคริโอไทป์ต่างกัน คือ 26m +20sm +6a+6t และ 26m+22sm+6a+4t ตามลำดับ จากการศึกษาจะพบว่า ตัวอย่างปลาที่นำมาทำการศึกษาเป็นปลาจากต่างกลุ่มประชากรโดยมาจากแหล่งน้ำ

ที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดความแตกต่างของรูปแบบแคริโอไทป์และจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เนื่องจากการเกิดวิวัฒนาการของโครโมโซม และความแตกต่างของถิ่นที่อยู่อาศัย โดยปลาในวงศ์ปลาตะเพียนจะมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา

4.2โครโมโซมเครื่องหมาย (Marker chromosome)

การวิจัยในครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษาตำแหน่งโครโมโซมเครื่องหมายในปลากระสูบจุดและปลากระสูบขีดโดยการย้อมแถบสีแบบนอร์ (Ag-NOR) เพื่อตรวจสอบตำแหน่งยีนที่สังเคราะห์ไรโบโซม (ribosomal RNA) ชนิด 18S และ 28S เรียกบริเวณนี้ว่า นิวคลีโอลาออกาไนเซอร์ หรือ นอร์ (Nucleolar organizer region; NORs) ปฏิกิริยาการย้อมด้วยซิลเวอร์จะจำเพาะกับตำแหน่งนี้เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีการแสดงออกของยีนเป็นอย่างมาก และบริเวณนี้จะมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่ไม่ใช่โปรตีนฮีสโตนมากกว่าบริเวณอื่นของโครโมโซม ทั้งนี้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรทจะติดสีเข้มเมื่อยีนบริเวณดังกล่าวทำงาน (active) [17] และตำแหน่งนอร์ส่วนใหญ่จะพบบริเวณรอยคอดที่สองของโครโมโซม [18] ทำให้โครโมโซมมีลักษณะเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวแตกต่างไปจากแท่งอื่น ๆ และมีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด [19] ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าทั้งปลากระสูบจุดและปลากระสูบขีดมีโครโมโซมเครื่องหมายจำนวน 2 คู่ เท่ากัน โดยติดตำแหน่งนอร์บริเวณของแขนข้างสั้นของโครโมโซม โดยในปลากระสูบจุดมีโครโมโซมคู่ที่ 9 (ซับเมทาเซนทริก) และ 21 (อะโครเซนทริก) เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย และปลากระสูบขีดโครโมโซมเครื่องหมาย คือ โครโมโซมคู่ที่ 8 (ซับเมทาเซนทริก) และ 12 (อะโครเซนทริก) ดังแสดงในรูปที่ 3-5 การย้อมแถบสีแบบนอร์นี้มีการศึกษาในปลามากกว่า 200 ชนิด เพื่อใช้การแก้ปัญหาในด้านการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน สำหรับปลาที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน เช่น การศึกษาของ Gold [20] ที่ศึกษาในปลาวงศ์ปลาตะเพียน โดยส่วนใหญ่จะมีตำแหน่งนอร์ขนาดเล็กที่โครโมโซมเพียง 1 คู่ เท่านั้น อย่างไรก็ตามปลาที่มีตำแหน่งนอร์มากกว่า 2 ตำแหน่งนั้นอาจเกิดจากการเกิดทรานสโลเคชันบางส่วนของโครโมโซมที่มีนอร์ไปยังโครโมโซมแท่งอื่น ๆ ดังนั้นจึงสามารถใช้ข้อมูลของจำนวนและตำแหน่งของนอร์บนโครโมโซมเพื่อบ่งบอกวิวัฒนาการของโครโมโซมได้ นอกจากนี้โดยปกติตำแหน่งของนอร์มักอยู่ตอนปลายของโครโมโซม ในกรณีที่ตำแหน่งของนอร์อยู่ระหว่างเซนโทรเมียร์และทีโลเมียร์ อาจมีสาเหตุมาจากการรวมกันแบบเรียงลำดับไปในทิศทางเดียวกัน (tandem) ระหว่างโครโมโซมที่มีนอร์และโครโมโซมแท่งอื่นๆ หรือเกิดจากการรวมกันแบบพาราเซนทริกอินเวอร์ชัน (paracentric inversion) หรือเกิดจากเพอริเซนทริกอินเวอร์ชัน (pericentric inversion) ระหว่างโครโมโซมเทโลเซนทริก 2 แท่ง โดยแท่งหนึ่งมีนอร์ที่ตำแหน่งทีโลเมียร์ [19] ดังกรณีของ Chana punctata ซึ่งเป็นปลาในวงศ์เดียวกับปลาชะโด [17]

5.สรุปผลการวิจัย

ปลากระสูบจุดและปลากระสูบขีด มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากัน คือ 50 ปลากระสูบจุดมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (NF) เท่ากับ 108 มีโครโมโซมเครื่องหมายบนโครโมโซม 2 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 9 (ซับเมทาเซนทริก) และคู่ที่ 21 (อะโครเซนทริก) การจัดเรียงแคริโอไทป์ของปลากระสูบจุดสามารถเขียนได้ดังนี้

$2n=50;\quad L^{m}_{2}+ L^{sm}_{6}+ L^{a}_{2}+M^{m}_{6}+ M^{sm}_{16}+ M^{a}_{14}+ M^{t}_{4}$

หรือ 8m + 22sm + 16a + 4t

สำหรับปลากระสูบขีดมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 92 มีโครโมโซมเครื่องหมายจำนวน 2 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 8 (ซับเมทาเซนทริก) และคู่ที่ 12 (อะโครเซนทริก) การจัดเรียงแคริโอไทป์ของปลากระสูบขีดสามารถเขียนได้ดังนี้

$2n=50;\ L^{m}_{2}+ L^{sm}_{4}+ L^{a}_{4}+M^{m}_{8}+ M^{sm}_{8}+ M^{a}_{16}+ M^{t}_{8}$

หรือ 10m + 12sm + 20a + 8t

ตารางที่ 1 ความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมแขนสั้น (Ls) โครโมโซมแขนยาว (Ll) โครโมโซมแขนรวม (LT) ความยาวสัมพัทธ์ (RL) และดัชนีเซนโทรเมอริก (CI) จาก 20 เซลล์เมทาเฟสของปลากระสูบจุด (H. dispar), 2n=50

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL ± SD	CI ± SD	ขนาด	ชนิด
1	0.993	1.163	2.156	0.045±0.003	0.537±0.018	ใหญ่	เมทาเซนทริก
2	0.944	1.109	2.053	0.043±0.002	0.538±0.011	กลาง	เมทาเซนทริก
3	0.896	1.031	1.927	0.040±0.002	0.533±0.011	กลาง	เมทาเซนทริก
4	0.813	0.965	1.778	0.037±0.002	0.541±0.014	กลาง	เมทาเซนทริก
5	0.866	1.730	2.596	0.054±0.002	0.664±0.020	ใหญ่	ซับเมทาเซนทริก
6	0.854	1.599	2.453	0.051±0.002	0.648±0.020	ใหญ่	ซับเมทาเซนทริก
7	0.816	1.461	2.276	0.047±0.003	0.639±0.020	ใหญ่	ซับเมทาเซนทริก
8	0.767	1.304	2.071	0.043±0.002	0.628±0.023	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
9*	0.709	1.235	1.944	0.040±0.002	0.633±0.021	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
10	0.684	1.198	1.881	0.039±0.001	0.634±0.023	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
11	0.669	1.152	1.821	0.038±0.001	0.630±0.023	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
12	0.635	1.130	1.765	0.037±0.001	0.638±0.025	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
13	0.641	1.086	1.727	0.036±0.001	0.628±0.024	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
14	0.610	1.067	1.676	0.035±0.001	0.635±0.025	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
15	0.578	1.033	1.611	0.034±0.002	0.640±0.024	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
16	0.526	1.629	2.155	0.045±0.003	0.752±0.024	ใหญ่	อะโครเซนทริก
17	0.479	1.550	2.030	0.042±0.002	0.760±0.024	กลาง	อะโครเซนทริก
18	0.474	1.475	1.948	0.040±0.001	0.754±0.024	กลาง	อะโครเซนทริก
19	0.472	1.413	1.885	0.039±0.001	0.747±0.017	กลาง	อะโครเซนทริก
20	0.460	1.382	1.842	0.038±0.002	0.748±0.022	กลาง	อะโครเซนทริก
21*	0.443	1.327	1.770	0.037±0.002	0.746±0.020	กลาง	อะโครเซนทริก
22	0.436	1.259	1.695	0.035±0.001	0.741±0.021	กลาง	อะโครเซนทริก
23	0.408	1.214	1.622	0.034±0.002	0.747±0.030	กลาง	อะโครเซนทริก
24	0.000	1.869	1.869	0.038±0.002	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก
25	0.000	1.687	1.687	0.035±0.003	1.000±0.000	กลาง	เทโลเซนทริก

หมายเหตุ : * หมายถึง โครโมโซมที่ย้อมติดแถบสีแบบนอร์

ตารางที่ 2 ความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมแขนสั้น (Ls) โครโมโซมแขนยาว (Ll) โครโมโซมแขนรวม (LT) ความยาวสัมพัทธ์ (RL) และดัชนีเซนโทรเมอริก (CI) จาก 20 เซลล์เมทาเฟสของปลากระสูบขีด (H. macrolepidota), 2n=50

โครโมโซมคู่ที่	Ls	Ll	LT	RL ± SD	CI ± SD	ขนาด	ชนิด
1	0.870	1.698	2.568	0.053±0.001	0.661±0.025	ใหญ่	เมทาเซนทริก
2	0.900	1.263	2.163	0.045±0.001	0.583±0.012	กลาง	เมทาเซนทริก
3	0.921	1.129	2.050	0.043±0.001	0.551±0.023	กลาง	เมทาเซนทริก
4	0.856	1.009	1.865	0.039±0.001	0.541±0.016	กลาง	เมทาเซนทริก
5	0.802	0.999	1.801	0.037±0.001	0.554±0.011	กลาง	เมทาเซนทริก
6	0.840	1.587	2.427	0.051±0.002	0.653±0.012	ใหญ่	ซับเมทาเซนทริก
7	0.806	1.461	2.267	0.047±0.002	0.644±0.024	ใหญ่	ซับเมทาเซนทริก
8*	0.744	1.300	2.044	0.042±0.001	0.631±0.007	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
9	0.699	1.222	1.921	0.042±0.001	0.636±0.033	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
10	0.679	1.123	1.802	0.037±0.001	0.623±0.021	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
11	0.666	1.102	1.768	0.037±0.001	0.623±0.031	กลาง	ซับเมทาเซนทริก
12*	0.622	1.133	1.755	0.036±0.001	0.645±0.016	ใหญ่	อะโครเซนทริก
13	0.641	1.099	1.740	0.036±0.003	0.631±0.018	ใหญ่	อะโครเซนทริก
14	0.600	1.052	1.652	0.034±0.001	0.636±0.005	กลาง	อะโครเซนทริก
15	0.546	1.014	1.560	0.032±0.002	0.65±0.034	กลาง	อะโครเซนทริก
16	0.513	1.598	2.111	0.044±0.001	0.756±0.005	กลาง	อะโครเซนทริก
17	0.469	1.456	1.925	0.041±0.001	0.756±0.011	กลาง	อะโครเซนทริก
18	0.456	1.501	1.957	0.041±0.001	0.766±0.008	กลาง	อะโครเซนทริก
19	0.446	1.399	1.845	0.038±0.001	0.758±0.021	กลาง	อะโครเซนทริก
20	0.455	1.321	1.776	0.037±0.001	0.743±0.019	กลาง	อะโครเซนทริก
21	0.450	1.331	1.781	0.037±0.002	0.747±0.021	กลาง	อะโครเซนทริก
22	0.429	1.259	1.688	0.035±0.001	0.745±0.035	กลาง	เทโลเซนทริก
23	0.394	1.208	1.602	0.033±0.004	0.754±0.003	กลาง	เทโลเซนทริก
24	0.000	1.860	1.860	0.039±0.001	1.000±0.023	กลาง	เทโลเซนทริก
25	0.000	1.677	1.677	0.035±0.001	1.000±0.015	กลาง	เทโลเซนทริก

หมายเหตุ : * หมายถึง โครโมโซมที่ย้อมติดแถบสีแบบนอร์

6.เอกสารอ้างอิง

[1] C. Vidthayanon, *Checklist of freshwater fishes in Thailand*, 2. Bangkok, Thailand : Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning, 2017.

[2] W. Kasiroek, N. Luangoon and A. Tanomtong, "Cytogenetics of Madarinfish (*Synchiropus spp.*)", 1. Chonburi, Thailand : Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi, Thailand, 2014.

[3] R. Arai, "A Chromosome Study on Two Cyprinid Fishes *Acrossocheilus labiatus* and *Pseudorasbora pumila pumila* with Note on Eurasian Cyprinid and Their Karyotypes", *Bull. Natn. Sci. Mus. Ser. A.*, 8, 3, 131-182, 1982.

[4] N. Pongthana, "Aquaculture genetic research in Thailand", *Fish Genetic research in member countries and institutions of the Internation Network on Genetics in Aquaculture*, 64, 179, 2001.

[5] W. Magtoon and T. Donskul, "Karyotype of giant snakehead fish and Thai Yisok fish", 1. Bangkok : Srinakharinwirot University, 1989.

[6] H.T. Gary, and E.D. Jane. "Chromosome preparation and analysis" *American Fisheries Society*, Bethesda, Maryland, USA, 171-190, 1990.

[7] A. Tanomtong, and et al, "A new natural autotetraploid and chromosomal characteristics of dwarf snakehead fish, *Channa gachua* (Perciformes, Channidae) in Thailand", *Cytologia*, 79, 1, 15-27, 2014.

[8] W.M. Howell and D.A. Black, "Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method", *Experientia*, 36, 1980.

[9] R. Turpin and J. Lejeune. "Les chromosomes humains" Gauthierpillars, Paris Water resources regional office 7, 1965.

[10] T. Donskul and W. Maktoon, "Karyotypes of Seven Cyprinid Fishes: *Systomus binotatus, Puntius brevis, Poropuntius laoensis, Labiobarbus siamensis, Catlocarpio siamensis, Tor tambroides* and *Probarbus jullieni* from Thailand", *SWU Sci. J*, 24, 2, 79-92, 2551.

[11] W. Khrueanet, W. Supiwong and N. Nithikulworawong, "Karyotype of Eye-Spotted Barb (*Hampala dispar* Smith, 1934) from Kom Ko Pond, Nong Khai Province", *KKU Science Journal*, 45, 3, 566-573, 2022.

[12] T. Donskul and A. Puphitthayasathaporn, "Karyotype of fifteen species of cyprinis fiehes (family Cyprinidae) in Thailand", *14th National Genetics Conference*, Miracle Grand Convention Hotel, Bangkok, 11-13 March 2005, 217-222.

[13] M. Sophawanat, A. Tanomtong and W. Supiwong, "Standardized Karyotype and Idiogram of Sicklefin Barb (*Puntioplites falcifer*) in Thailand" *Koch Cha Sarn Journal of Science*, 39, 2, July-December 2017.

[14] K. Seetapan, "Karyotypes of sex fish species of the family Cyprinidae", *The 45th Kasetsart University Academic Conference*. Bangkok, Thailand, 30 January - 2 February 2007, 749-758.

[15] W. Supiwong, N. Nithikulworawong and W. Khrueanet, "Karyotypeof Eye-Spotted Barb (*Hampala dispar* Smith, 1934) from Kom Ko Pond, Nong Khai Province" *KKU Sci. J.*, 45, 3, 566-573, 2560.

[16] M.K. Stivari and I. C. Martins-Santos, "Karyotype diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). Cytologia, 69, 1, 25-34, 2004.

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

[18] P. Kaewmad and A. Tanomtong, *Genetics Marker for Analysis and Species Identified of Family Pangasiidae in Thailand*, 1. Maha Sarakam, Thailand : *รายงานการวิจัย*, Maha Sarakham Rajabhat University, 2017.

[19] W. Supiwong and P. Jearranaiprepame, "Cytogenetics of Giant Snakehead Fish (*Channa micropeltes*) from the Northeast of Thailand" *The 12th National Graduate Research Conference*, Khon Kaen University, 12-13 February 2009. 1584-1590.

[20] J. R. Gold, C.T. Amemiya, and J. R. Ellison, "Chromosomal heterochromatin differentiation in North American cyprinid fishes", *Cytologia*, 51, 557-566, 1986.