

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

การจัดเตรียมตัวอย่าง

1. สถานที่เก็บตัวอย่าง

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

ตาราง 1 จุดเก็บตัวอย่างปลาคือทั้งหมด 11 ลุ่มน้ำสาขา

ชื่อลุ่มน้ำสาขา	อำเภอ	สถานี	ความสูงจากระดับน้ำทะเล (เมตร)
1. ลุ่มน้ำแม่ปิงตอนบน	เชียงดาว	ห้วยแม่ซ้าย	550
		ห้วยแม่นะ	980
		ห้วยแม่จาเหนือ	760
		ห้วยแม่เม๊ะ	800
		น้ำคอง	900
2. ลุ่มน้ำแม่จัด	พร้าว	ห้วยแม่แพงนอก	500
		ห้วยแม่แพงใน	540
		ห้วยแม่ป๋าม	500
		ห้วยแม่ปั้ง	650
		น้ำค่อม่อนหินไหล	800
3. ลุ่มน้ำแม่แดง	แม่แดง	ห้วยก๊อบก๊อบ	500
		น้ำแม่เลา	640
		ห้วยคันดองเหนือ	550
		ห้วยคันดองใต้	470
		ห้วยแม่สะ	700

ตาราง 1 (ต่อ)

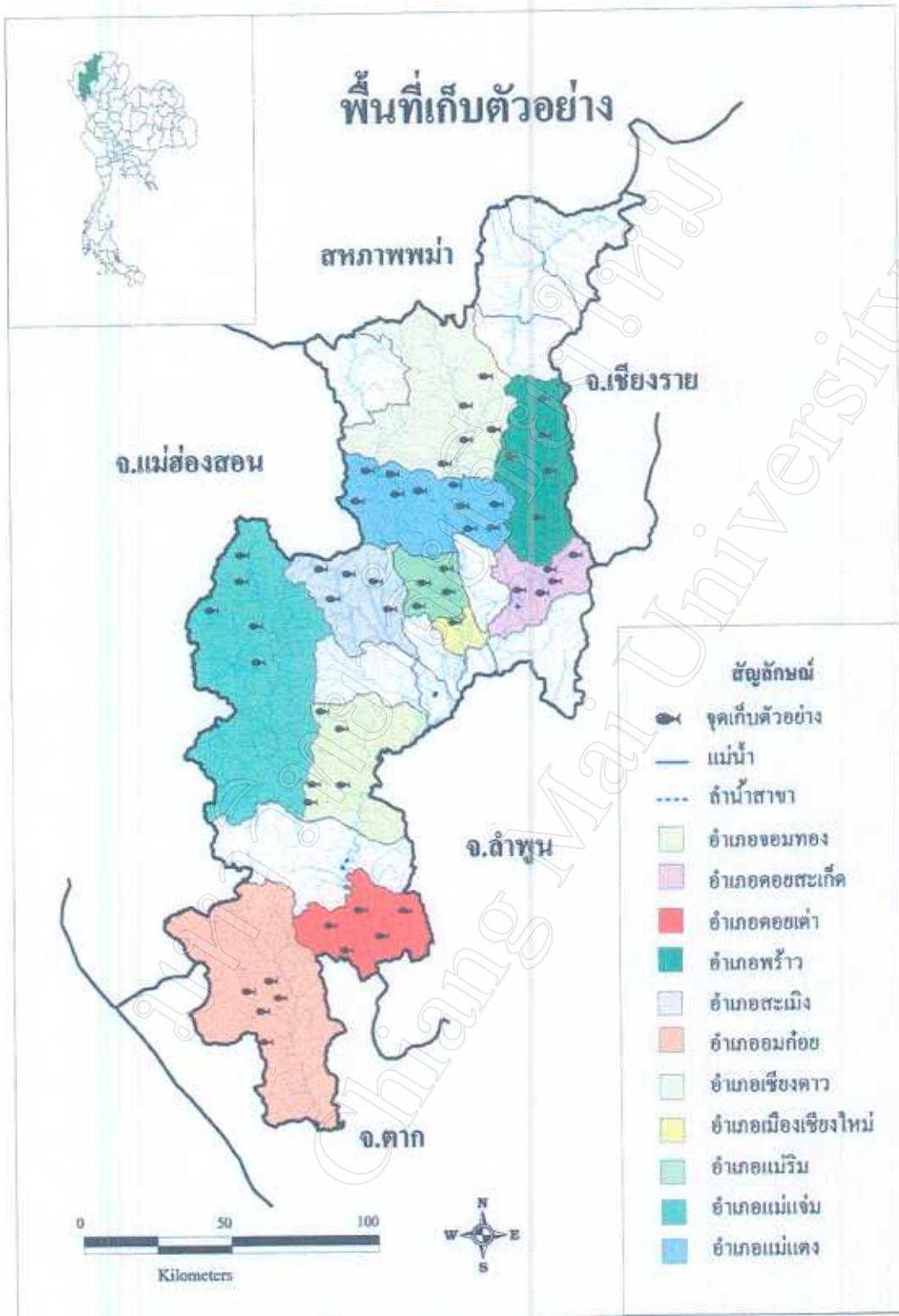
ชื่อลุ่มน้ำสาขาย่อย	อำเภอ	สถานี	ความสูงจากระดับน้ำทะเล (เมตร)
4. ลุ่มน้ำแม่มิ	แม่แตง	น้ำแม่มิ	600
		ห้วยน้ำใส	750
		ห้วยแม่หลอด	850
		ห้วยป่าเป้	710
		ห้วยน้ำริน	630
5. ลุ่มน้ำแม่มิตอนกลาง	เมือง และแม่มิ	น้ำแม่ตา	650
		ห้วยใจ	450
		ห้วยวังสา	670
		มณฑาธาร	700
		ห้วยแม่เขม	450
6. ลุ่มน้ำแม่กว	คอยสะเก็ด	ห้วยแก้ว	800
		ห้วยกั่ว	860
		น้ำแม่กว	700
		ห้วยมะเกลือ	1,000
		ห้วยทรายขาว	800
7. ลุ่มน้ำขาน	สะเมิง	น้ำแม่ขาน	750
		ห้วยอมลอง	640
		ห้วยอ้อ	490
		ห้วยกาด	610
		ถ้ำธารแม่ขาน	800
8. ลุ่มน้ำแม่ปิงตอนล่าง	คอยเต่า	ห้วยแม่บวนใต้	380
		ห้วยแม่บวนเหนือ	360
		น้ำแม่เตียน	340
		ห้วยโป่ง	420
		ห้วยทุ่ง	380

ตาราง 1 (ต่อ)

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

2. การเก็บตัวอย่าง

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



รูป 4 จุดเก็บตัวอย่างปลาคือจากลุ่มน้ำสาขาของแม่น้ำปิงในจังหวัดเชียงใหม่



รูป 5 ลักษณะลุ่มน้ำสาขางจุดที่ทำการเก็บตัวอย่างปลา

3. เวลาที่ทำการศึกษา

เก็บตัวอย่างปลาคือตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2542 ถึงเดือนมกราคม 2544 และนำมาศึกษาที่
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การศึกษาคาร์ิโอไทป์

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

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

1.2 หลังจากฉีดแล้วนำปลาไปไว้ในตู้ เปิดออกซิเจนแรงๆ เป็นระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง

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

1.4 คูดไต และเหงือกในสารละลายมาเก็บไว้ในหลอด centrifuge เมื่อครบ 10 นาที จึงนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 8-10 นาที แล้วคูดส่วนใสทิ้ง

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

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

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

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

1.9 เติมน้ำทำให้คงสภาพ (fixative 3:1) ใหม่เพื่อเจือจางส่วนผสมให้เหมาะสมกับการเตรียมสไลด์

2. การเตรียมสไลด์

2.1 วางสไลด์ใหม่ลงบนโต๊ะบริเวณที่เรียบๆ หยดสารทำให้คงสภาพที่เย็นลงบนสไลด์ 1-2 หยด แล้วเช็ดด้วยผ้าก๊อซให้สะอาด

2.2 หยดส่วนผสมของเซลล์กับสารทำให้คงสภาพลงบนสไลด์ 1 หยด

2.3 เมื่อสไลด์แห้งหมาดๆ มองเห็นเป็นสีรุ้ง หยดสารทำให้คงสภาพทับลงไปบนหยดเซลล์อีก 1 หยด

2.4 เมื่อสไลด์แห้งสนิทแล้วจึงนำมาตรวจสอบคุณภาพสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast เลือกสไลด์ที่มีคุณภาพดีไว้ย้อมสีต่อไป

3. การย้อมสีโครโมโซม

วิธีการย้อมสีแบบ Giemsa stained

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

วิธีการย้อมสีแบบ Q-banding

1. นำสไลด์ (จากข้อ 2. การเตรียมสไลด์) ที่มีอายุระหว่าง 2-7 วัน
2. แช่สไลด์ใน Methanol (absolute, 75% และ 50%) ขึ้นละ 5 นาที (เวลาที่เหมาะสมได้จากภาคผนวก ก) ตามลำดับ
3. แช่ในน้ำกลั่น 5 นาที แล้วล้างด้วย McIlvaine buffer (pH 7)
4. ย้อมในสารละลาย 10 % Quinacrine 20 นาที
5. ล้างด้วย McIlvaine buffer 4 ครั้ง

ปิดด้วย Cover glass โดยใช้ McIlvaine buffer เป็นตัวกลาง แล้วใช้ยาทาเล็บทาตามขอบ Cover glass เพื่อผนึก

วิธีการย้อมสีแบบ G-banding

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

วิธีการย้อมสีแบบ C-banding คัดแปลงจากวิธีของ Gustashaw (1991)

1. สไลด์ที่ต้องการย้อมควรมีอายุ 2-3 วัน นำมาแช่ใน 0.2 N HCl เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (เวลาที่เหมาะสมได้จากภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิห้อง
2. ล้างผ่านน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งให้แห้ง
3. นำสไลด์ดังกล่าวมาแช่ใน 1% Ba(OH)₂ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-40 วินาที (เวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมได้จากภาคผนวก ก)
4. ล้างด้วยน้ำกลั่นอุ่นๆ 2 ครั้ง (แกว่งแรงๆ และล้างทันทีให้หมดตะกอน)
5. แช่ใน 2XSSC (pH 7.0) (ภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
6. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง
7. ย้อมด้วย 5% Giemsa (เตรียมและกรองใหม่) นาน 8-15 นาที

8. ล้างน้ำกลั่นทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

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

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

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

3. เอา Cover glass ออก และล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

4 การนับจำนวนโครโมโซมของปลาคือแต่ละชนิดที่ศึกษา

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

5 เปรียบเทียบแถบสีของโครโมโซม

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

6 การถ่ายรูปโครโมโซม

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

7 การจัดการิโอไทป์

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

ตาราง 2 การแยกชนิดโครโมโซมปลาคือโดยใช้ค่า Centromeric index (CI)

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

8 การเปรียบเทียบการิโอไทป์ของปลาคือแต่ละชนิด

8.1 จำนวนโครโมโซมของเซลล์ร่างกาย

8.2 ชนิดโครโมโซม (chromosome type)

การตรวจชื่อวิทยาศาสตร์ (Identification)

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

การจัดกลุ่มความใกล้ชิดของปลาคือ

จัดกลุ่มความใกล้ชิดปลาคือโดยใช้ลักษณะภายนอกที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิด และใช้ชนิดของโครโมโซมปลาคือแต่ละชนิด โดยใช้วิธี hierarchical cluster analysis จากโปรแกรม SPSS