

บทที่ 5

อภิปรัชญาการศึกษา

การจัดการโครโมโซม

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

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

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

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

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

การย้อมสีแบบ Q-banding วิธีนี้มีการศึกษาาก่อนข้างน้อย อาจเนื่องมาจากการตรวจวิเคราะห์ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ซึ่งมีราคาแพง สีสะท้อนแสงฟลูออเรสเซนส์ไม่ค่อยคงทนจะจางค่อนข้างเร็ว และแสดงรายละเอียดของโครโมโซมน้อยกว่าการย้อมสีแบบ G-banding จึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์โครโมโซมแต่ละแท่งได้ละเอียด (นิตยศรี, 2541) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้พบว่าปลาเพียงชนิดเดียวคือ *Schistura spilota* ที่ปรากฏแถบสีบริเวณปลายแขนของโครโมโซมคู่ที่ 3 แบบ telocentric เพียงคู่เดียวเช่นเดียวกับการศึกษาในปลาตุหนา (*Anguilla anguilla*) (Medrano *et al.*, 1988)

การเปรียบเทียบคาริโอไทป์ระหว่างชนิด

เนื่องจากปลาคือสกุล *Schistura* ยังไม่มีรายงานว่ามีผู้ใดเคยทำการศึกษามาก่อน จะมีก็เพียงปลาคือสกุล *Nemacheilus* 2 ชนิด ซึ่งได้มีการรายงานเพียงจำนวนโครโมโซมแต่ไม่ได้รายงานถึงรูปแบบของคาริโอไทป์ พบว่า *N. aureus* และ *N. barbatulus* มีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด $2n=50$ (Khuda-Bukhah *et al.*, 1986; Collares-Pereira *et al.* 1995) ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับปลาคือสกุล *Schistura* ที่ได้ทำการศึกษานี้ครั้งนี้ ยกเว้น *S. kengtungensis* ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด $2n=52$ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปลาคือแต่ละชนิดที่ทำการศึกษามีรูปแบบคาริโอไทป์แตกต่างกัน

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

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

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

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

ตาราง 16 เปรียบเทียบการจัดกลุ่มความใกล้ชิดของปลาคือ

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

การเตรียมเซลล์

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

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

การย้อมสีแบบพิเศษ

1. การย้อมสีแบบ Q-banding

เวลาที่ใช้แช่สไลด์ใน Methanol (absolute, 75% และ 50%) พบว่าช่วงเวลาในการแช่สไลด์ต่ำกว่า 5 นาที การติดสีจะไม่ค่อยชัดเจน แต่ช่วงเวลาดังกล่าว เป็นต้นไปจะให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษารั้งนี้จึงเลือกช่วงเวลาดังกล่าว สิ่งสำคัญในการย้อมสีวิธีนี้คือ ต้องได้โครโมโซมที่มีคุณภาพดี มีการกระจายตัวดี และมี cytoplasm เหลือน้อยที่สุด สิ่งที่สำคัญอีกประการคือการปรับ pH ของ buffer ให้เหมาะสมกับโครโมโซมที่เตรียมได้ในแต่ละห้องปฏิบัติการ คุณภาพของน้ำกลั่นที่ใช้ ก็มีความจำเป็น ถ้าสามารถปรับปรุงแก้ไขการย้อมจนได้สายชัดเจนแล้วก็จะสามารถย้อมได้ตลอดโดยใช้เทคนิคเดิม

2. การย้อมสีแบบ G-banding

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

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

3. การย้อมสีแบบ C-banding

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